

Aus der Klinik für Innere Medizin III –
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm

Das Multidrug Resistance Related Protein 1 moduliert durch Export
von Leukotrien C₄ oxidativen Stress, Endothelfunktion und
Atherosklerose im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2014

vorgelegt von
CHIA HUI CHEN
geboren am 23.09.1977
in Taichung

Dekanin/Dekan:

Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatterin/Berichterstatter:

2. Berichterstatterin/Berichterstatter:

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Saarbrücken, den 10.08.2014

Chia-hui Chen

Danksagungen

Herrn Professor Dr. med. M. Böhm danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation in den Forschungslaboren der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes durchzuführen.

Herrn Professor Dr. med. G. Nickenig danke ich für die Überlassung des Themas und seine wissenschaftliche Unterstützung.

Herrn Privatdozent Dr. med. Cornelius Müller bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Sein freundliches und motivierendes Engagement bei allen Aspekten dieser Arbeit und vor allem für die herausragende wissenschaftliche Unterstützung waren stets eine große Hilfe und Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich auch bei allen Doktoranden, technischen Assistentinnen und wissenschaftlich tätigen Ärzten im Labor für die Möglichkeit bedanken, mit Ihnen in einem Team zusammenarbeiten zu dürfen.

Paula und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Zusammenfassung.....	10
2. Einleitung.....	11
2.1. Atherosklerose.....	11
2.2. OXIDATIVER STRESS UND REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS).....	12
2.2.1 NAD(P)H-Oxidase.....	13
2.2.2 Xanthinoxidoreduktase (XOR).....	14
2.2.3 Entkoppelte Form der endothelialen NO-Synthase (eNOS).....	14
2.2.4 Mitochondriale ROS.....	15
2.2.5 Lipoxigenase und Leukotrien.....	15
2.3. MULTIDRUG RESISTANCE RELATED PROTEINS (MRP).....	18
2.3.1 GSH als Substrat des MRP1.....	19
2.3.2 Transport des Leukotrien C ₄ durch MRP1.....	22
2.4. FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT.....	22
3. Materialien und Methoden.....	24
3.1. MATERIALIEN.....	24
3.1.1 Verwendete Substanzen.....	24
3.1.2 Zellkulturmaterialien.....	26
3.1.3 Verwendete Lösungen, Nährmedien und Puffer.....	27
3.1.4 Versuchstiere.....	29
3.1.5 Geräte.....	30
3.2. METHODEN.....	31
3.2.1 Zellkultur.....	31
3.2.1.1 Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	31
3.2.1.2 Kultivierung von VSMC.....	31
3.2.1.3 Aussaat der VSMC auf 96-Loch-Kulturplatten.....	32
3.2.2 Messung von ROS in VSMC.....	32
3.2.2.1 Messung von ROS in VSMC bei Behandlung mit Angiotensin II und Blockierung des MRP1.....	33
3.2.2.2 Messung von ROS in MRP1 ^{-/-} - und Wildtyp-VSMC nach Stimulation mit Angiotensin II.....	33
3.2.2.3 Messung von ROS in MRP1 ^{-/-} - und Wildtyp-VSMC nach Stimulation mit Angiotensin II, LTC ₄ , MK 571 und Leukotrien-Blocker (Montelukast).....	33
3.2.3 Proteinseparation und -detektion.....	34
3.2.3.1 Proteinisolation.....	34

3.2.3.2	Proteinkonzentrationsmessung mittels Colormetrie	34
3.2.3.3	Western-Blot.....	35
3.2.3.4	Messung der Expression des MRP1 in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Angiotensin II in VSMC.....	36
3.2.4	Bestimmung der LTC ₄ -Freisetzung unter Behandlung mit Angiotensin II in VSMC.....	37
3.2.5	Tierversuche zur Vasorelaxation bei Blockierung von MRP1 und Leukotrienen.....	37
4.	Ergebnisse	39
4.1	DER EINFLUSS DES MRP1 AUF DIE FREISETZUNG DER ANGIOTENSIN II INDUZIERTEN ROS-BILDUNG IN VSMC	39
4.2	DIE WIRKUNG VON ANGIOTENSIN II AUF DIE FREISETZUNG DES LTC ₄ IN DEN MRP1 ^{-/-} -UND WILD-TYP-VSMC.....	42
4.3	WIRKUNG DER MRP1 INHIBITION UND DER CYS-LT1 REZEPTOR INHIBITION AUF DIE BILDUNG VON ROS IN VSMC.....	43
4.4	WIRKUNG DER PHARMAKOLOGISCHEN BLOCKIERUNGEN DES MRP1 UND DES CYS-LT1-REZEPTORS AUF DIE ENDOTHELIALE FUNKTION UND ATHEROSKLEROSE IN APOE ^{-/-} -MÄUSEN.....	46
5.	Diskussion	49
5.1	BEDEUTUNG DES MRP1 IM BEZUG AUF ATHEROSKLEROSE	49
5.2	MRP1-INHIBITION ALS ANTIOXIDATIVER MECHANISMUS	49
5.3	DIE BEDEUTUNG DES LTC ₄ IN DEN VSMC.....	50
5.4	DIE BEDEUTUNG DER INTERAKTION VON LTC ₄ UND ANGIOTENSIN II IN DEN VSMC.....	52
5.5	AUSBLICK.....	54
6.	Literaturverzeichnis.....	55
7.	Publikationen.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Membranproteine	ATP binding cassette-Membranproteine
AP	Angina pectoris
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E Defizienz
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cys-LT1	Cysteinyl-Leukotrien-1
DCF	Dichlorofluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
DOCA	Deoxycorticosteronacetat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Isoform der NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe-S	Eisensulfat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
G	Schleuderziffer der Zentrifuge
GCS	γ-Glutamylzysteinesynthetase
GSH	Glutathion
GSSG	oxidierte Form von Glutathion
h	Stunde
H ₂ DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

IL-1	Interleukine 1
l	Liter
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LTA ₄	Leukotrien A ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTD ₄	Leukotrien D ₄
LTE ₄	Leukotrien E ₄
MRP 1	Multidrug Resistance-Related Protein 1
MRP ^{-/-}	Multidrug Resistance-Related Protein 1 Defizienz
min.	Minute
ml	Milliliter
ML	Montelukast
mmol	Millimolar
mol	Molar
Mo	Molybdän
NAD(P)H	Nikotinamidadeninnucleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	NAD(P)H-Oxidase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
sog.	sogenannt
SOD	Superoxid Dismutase
TEMED	N,N,N`N`-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
WT	Wildtyp
XOR	Xanthinoxidoreduktase

XO

Xanthinoxidase

XDH

Xanthindehydrogenase

μ l

Mikroliter

μ g

Mikrogramm

μ mol

Mikromolar

1. Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine der häufigsten Volkserkrankungen und wird als ein inflammatorischer Vorgang angesehen. Die Entstehung der Atherosklerose steht in einem engen Zusammenhang mit Leukotrienen und erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Leukotriene sind Mediatoren der Entzündungsreaktion. Ein wichtiges Leukotrien ist LTC₄, der Ausgangspunkt aller cysteinylhaltigen Leukotriene. Es hat vasokonstriktive Wirkung und verursacht erhöhte ROS-Bildung in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Der transmembranöse Transport des LTC₄ wurde *via* Multidrug Resistance Related Protein 1 (MRP1) vermittelt. MRP1 gehört zu der Familie der ABC-Membrantransportproteine. Aufmerksamkeit hat MRP1 dadurch erregt, dass es an der Entstehung von Chemotherapieresistenzen beteiligt ist. Unter erhöhter ROS-Bildung wurde MRP1 in den Endothelzellen als Transportprotein für GSSG identifiziert. Eine MRP1-Inhibition in den Endothelzellen führt zur verbesserten endothelialen Funktion und reduzierten Blutdruckwerten im Tiermodell. In den VSMC führt Angiotensin II zur LTC₄-Bildung und zur erhöhten ROS-Bildung.

Die vorgelegte Arbeit untersuchte den Einfluss des Exports von LTC₄ *via* MRP1 auf den oxidativen Stress, die Endothelfunktion und die Atherosklerose *in vitro* und *in vivo*. Die durch Angiotensin II induzierte ROS-Bildung in VSMC konnte durch eine Inhibition des MRP1 (MK571) um 59% reduziert werden. Angiotensin II rief den über MRP1 vermittelten Export des LTC₄ in VSMC hervor. LTC₄ verursachte eine vergleichbare hohe Zunahme der ROS-Bildung in VSMC wie Angiotensin II. In MRP1^{-/-}-VSMC führte LTC₄ zu einer signifikanten Zunahme der ROS-Bildung, während Angiotensin II keinen Effekt zeigte. Der Anteil LTC₄ induzierter ROS machte einen ganz erheblichen Prozentsatz an der gesamten Angiotensin II induzierten ROS-Generierung aus.

Die Angiotensin II induzierte ROS-Bildung in VSMC setzt die Anwesenheit des MRP1 voraus. LTC₄ spielt eine entscheidende Rolle für die Angiotensin II induzierte ROS-Bildung und darauf entstehende atherosklerotische Läsion. Eine Inhibition des MRP1 und eine Blockierung des Cys-LT1-Rezeptors durch Gabe von Montelukast haben eine antioxidative und antiatherosklerotische Wirkung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MRP1 eine wichtige Rolle für die Entstehung der Atherosklerose spielt. MRP1-Inhibition stellt somit eine neue potentielle Option für die Prävention und Therapie der Atherosklerose dar.

2. Einleitung

2.1. Atherosklerose

Nach Angabe des Statistischen Bundesamts zählen die Erkrankungen des Kreislaufsystems zu den häufigsten Todesursachen. In Deutschland starben im Jahr 2012 insgesamt 349.217 Menschen an chronische ischämische Herzerkrankung. Dies entspricht 40,2 % aller Todesfälle (Statistisches Bundesamt 2012). Kardiovaskulären Erkrankungen, wie Herzinfarkt und Apoplex, liegt ein arteriosklerotischer Umbau des Gefäßsystems zu Grunde. Generell beginnt eine kardiovaskuläre Erkrankung meist unbemerkt und verläuft langsam und progredient. Eine Reihe von Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hyperlipidämie und Adipositas, begünstigen die Entstehung der Atherosklerose.

Die Ursache für die Entstehung der Atherosklerose ist nicht vollständig aufgeklärt. Der Gefäßumbau beginnt mit einer Schädigung der innersten Gefäßschicht, des Endothels. Das Endothel dient als Barriere zwischen Gewebe und Gefäßen. Durch den Endothelschaden kommt es zur endothelialen Dysfunktion, die durch vermehrte Freisetzung freier Sauerstoffradikale und hierdurch bedingten oxidativen Stress gekennzeichnet ist.

Nach der Response-to-injury-Hypothese von Ross führt die endotheliale Dysfunktion zur Veränderung der Permeabilität der Endothelzellen und zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie beispielweise Prostacyclinen und Leukotrienen. Infolge dessen kommt es zur vermehrten Adhäsion von Monozyten, die im folgenden die Gefäßwand durchwandern. Hier wandeln sich die Zellen in Makrophagen und schließlich Schaumzellen durch Aufnahme von Lipoproteinen um. Makroskopisch bilden sich sogenannte Fettstreifen („fatty streaks“). Im weiteren Verlauf kommt es zur Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC) und letztlich zur Entstehung atherosklerotischer Plaques (Ross 1993, Ross 1999). Die Plaques können über Jahre stabil bleiben oder sich in instabile Plaques umwandeln. Die Ruptur einer Plaque in einem Koronargefäß kann durch den Verschluss des betroffenen Gefäßes zum akuten Myokardinfarkt führen.

2.2 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Unter oxidativem Stress versteht man eine Stoffwechsellage, bei der exzessiv erhöhte Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden, ohne dass eine gleichzeitige Erhöhung der antioxidativen Metabolisierung auftritt. ROS sind Stoffwechselprodukte aerober Zellen, die aus der Umsetzung von Sauerstoff entstehen. Man unterscheidet freie Radikale, wie das Superoxidanion (O_2^-), das Hydroxylradikal (OH^-) und das Stickstoffmonoxidradikal (NO^-), von nicht radikalischen Verbindungen, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und hypochlorige Säure ($HOCl$). Die freien Radikale haben ein oder mehrere ungepaarte Elektronen, während die nicht radikalischen Verbindungen keine freie Elektronen besitzen (Halliwell 1993, Nageswara et al. 2005, Touyz 2004).

Unter physiologischen Bedingungen kommen ROS in geringer Konzentration in den Zellen vor und dienen als Signalmoleküle, sog. „second messenger“ (Allen and Tresini 2000, Touyz 2004, Griendling et al. 1999). In dieser Funktion regulieren sie die Kontraktion, die Relaxation und das Wachstum von VSMC.

Zellen besitzen antioxidative Schutzsysteme, die unter normalen Bedingungen ROS in weniger reaktive Metabolite umwandeln. Wenn die Menge an ROS die Kapazität dieser Schutzsysteme übersteigt, kommt es zu einer Schädigung von biologischen Makromolekülen, wie beispielsweise von DNA–Doppelsträngen, Phospholipiden in den Zellmembranen und Proteinen (Griendling et al. 2000, Nageswara et al. 2005). In vielen Studien wurde gezeigt, dass ROS bei der Entstehung der atherosklerotischen Läsionen und der endothelialen Dysfunktion eine wichtige Rolle spielen (Fukai et al. 2002, Müller et al. 2005b).

Die vier wichtigsten Quellen von ROS in vaskulären Zellen sind: NAD(P)H-Oxidase, Xanthinoxidoreduktase, die entkoppelte Form der endothelialen NO-Synthase und die mitochondriale ROS (s. Abb. 1).

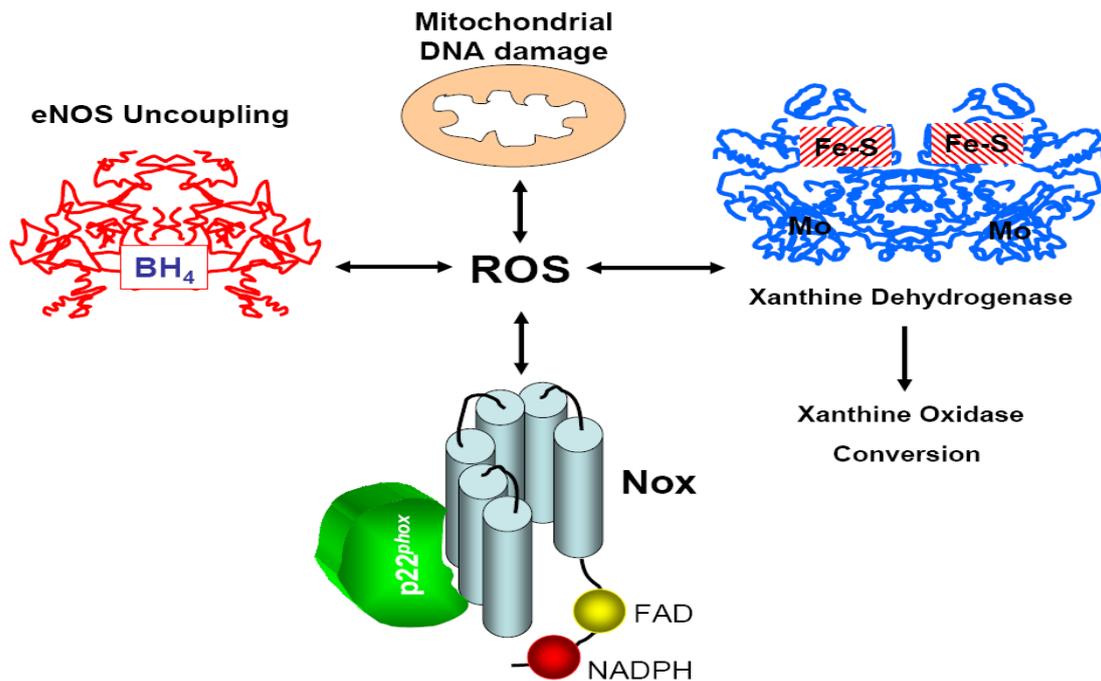


Abbildung 1: Die wesentlichen Quellen reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) in vaskulären Zellen (nach Müller et al. 2005b)

BH_4 : 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin, $NADPH$: Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, FAD : Flavin-Adenin-Dinukleotid, Mo : Molybdän, $Fe-S$: Eisensulfat, Nox: $NAD(P)H$ -Oxidase, $p22^{phox}$: $NAD(P)H$ -Oxidase Untereinheit, eNOS: endotheliale Isoform der NO-Synthase

2.2.1 $NAD(P)H$ -Oxidase

In den Gefäßen werden ROS überwiegend von der Membran-assoziierten $NAD(P)H$ -Oxidase produziert. Die $NAD(P)H$ -Oxidase oxidiert $NAD(P)H$, bei dieser Reaktion entstehen durch die Elektronenübertragung auf Sauerstoff zwei Superoxidanionen.

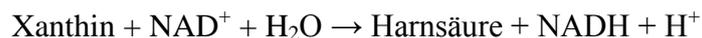
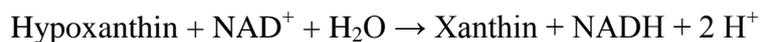


Diese $NAD(P)H$ -Oxidase kann in VSMC und Fibroblasten detektiert werden. (Griendling et al. 1994). Sie wird durch vasoaktive Substanzen, z. B. Angiotensin II, Serotonin, Interleukin-1 ($IL-1$), Tumornekrosefaktor- α ($TNF-\alpha$) reguliert. Angiotensin II stimuliert die $NAD(P)H$ -

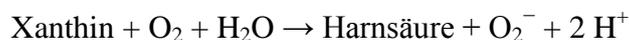
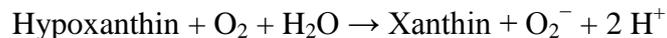
Oxidase in den vaskulären Zellen und führt zur vermehrten Produktion von ROS (Madamanchi et al. 2005). Bei der Hypertonie, der Atherosklerose und dem Diabetes mellitus wurden eine Überexpression von NAD(P)H-Oxidasen und eine vermehrte Produktion von ROS beobachtet (Touyz 2004).

2.2.2 Xanthinoxidoreduktase (XOR)

Die XOR kann als Xanthinoxidase (XO) oder als Xanthindehydrogenase (XDH) im Körper vorkommen. Sie ist am Abbau von Purinnukleotiden (Bestandteilen der DNA) bis hin zum Endprodukt Harnsäure beteiligt. Die XDH katalysiert die Umsetzung von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure unter Verbrauch von NAD^+ .



Die XO benutzt bei den analogen Reaktionen anstelle von NAD^+ Sauerstoff als Elektronenfänger. Dabei entsteht jeweils ein Superoxidanion (Corte and Stripe 1972).



Das Verhältnis zwischen XDH und XO ist entscheidend für das Ausmaß der ROS-Produktion. Die Umwandlung von XDH in XO kann durch $\text{TNF-}\alpha$ und Oxidantien, wie beispielweise Peroxynitrit, stimuliert werden (Fridel et al. 1989, Sakuma et al. 1997). Unter pathologischen Bedingungen verursacht die XO die stärkste ROS-Produktion (Wassmann et al. 2004). Die Gabe eines XOR-Inhibitors an Patienten, die unter einer koronaren Herzerkrankung leiden, führt zu einer Verbesserung der Endothelfunktion (Landmesser et al. 2003).

2.2.3 Entkoppelte Form der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

Ein drittes, bei der Entstehung von ROS involviertes Enzym ist die entkoppelte Form der eNOS. Die eNOS katalysiert die Stickstoffmonoxid-(NO)-Bildung bei Vorhandensein des 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH_4) aus der Aminosäure L-Arginin. NO dient als „second messenger“ und führt in den VSMC zur Gefäßrelaxation. NO gilt als vasoprotektiver Faktor

und die verminderte Produktion von NO durch eNOS begünstigt die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen (Cai and Harrison 2000).

Bei Mangel an BH₄ oder L-Arginin kommt es zur Entkoppelung der eNOS, bei dem die eNOS anstelle von NO nun Sauerstoffradikale produziert (Cai and Harrison 2000, Landmesser et al. 2003). Eine Folge der Entkoppelung der eNOS ist somit die vermehrte ROS-Gesamtproduktion in den Zellen. Zahlreiche Studien konnten die entkoppelte eNOS als einen wichtigen ROS-Produzenten bei der Atherosklerose, dem Diabetes mellitus, der arterieller Hypertonie sowie der Hyperlipidämie identifizieren (Landmesser et al. 2003, Vasquez-Vivar et al. 2002).

2.2.4 Mitochondriale ROS

In der inneren Mitochondrienmembran wird Energie mittels enzymatischer Redoxreaktionen produziert. Molekularer Sauerstoff dient hier als Elektronenempfänger und unter physiologischen Bedingungen wird dieser Sauerstoff nach der Aufnahme von vier Elektronen zu Wasser (H₂O) reduziert. Nur ein bis zwei Prozent der auf Sauerstoff übertragenen Elektronen werden in Superoxidanionen umgewandelt. Unter pathologischen Bedingungen hingegen werden vermehrt Superoxidanionen hergestellt. Diese Superoxidanionen werden mit Hilfe der Superoxiddismutase in aggressives H₂O₂ umgewandelt. Dadurch entstehen wiederum zusätzliche ROS. Eine vermehrte Produktion der mitochondrialen ROS wird bei der Entstehung von Neuropathien, Myopathien und Kardiomyopathien nachgewiesen (Fosslin 2003).

2.2.5 Lipoxygenase und Leukotrien

Die Bildung von ROS durch die bereits genannten Enzymsysteme wird durch eine Vielzahl von Chemokinen gesteuert. Hierzu gehören neben anderen die Leukotriene als Stoffwechselprodukte des Arachidonsäurestoffwechsels. Ausgangspunkt der Bildung von Leukotrienen ist das Enzym 5-Lipoxygenase. Die 5-Lipoxygenase befindet sich in der

Zellmembran und ist an der Biosynthese der Leukotriene beteiligt. In mehreren Studien (Mehrabian et al. 2002, Spanbroek et al. 2003) wurde gezeigt, dass die 5-Lipoxygenase in menschlichen atherosklerotischen Läsionen vermehrt gebildet wird und an der Oxidation der Low-Density-Lipoproteine (LDL) beteiligt ist. Die Konzentration der 5-Lipoxygenase korreliert mit dem Stadium der Atherosklerose. Eine Deletion der Gene für die 5-Lipoxygenase schützte im Tiermodell vor Atherosklerose (Mehrabian et al. 2002). Eine Herabregulation des 5-Lipoxygenase-Gehalts in Mäusen zeigte ebenfalls einen kardioprotektiven Effekt (Lisovsky et al. 2009).

Der Ausgangspunkt für die Biosynthese der Leukotriene ist die Arachidonsäure. Sie gehört zu den ungesättigten Fettsäuren und ist Bestandteil der Zellmembran. Durch die Wirkung der Phospholipase A2 wird Arachidonsäure aus der Zellmembran abgespalten. Unter der Katalyse der 5-Lipoxygenase wird zunächst das Leukotrien A₄ (LTA₄) synthetisiert. Leukotriene werden in zwei Gruppen, in cysteinyl-freie und cysteinyl-haltige Leukotriene, unterteilt. LTA₄ kann durch die Hydrolase in das cysteinylfreie Leukotrien B₄ oder mit Hilfe der Leukotrien C₄-(LTC₄)-Synthetase durch Anheftung von Glutathion über eine Thioetherbrücke in Cysteinyl-LTC₄ umgewandelt werden. Durch schrittweise Abtrennung von Glutamat und Glycin entstehen aus LTC₄ die Leukotriene D₄ (LTD₄) und E₄ (LTE₄). LTC₄ wird durch das Multidrug Resistance Related Protein 1 (MRP1) in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dort wird das LTC₄ unter der Wirkung der γ -Glutamylleukotrienase in LTD₄ umgewandelt (Peters-Golden and Henderson 2007, Bäck 2007) (s. Abb.2).

Für den Aufbau und die Funktion des Gefäßsystems spielen die cysteinylhaltigen Leukotriene eine entscheidende Rolle (Allen et al. 1998). LTC₄ ist der Ausgangspunkt aller cysteinylhaltigen Leukotriene. LTC₄ erhöht die Kapillarpermeabilität, die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulzellen und die Freisetzung von ROS. Das LTC₄ und die 5-Lipoxygenase werden in atherosklerotisch veränderten Koronarien vermehrt gebildet. Die Synthese von LTC₄ in VSMC kann durch Angiotensin II induziert werden (Stanke-Labesque et al. 2001) und die Wirkung des LTC₄ wird über den spezifischen Cysteinylleukotrien-Rezeptor (Cys-LT1-Rezeptor) vermittelt. Der Zusammenhang zwischen LTC₄ und Atherosklerose wurde bisher wenig untersucht.

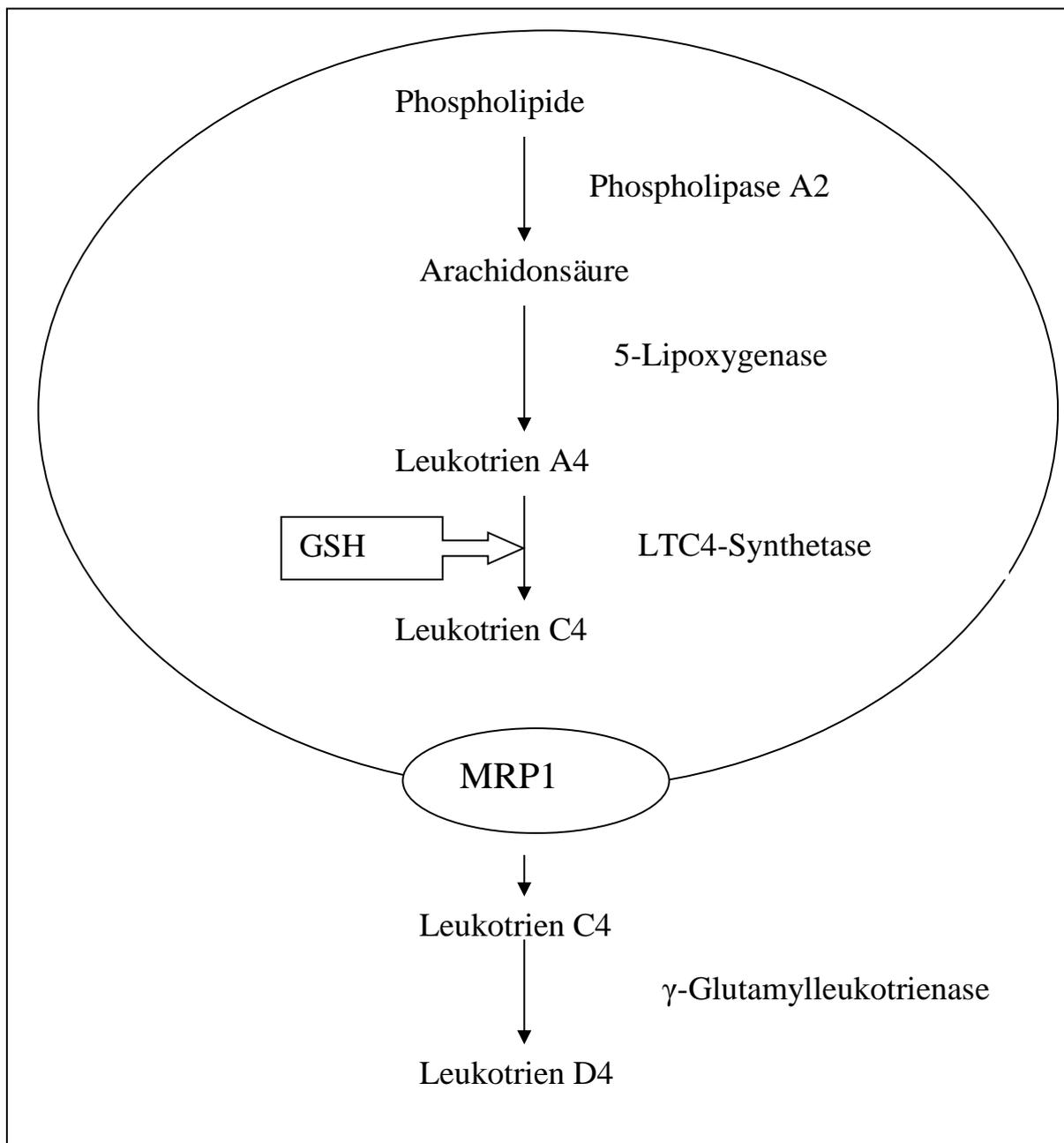


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biosynthese und des Membrantransports der Leukotriene.

GSH: Glutathion. MRP1: Multidrug Resistance Related Protein 1

Durch die Wirkung der Phospholipase A2 wird aus Arachidonsäure-haltigen Membranphospholipiden Arachidonat (Eikosatetraensäure) abgespalten. Unter Mitwirkung der 5-Lipoxygenase wird LTA₄ hergestellt. Durch Anheftung von Glutathion entsteht LTC₄. Die Synthese von LTB₄ ist hier nicht dargestellt.

2.3 Multidrug Resistance Related Proteins (MRP)

MRP gehören zur Familie der membrangebundenen Transportproteine. Sie wurden erstmals in Zusammenhang mit der Entwicklung von Chemoresistenzen in Tumorzellen entdeckt (Kruh and Belinsky 2003, Leslie et al. 2001). Sie wirken als lipophile Anionenpumpen an der Zellmembran. Chemoresistenzen entstehen durch den aktiven Export von Chemotherapeutika oder Antibiotika durch die MRP-Familie aus dem Zellinnern in das extrazelluläre Medium. Derzeit sind elf Membranproteine der MRP-Familie bekannt, die in unterschiedlichen Organen nachgewiesen wurden. Bislang konnte nur das MRP1 in allen Organen nachgewiesen werden.

Alle Proteine der MRP-Familie haben zwei membrandurchspannende Domänen (MSD1, MSD2), die jeweils aus sechs transmembranen α -Helices bestehen und aus zwei Nukleotidbindenden Domänen (NBD1, NBD2), die sich auf der zytoplasmatischen Seite befinden (Bakos et al. 1996, Flens et al. 1994, Kast and Gros 1997). MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 und MRP7 besitzen zusätzlich eine Membran-durchspannende Domäne (MSD0), die ebenfalls aus sechs transmembranen α -Helices besteht. Das Vorhandensein dieser Domäne ist notwendig für den Transport von LTC₄ über MRP1 (Hipfner et al. 1997). In der Abbildung 3 wird die Domänenstruktur des MRP1 dargestellt.

Der durch MRP1 vermittelte Transport ist ATP-abhängig. Neben den Chemotherapeutika wurde eine Vielzahl anderer Substanzen als MRP1-Substrate bestätigt. Dazu zählen reduziertes Glutathion (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG), LTC₄ sowie das 17 β -Estradiol (Kruh and Belinsky 2003). Glutathion ist ein Tripeptid aus Glutamat, Glycin und Cystein. Die Synthese von Glutathion erfolgt intrazellulär durch die Katalyse der γ -Glutamylcysteinsynthetase (GCS) unter Verbrauch von zwei ATP-Molekülen. Das Gleichgewicht von GSSG mit GSH beeinflusst die ROS-Bildung der Zelle (Dringen et al. 1999).

Die oben aufgeführten MRP1-Substrate spielen alle eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und die Entstehung der Atherogenese (Kruh and Belinsky

2003). Die Befunde lassen vermuten, dass MRP1 potentiell an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt ist. Bevor diese Substrate *via* MRP1 transportiert werden, erfolgt zunächst eine Konjugation an Glutathion.

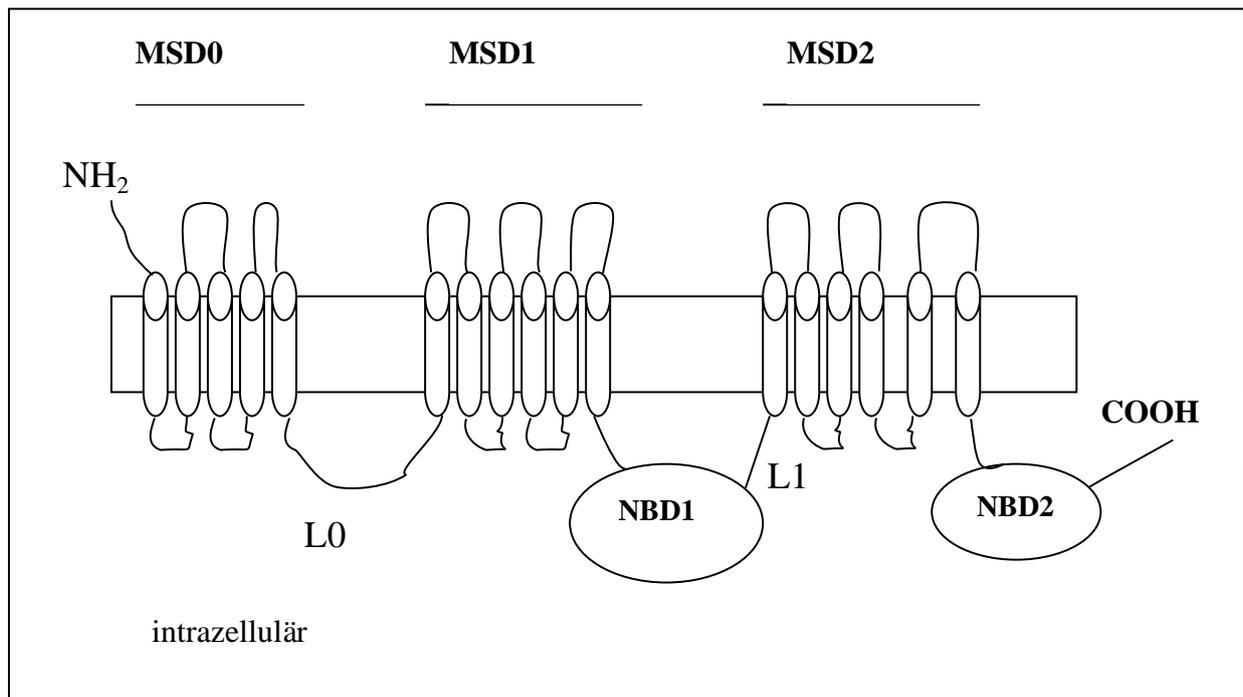


Abbildung 3: Domänenendarstellung des MRP1 (nach Bakos et al. 1996, Hipfner et al. 1999, Kast and Gros 1997).

NH₂: Aminoterminus des Proteins, COOH: Carboxyterminus des Proteins, MSD: Membran-durchspannende Domäne; NBD: Nukleotid-bindende Domäne; L: zytoplasmatischer Loop

2.3.1 GSH als Substrat des MRP1

MRP1 war das erste Protein der MRP-Familie, welches entdeckt wurde. Es hat eine hohe Affinität zu endogenem konjugiertem Glutathion und LTC₄ (Leier et al. 1994, Müller et al. 1994, Wijnholds et al. 1997). Die genauen molekularen Kontakte der Interaktion zwischen

MRP1 und Glutathion sind noch nicht ganz geklärt. Bis jetzt sind aber fünf unterschiedliche Transportmechanismen bekannt (Ballatori et al. 2005, Kruh and Belinsky 2003):

- GSH wird als ein direktes Substrat von MRP1 aus den Zellen exportiert (Abb. 4A).
- GSH kann als ein Co-Transporter des MRP1 an dem Transport bestimmter Substrate (z. B. Doxorubicin, Vincristine, Aflatoxin B1) beteiligt sein (Abb. 4B).
- GSH wird selbst nicht durch MRP1 in den extrazellulären Raum transportiert, aber es stimuliert den Transport anderer Substrate durch MRP1 (Abb. 4C).
- Umgekehrt kann der GSH-Transport über MRP1 von einem anderen Substrat gefördert werden (Abb. 4D).
- Schließlich kann das oxidierte Produkt der GSH, das GSSG, auch durch MRP1 transportiert werden (Abb. 4E).

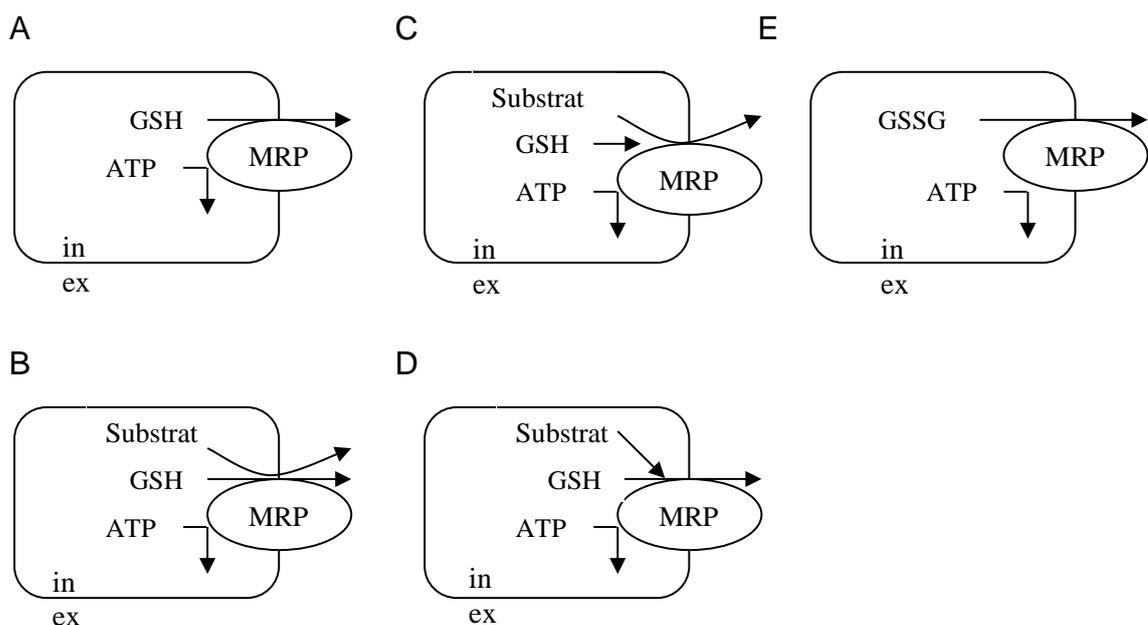


Abbildung 4: Schematische Darstellung des GSH-Transports via MRP1 (Ballatori et al. 2005, Kruh and Belinsky 2003)

A GSH als ein Substrat der MRP1. **B** GSH dient als Cotransporter für bestimmte Substrate (z. B. Doxorubicin, Vincristine, Aflatoxin B1). **C** GSH stimuliert den Transport verschiedenster Substrate durch MRP1. **D** Der GSH-Transport durch MRP1 wird von einem anderen Substrat gefördert. **E** Transport von GSSG. (in = intrazellulär, ex = extrazellulär)

Zwar wurde die Rolle des MRP1 bei der Entwicklung von Chemoresistenzen in Tumorzellen intensiv erforscht (Flens 1994, Kruh 2003), über die Funktion in vaskulären Zellen ist dagegen wenig bekannt. Müller et al. 2005 haben gezeigt, dass Endothelzellen unter ROS-Exposition vermehrt GSSG mittels MRP1 aus den Zellen exportieren (s. Abb. 5). Die Inhibition des MRP1 führt zur verminderten Apoptose der Endothelzellen und zur verbesserten endothelialen Funktion. Diese Befunde konnten in MRP1 defizienten Mäusen (MRP1^{-/-}) unter einer durch Deoxycorticosteron-Acetat-(DOCA)-Salz induzierten Hypertonie bestätigt werden (Müller et al. 2005a). Die DOCA-Salz induzierte Hypertonie ist eine Widerstandshypertonie, die sich nach unilateraler Nephrektomie der Tiere und nach Implantation eines Pellets mit dem Wirkstoff DOCA innerhalb von zwei bis drei Tagen ausbildet. *In vivo* zeigten die MRP1^{-/-}-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Tieren eine verbesserte endotheliale Funktion sowie einen reduzierten Blutdruck (Widder 2007).

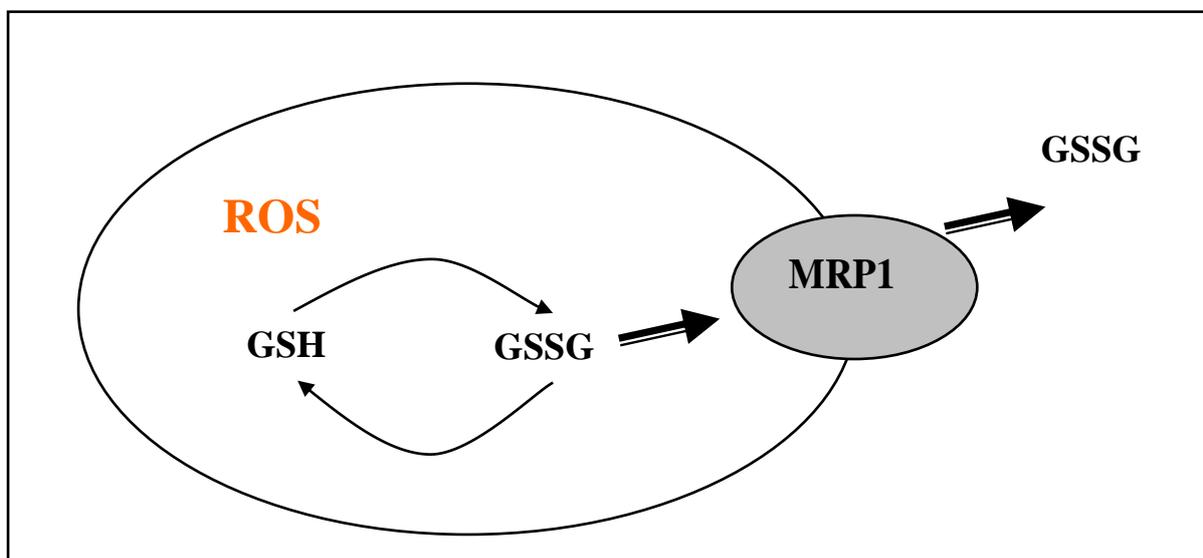


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Abbaus von ROS in Endothelzellen (nach Müller et al. 2005a)

Unter ROS-Exposition wurde ein gesteigerter Export von GSSG *via* MRP1 aus den Endothelzellen beobachtet.

2.3.2 Transport des Leukotrien C₄ durch MRP1

In HeLa-Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass LTC₄ nach Konjugation an GSH mittels MRP1 in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (Leier et al. 1994). Im extrazellulären Raum bindet es sodann an seinen spezifischen Rezeptor (Cys–LT1-Rezeptor) und löst eine Reihe inflammatorischer Vorgänge aus. Dieser LTC₄-Transport konnte durch einen spezifischen Blocker des MRP1 (MK571) erfolgreich verhindert werden (Leier et al. 1994). LTC₄ wird im menschlichen Gewebe hauptsächlich von den Leukozyten freigesetzt. Im Gefäßsystem können auch die VSMC LTC₄ bilden und somit freisetzen (Stanke-Labesque et al. 2001). Angiotensin II stimuliert die Synthese des LTC₄ (Nasjletti 1998) und LTC₄ ist an der Angiotensin II induzierten Hypertonie beteiligt (Stanke-Labesque et al. 2001).

2.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das MRP1 hat eine antioxidative Funktion und spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind derzeit noch nicht gänzlich erforscht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des MRP1 in vaskulären Zellen untersucht und die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat MRP1 in VSMC hinsichtlich der durch Angiotensin II induzierten ROS–Produktion in VSMC?
2. Ist MRP1 am Transport des durch Angiotensin II induzierten LTC₄ beteiligt?
3. Welche Einflüsse haben die Inhibition des MRP1 und des LTC₄ im Tiermodell?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden folgende experimentelle Ansätze durchgeführt:

1. Messung freier Sauerstoffradikale in VSMC unter Behandlung mit Angiotensin II, mit dem spezifischen Blocker des MRP1 (MK 571) und mit Angiotensin II sowie MK 571.

2. Messung freier Sauerstoffradikale in MRP1^{-/-}- und Wildtyp- VSMC unter Behandlung mit Angiotensin II. Messung von LTC₄-Freisetzung in Wildtyp-VSMC und MRP1^{-/-}-VSMC.
3. Untersuchung der endothelialen Funktion und der atherosklerotischen Läsionen in Apolipoprotein-(Apo)- E^{-/-}-Mäusen unter Gabe von MK 571 und des Leukotrienblockers Montelukast

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Substanzen

Nachfolgend sind alle verwendeten Reagenzien, Antikörper und ihre Abkürzungen aufgelistet.

Acrylamid	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Angiotensin II	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Antirabbit Sekundärantikörper für Western–Blot	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Bromphenol Blue	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid–Dihydrat	Merck, Darmstadt
Caspase–3 Colormetric Assay Kit	Alexis, Grünberg
2',7'–dichlorodihydrofluorescein diacetate (H ₂ DCF–DA)	MoBiTec, Göttingen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium(DMEM)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Enhanced chemiluminescence (ECL)	
Western–Blot Detektion	Amersham, Braunschweig
Elastase	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	BDH Laboratory Supplies, Poole England
Fötale Kälber Serum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Merck, Darmstadt

HEPES	Serva, Heidelberg
Prestained SDS-PAGE Standards, High Range	Bio-Rad, München
Hydrogenperoxid	Merck, Darmstadt
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ I	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Kuvette	Eppendorf AG, Hamburg
LTD ₄	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
LTC ₄ /D ₄ /E ₄ Biotrak Assay	Amersham, Freiburg
Magnesiumchlorid–Hexahydrat	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Methanol	Merck, Darmstadt
MK571	Alexis, Grünberg
Montelukast	MSD, Haar
MRP1-Antikörper	Santa–Crutz Biotechnology, Santa Cruz
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Natriumvanadat	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid	VWR, Darmstadt
Nitrocellulosemembran 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schüll
N,N,N´N´–Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Penicillin/Streptomycinlösung	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ponceau S Solution	Serva, Heidelberg
Präzisionswischtücher	Kimberly–Clark, Reigate UK
Protease inhibitor	Roche, Mannheim
Protein Assay Reagent A	Bio–Rad, München
Protein Assay Reagent B	Bio–Rad, München
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel

Refobacin	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
siRNA (small interfering RNA)	MWG, Ebersberg
Tissue-Tek, O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Zoeterwoude Niederlande
Triton X 100	Sigma–Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsininhibitor	Sigma – Aldrich, Taufkirchen
Tris Base	VWR, Darmstadt
Tween–20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.2 Zellkulturmaterialien

Boyden–Kammern	BD biosciences, Heidelberg
Eppendorf–Küvetten	Greiner bio–one, Essen
Eppendorf–Röhrchen	Greiner bio–one, Essen
15 ml Falkons Cellstar	Greiner bio–one, Essen
50 ml Falkons Cellstar	Greiner bio–one, Essen
10-cm-Kulturplatte	Renner, Darmstadt
6–Loch–Kulturplatte	Renner, Darmstadt
24–Loch–Kulturplatte	Renner, Darmstadt
Einmalskalpell	Braun, Melsungen
Zellkultur–Kammern	Chamber Slides Lab Tek, Nalge Nunc, Hereford, UK
Zellkultur–Platten	Cell Culture Slides, Nalge Nunc, Hereford, UK
Zell–Schaber	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Verwendete Lösungen, Nährmedien und Puffer

Die verwendeten Lösungen, Nährmedien und Puffer wurden wie folgt angesetzt:

<u>E1-Puffer:</u>	135mM NaCl
	5,4 mM KCl
	1,8 mM CaCl ₂ • H ₂ O
	1,0 mM MgCl ₂ • 6H ₂ O
	10mM Glucose
	20mM HEPES; pH 7,5
<u>Elektrophoresepuffer:</u>	25 mM Tris-Acetat
	200 mM Glycin
	0,1% SDS
<u>Immunpräzipitation Harvest-Puffer:</u>	0,05 M HEPES
	0,05 M NaCl
	0,005 M EDTA
	0,01M Natriumpyrophosphat
	0,06 M Natriumfluorid
	0,001 M Natriumvanadat; pH 7,5
<u>Phosphate-buffered saline (PBS):</u>	137 mmol/l Natriumchlorid
	2,7 mmol/l Kaliumchlorid
	8,1 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat
	1,5 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat
<u>Phosphate-buffered saline (PBS)-Tween:</u>	137 mmol/l Natriumchlorid
	2,7 mmol/l Kaliumchlorid
	8,1 mmol/l Dinatriumhydrogenphosphat
	1,5 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat
	0,1 % Tween-20
<u>Puffer für Tierversuch:</u>	118 mmol/l NaCl
	2,5 mmol/l CaCl ₂
	4,73 mmol/l KCl
	1,2 mmol/l MgCl ₂
	1,2 mmol/l KH ₂ PO ₄
	25 mmol/l NaHCO ₃

	0,026 mmol/l NaEDTA
	5,5 mol/l D(+) Glucose; pH 7.4
<u>5% SDS–Polyacrylamidsammegel:</u>	3,4 ml Aqua bidest.
	830 µl 30% Acrylamid/Bisacrylamid–Lösung
	29:1 ; 630 µl 1M Tris–Lösung pH 6,8
	50 µl 10% SDS–Lösung
	50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfatlösung
	5 µl TEMED
<u>8% SDS–Polyacrylamidtrenngel:</u>	11,5 ml Aqua bidest.
	6,7 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid–Lösung
	29:1
	6,3 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
	250 µl 10% SDS–Lösung
	250 µl 10% Ammoniumperoxodisulfatlösung
	15 µl TEMED
<u>12% SDS–Polyacrylamidtrenngel:</u>	8,2 ml Aqua bidest.
	10 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid–Lösung 29:1
	6,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8
	250 µl 10% SDS–Lösung
	250 µl 10% Ammoniumperoxodisulfatlösung
	15 µl TEMED
<u>VSMC–Hungermedium:</u>	500 ml DMEM
	100 Units/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	160 µg/ml Refobacin
<u>VSMC–Medium:</u>	500ml DMEM
	100 Units/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	160 µg/ml Refobacin
	10% FKS
<u>Western–Blotting Protein Lysepuffer:</u>	0,05 M HEPES
	0,05 M NaCl
	0,005 M EDTA
	0,01M Natriumpyrophosphat

	0,06 M Natriumfluorid
	0,001 M Natriumvanadat; pH 7,5
	9 ml 1 % Triton
	1 Tablette Proteaseinhibitoren
<u>Western-Blotting Probeladepuffer:</u>	124 mM Tris/HCl pH 6, 8
	2 % SDS
	20 % Glycerol
	2 % Bromphenol Blue
	55 mM DTT
<u>Western-Blotting Transferpuffer:</u>	48 mM Tris Base
	386 mM Glycin
	0,1 % SDS
	20 % Methanol

3.1.4 Versuchstiere

12 Wochen alte Apo-E-defiziente (Apo-E ^{-/-}) Mäuse	Charles River, Sulzfeld
Sprague-Dawley Ratten, männlich	Charles River, Sulzfeld

3.1.5 Geräte

Nachfolgende Geräte wurden eingesetzt:

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Biofuge	Heraeus, Hanau
Blotting-Kammer, BioRad Miniprotean	BioRad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Elektrophorese-Kammer, BioRad Miniprotean	BioRad, München
Entwicklerkassette Agfa Cera 10	Agfa Köln
Filmentwickler Agfa Curix 60	Agfa, Köln
Cryostat	Leica, Nußloch
Photofilm Hyperfilm	Amersham Bioscience, Braunschweig
Vortexer	Janke&Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
Wallace Victor2 D Fluorometer	Perkin Elmer LAS GmbH, Jügesheim

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Die VSMC der thorakalen Aorta wurden aus 6-10 Wochen alten männlichen Sprague-Dawley Ratten nach einer leicht modifizierten Methode von Chamley–Campbell et al. durch enzymatische Dispersion isoliert (Chamley-Campbell et al. 1979).

Nach steriler Explantation wurde die von Bindegewebe befreite Aorta in eisgekühltes PBS überführt, welches 100 U/ml Penicillin und Streptomycin enthielt. Anschließend wurde die Aorta für 30 min bei 37 °C in einer Enzymlösung aus DMEM mit 1,5 mg/ml Kollagenase Typ I, 0,5 mg/ml Elastase und 0,5 mg/ml Trypsininhibitor inkubiert. Es folgte die Entfernung der Adventitia. In etwa 1 mm³ große Stücke geschnitten, wurden die Aortasegmente unter ständigem Rühren für zwei Stunden in der oben aufgeführten Enzymlösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in DMEM, welches 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/l Streptomycin enthielt, resuspendiert und in Gewebekulturflaschen ausgesät, die mit 10 ml desselben Nährmediums gefüllt waren. VSMC brauchten im Vergleich zu anderen Zellarten, wie etwa Fibroblasten oder Endothelzellen, länger, um sich an den Boden der Kulturgefäße anzuheften (Chamley–Campbell et al. 1979). Daher ließen sich Kontaminationen durch andere Zellarten durch Überführung des Mediums in neue Gewebekulturflaschen nach 5 h weitgehend vermeiden. 5–8 Tage später konnten die konfluenten Primärkulturen mit einer 1:10 in PBS-Puffer verdünnten Trypsin–EDTA–Lösung (0,05% Trypsin) vom Schalenboden abgelöst und erneut ausgesät werden.

3.2.1.2 Kultivierung von VSMC

Für die weitere Kultivierung der Zellen wurde ein Kulturmedium, das aus DMEM, 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/l Streptomycin bestand, verwendet. Die Zellen wurden in

einem Brutschrank mit 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Die Passage erfolgte wie im Kapitel 3.2.1.1 beschrieben. Für die Experimente wurden Kulturen der 5. bis 15. Passage verwendet.

Je nach Bedarf erfolgte die Passagierung der Zellen auf 10-cm-Kulturplatten oder 96-Loch-Kulturplatten.

3.2.1.3 Aussaat der VSMC auf 96-Loch-Kulturplatten

Dafür wurden die Zellen nach der Entfernung des Mediums durch Trypsinierung (2–4 ml Trypsin–EDTA) vom Schalenboden abgelöst. Die Zellen wurden mit Kulturmedium in 50 ml Falcon-Gefäße überführt und bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Nährmedium resuspendiert und fraktioniert zur Subkultivierung ausgesät. Die Zellen waren nach zwei bis drei Tagen konfluent. Im Anschluss daran konnten sie für die Experimente eingesetzt werden.

3.2.2 Messung von ROS in VSMC

Dazu wurde eine 96-Loch-Kulturplatte mit VSMC benötigt. Die konfluenten Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen für 12 h in einem Brutschrank mit 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Die Medien der behandelten VSMC wurden abgesaugt. Zur Messung der Dichlorofluorescein-(DCF)-Fluoreszenz wurde die Kulturplatte mit gleichem Volumen E1-Puffer und 100 µmol/l H₂DCFDA aufgefüllt. H₂DCFDA ist ein fluoreszierendes Reagenz, das oft für die Bestimmung von intrazellulären ROS verwendet wird. Wenn H₂DCFDA mit ROS reagiert, wird es in das grün fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescein umgewandelt. Mit Hilfe eines Wallace Victor 2 D Fluorometers wurde die Radikalbildung der Zellen analysiert.

3.2.2.1 Messung von ROS in VSMC bei Behandlung mit Angiotensin II und Blockierung des MRP1

Eine 96-Loch-Kulturplatte mit konfluenten VSMC wurde zunächst mit sterilem 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die VSMC alternativ mit Angiotensin II (10^{-6} mol/l), dem pharmakologischen Blocker des MRP1 (MK 571, 5 μ mol/l) oder beiden Substanzen (in den oben genannten Konzentrationen) stimuliert. Die VSMC wurden für 12 h im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Über H₂DCFDA (s. Kap. 3.2.2.) erfolgte die Messung der ROS im Wallace Victor 2 D Fluorometer.

3.2.2.2 Messung von ROS in MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC nach Stimulation mit Angiotensin II

Zellkulturen von MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC wurden mit Angiotensin II (10^{-6} mol/l) für 12 h stimuliert. Die Inkubation mit H₂DCFDA und die ROS-Messung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2. beschrieben.

3.2.2.3 Messung von ROS in MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC nach Stimulation mit Angiotensin II, LTC₄, MK 571 und Leukotrien-Blocker (Montelukast)

LTC₄ wird durch MRP1 vom Zytoplasma in den extrazellulären Raum transportiert. Zur Untersuchung der Rolle des LTC₄ bei der Entstehung von ROS wurden die MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC mit folgenden Bedingungen für 12 Stunden stimuliert:

- Angiotensin II (10^{-6} mol/l)
- LTC₄ (10^{-6} mol/l)
- MK 571 (5 μ mol/l)
- Montelukast (10^{-6} mol/l)
- MK 571/Angiotensin II
- Montelukast/Angiotensin II

Montelukast ist ein spezifischer Leukotrien–Blocker. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 ° C.

Nach 12 h Inkubation wurden die Nährmedien abgesaugt. Nach Gabe von H₂DCFDA wurden die ROS mittels eines Wallace Victor 2 D Fluorometers (s. Kap. 3.2.2) gemessen.

3.2.3 Proteinseparation und -detektion

3.2.3.1 Proteinisolation

Eine 10-cm–Kulturplatte mit konfluenten VSMC wurde zunächst mit sterilem 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die VSMC mit Angiotensin II (10⁻⁶ mol/l) für 12 h stimuliert. Die VSMC wurden zweimal mit kalter PBS–Lösung gewaschen und anschließend in 200µl Lysepuffer mit einem Zellschaber vom Boden der Schalen abgelöst. Weiter wurden die Proben in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgenommen und 20 min. auf Eis gelagert. In dieser Zeit wurden die Proben alle 2 min. mit dem Vortexer gut gemischt und lysiert. Durch das mehrmalige Mischen wurden die Zellen lysiert, die Zellkerne und Membranbestandteile sedimentierten und die zytoplasmatische Fraktion befand sich im Überstand. Die Proben wurden anschließend für 2 min. bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übernommen. Der Überstand konnte elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Western–Blot Experiment (s. Kap. 3.2.3.3.) weiter verwendet werden.

3.2.3.2 Proteinkonzentrationsmessung mittels Colormetrie

Für die Proteinkonzentrationsmessung der Proben wurde der Bio–Rad DC Protein Assay nach der Methode von Lowry verwendet (Lowry et al. 1951). Die Proben wurden zuerst mit sterilem Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt. 20 µl der verdünnten Probe wurden dann mit 100 µl Bio–Rad Protein Reagenz A (alkaline copper tartrate solution) gemischt. Das Reagenz

A dient dazu, einen Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung zu bilden. Anschließend wurde 800 µl Bio-Rad Protein Reagenz B (dilute Folin reagent) dazu gegeben. Das Reagenz B enthält Phosphomolybdat und Phosphowolframat, die sich durch den Kupfer-Protein-Komplex in Molybdänblau und Wolframblau reduzieren lassen. Dadurch färbt sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration intensiv blau. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Proteinkonzentration der Proben mittels eines BioPhotometers colorimetrisch bestimmt. Als Kontrolle wurde steriles Wasser ohne Proteinzusatz verwendet.

3.2.3.3 Western-Blot

Für diese Experimente wurde ein Mini-Protein 3 Cell Gelelektrophoresesystem verwendet. 10–50 µg Protein, die nach der in Kap. 3.2.3.1 beschriebenen Proteinisolation gewonnen wurden, wurden mit dem entsprechenden Volumen Probeladepuffer und 1 % SDS verdünnt und anschließend auf ein 5 % SDS-Polyacrylamidsammegel in einer Kombination mit einem 8-12 % SDS-Polyacrylamidtrenngel geladen. Zur Bestimmung der Position der gesuchten Proteine wurde auf SDS-Polyacrylamidgel ein High Range Proteinmarker (Molekulargewichtsbereich von 211 bis 49 kDa) aufgetragen und parallel zu den Proben aufgetrennt. Die Elektrophorese lief im Elektrophoresepuffer für ca. 1,5 h bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die Gele wurden anschließend auf ein in Transferpuffer getränktes Filterpapier aufgelegt und mit einer Nitrocellulosemembran und einem weiteren in Transferpuffer getränktem Filterpapier überdeckt. Nach einer Stunde erfolgte der Transfer in einer Miniprotean Blotting-Kammer, die zu ca. 80 % mit Transferpuffer gefüllt wurde. Bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA wurden die Proteine auf die Nitrocellulosemembran überführt. Der Transferpuffer enthielt 20 % Methanol, damit die Gele während des Transfers nicht quellen und die Bindefähigkeit der Nitrocellulose erhöht wird. Weiterhin wurde die Membran anschließend bei Raumtemperatur in 10 % Trockenmilch in PBS über Nacht geblockt. Dieser Schritt verringert unspezifische Bindungen des primären Antikörpers.

Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit den in 1 % Trockenmilch verdünnten ersten Antikörpern (Verdünnung bei MRP1 Antikörper

1:500) bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran dreimalig für 5 min. und einmalig für 10 min. mit 1 x PBS-Tween gewaschen. Tween-20 dient zur Entfernung der nicht spezifisch an die Membran gebundenen Antikörper. Anschließend wurde die Membran mit den in 1 % Trockenmilch verdünnten zweiten Antikörpern (Verdünnung mit Anti-Rabbit Antikörper 1:3000) bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation der sekundären Antikörper wurde die Membran wieder dreimalig für 5 min. und einmalig für 10 min. mit 1 x PBS-Tween gewaschen. Nach dem Trocknen mit Präzisionswischtüchern wurde die Membran zunächst für 60 sec mit dem Western-Blot-Detektionsreagenz ECL inkubiert, danach erfolgte eine Entwicklung mit einem Amersham Hyperfilm in der Dunkelkammer. Mit der ECL wird eine Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenzreaktion durchgeführt, die zu einer Schwärzung der aufgelegten Röntgenfilme im Bereich der Antikörper-markierten Banden führt. Die Entwicklung des Films erfolgte automatisch über einen AGFA Curix Entwickler.

3.2.3.4 Messung der Expression des MRP1 in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Angiotensin II in VSMC

Die Proteinanalyse mittels Western-Blot zur Bestimmung der MRP1-Expression in VSMC erfolgte in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Angiotensin II. Die VSMC wurden für 12 h mit steigenden Konzentrationen von Angiotensin II stimuliert. Die durch anschließende Zellyse gewonnenen Proteine wurden zur Separation der unterschiedlichen Proteingrößen gelelektrophoretisch aufgetrennt, vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einem spezifischen, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Durch Inkubation mit einem sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper wurden die gesuchten Proteine sichtbar gemacht. Die Übertragung der Proteinbanden von der Nitrocellulosemembran auf Hyperfilm erfolgte nach der in Kap. 3.2.3.3 genannten Methode.

3.2.4 Bestimmung der LTC₄-Freisetzung unter Behandlung mit Angiotensin II in VSMC

Für diesen Versuch wurde ein Leukotrien-C₄/D₄/E₄ Biotrak Assay benutzt. Die Wildtyp- und MRP1^{-/-}-VSMC wurden in einer 96-Loch-Kulturplatte kultiviert. Die konfluenten VSMC wurden mit Angiotensin II (10⁻⁶ mol/l) für 16 h stimuliert. Nach Stimulation mit Angiotensin II wurden die zytoplasmatischen Überstände, wie unter Kap. 3.2.3.1 beschrieben, gewonnen. Die Standardlösungen und Reagenzlösungen wurden entsprechend dem beigefügten Protokoll vorbereitet und in einem Volumen von 50 µl den Wildtyp- und MRP1^{-/-}-VSMC zugegeben. Anschließend wurden 50 µl Antiserum zum Blocken von unspezifischen Bindungen hinzugefügt. Die 96-Loch-Kulturplatten wurden abgedeckt und bei einer Temperatur von 4–10 °C für 2 h inkubiert. Nach Inkubation wurden 50 µl LTC₄-Peroxidase hinzugefügt. Die Platte wurde wieder abgedeckt und für weitere 3 h bei einer Temperatur von 4–10 °C inkubiert.

Nach der zweiten Inkubation wurden die Zellen mit 300 µl Waschpuffer viermal gewaschen. Anschließend wurde 150 µl TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin) dazu gegeben. Die 96-Loch-Kulturplatte wurde abgedeckt und für 30 min. bei Raumtemperatur vorsichtig geschüttelt. 100 µl einer 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) wurde dazu gegeben. Die Messung erfolgte bei 450 nm im Microplate Reader Model 550.

3.2.5 Tierversuche zur Vasorelaxation bei Blockierung von MRP1 und Leukotrienen

Zur Untersuchung der Einflüsse der Blockierung des MRP1 und der Leukotriene auf die Endothel-abhängige Vasorelaxation wurden drei Gruppen von je fünf ApoE^{-/-}-Mäusen analysiert. Die Mäuse waren drei Monate alt und wurden für sechs Wochen mit einer cholesterinreichen Western-Typ-Diät mit einem Anteil von 21 % Fett, 19,5 % Casein und 1,25 % Cholesterol gefüttert. Die erste Gruppe erhielt zusätzlich MK 571 (5 mg/kg KG/Tag), um MRP1 zu inhibieren. Die zweite Gruppe erhielt Montelukast (1mg/kg KG/Tag) als Inhibitor des Cys-LT₁ Rezeptors. Die dritte Gruppe bekam Placebo und diente als Kontrolle. Im Anschluss wurden die Tiere getötet, die Aorten entnommen und diese sofort in gekühlte

Pufferlösung eingetaucht. Das perivaskuläre Bindegewebe wurde vorsichtig entfernt und die Aorten wurden in Stücke von 3 mm Größe geschnitten. Die Aortenschnitte wurden in der Relaxationskammer, die zuvor ebenfalls mit Pufferlösung gefüllt und equilibriert wurde, befestigt. Diese Kammer wurde an ein Kontraktionskraftmessgerät angeschlossen. Die Aortenschnitte wurden innerhalb von 60 min. schrittweise bis zu einer Ruhespannung von 10 mN gedehnt. Die Medikamente Carbachol und Nitroglycerin wurden in steigenden Konzentrationen gegeben, um kumulative Reaktionskurven zu erhalten (10^{-9} mol/l bis 10^{-5} mol/l).

Carbachol ist ein direktes Parasympathomimetikum und aktiviert die Synthese und die Freisetzung der NO aus Endothel. Die von Carbachol induzierte Relaxation ist vom funktionsfähigen Endothel abhängig. Daher dient das Ausmaß der Relaxation des Gefäßsegments der Mäuse unter Gabe von steigenden Carbachol-Konzentrationen als Indikator für die endotheliale Funktion. Nitroglycerin wird im Körper in NO umgewandelt. Dadurch vermittelt Nitroglycerin eine Endothel-unabhängige Vasorelaxation.

Die Medikamentenkonzentrationen wurden gesteigert, wenn die Vasokonstriktion oder die Vasorelaxation beendet war. Die Medikamente wurden abgewaschen, bevor die nächste Substanz zugegeben wurde. Die Aortenwurzeln wurden in Tissue-Tek O.C.T-Medium eingebettet und mittels Flüssigstickstoff eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden sie bei -80 °C aufbewahrt. Mittels eines Leica Cryostaten wurden die Aortenwurzeln in Schnitte geschnitten und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger übernommen. Die gefrorenen Schnitte wurden bei -80 °C gelagert. Zur Messung des Ausmaßes der atherosklerotischen Läsionen wurden die Schnitte mit Oil Red O gefärbt und analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Der Einfluss des MRP1 auf die Freisetzung der Angiotensin II induzierten ROS-Bildung in VSMC

MRP1 spielt eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der DOCA-Salz induzierten Hypertonie (Müller et al. 2005a) sowie im Gefäßendothel. Ein Einfluss der MRP1 Inhibition auf die Atherogenese war bislang noch nicht untersucht worden. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die Rolle der MRP1 Inhibition in der Angiotensin II induzierten ROS-Bildung in VSMC zu untersuchen. Zunächst wurde jedoch der Einfluss des Angiotensin II auf die Synthese des MRP1 analysiert. Die Expression von MRP1 in den VSMC wurde nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II mittels Western-Blot detektiert (s. Kap. 3.2.3.4). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Heraufregulation der MRP1-Expression in den Angiotensin II stimulierten VSMC (s. Abb. 6). Dies legte eine relevante Interaktion zwischen Angiotensin II und MRP1 nahe.

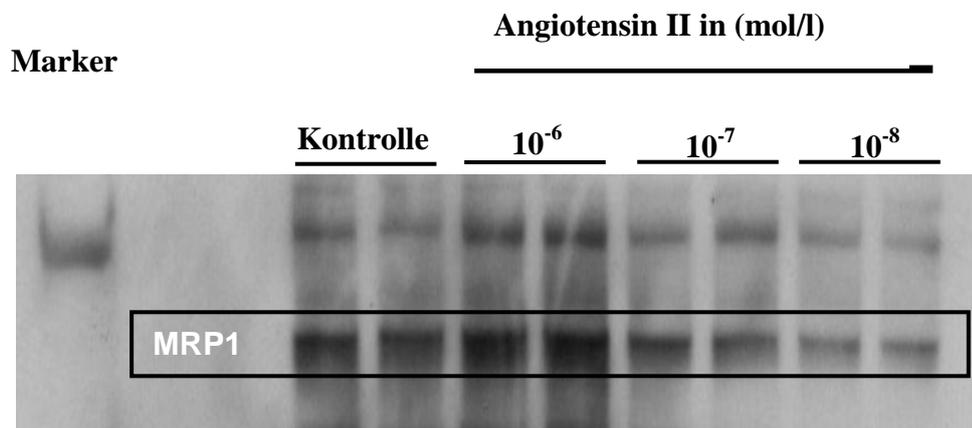


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Heraufregulation der MRP1 Expression in den VSMC unter Stimulation mit verschiedenen Angiotensin II Konzentrationen.

Für jede Konzentration gibt es eine doppelte Spur. Die Synthese des MRP1 in den behandelten VSMC korreliert mit den Konzentrationen des Angiotensin II. Angiotensin II Konzentration: 10^{-6} (mol/l), 10^{-7} (mol/l), 10^{-8} (mol/l).

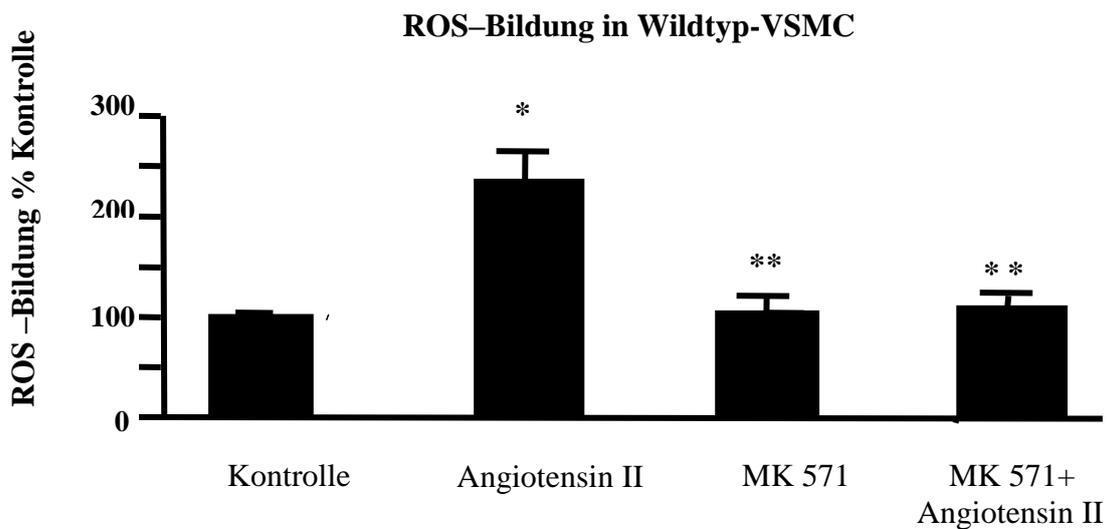
Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Inhibition von MRP1 die Generierung der durch Angiotensin II induzierten ROS beeinflusst, wurden konfluent gewachsene VSMC mit Angiotensin II (10^{-6} mol/l), MK 571 (pharmakologischer Inhibitor des MRP1) (5 μ mol/l) oder beiden Substanzen behandelt. Nach 12 h Inkubation wurde die Bildung von ROS mittels eines DCF-Fluoreszenz-Assay gemessen (s. Kap. 3.2.2.1)(Abb. 7 A).

Als Kontrolle dienten konfluent gewachsene VSMC, die für weitere 12 h im Kulturmedium inkubiert wurden (s. Kap. 3.2.1.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 7A in Prozent im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt. Die Behandlung mit Angiotensin II in den VSMC führte zu einer Zunahme der ROS-Bildung um 131 ± 28 %, während bei der Behandlung mit MK 571 die ROS-Bildung um 59 ± 5 % reduziert werden konnte. Zur Überprüfung der erhobenen Befunde erfolgte ein gleiches Experiment unter Verwendung von Maus-VSMC. Verglichen wurden MRP1 defiziente-VSMC mit den Wildtyp-VSMC (Abb. 7B).

MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC wurden hierzu mit Angiotensin II behandelt und anschließend wurde die ROS-Bildung gemessen. (s. Kap. 3.2.2.2) (Abb. 7B) Es zeigte sich analog zu den Experimenten unter Verwendung des pharmakologischen Inhibitors eine 79 ± 9 %ige Verminderung der ROS-Bildung in den mit Angiotensin II behandelten MRP1^{-/-}-VSMC im Vergleich zu Wildtyp-VSMC.

Zusammenfassend liess sich festhalten, dass die ROS-Bildung in den mit Angiotensin II vorbehandelten VSMC erheblich durch die Inhibition des MRP1 beeinflusst wurde. Die Ergebnisse deuteten daraufhin, dass das MRP1 in der Entstehung des durch Angiotensin II induzierten reaktiven oxidativen Stresses in den VSMC relevant beteiligt ist.

A



B

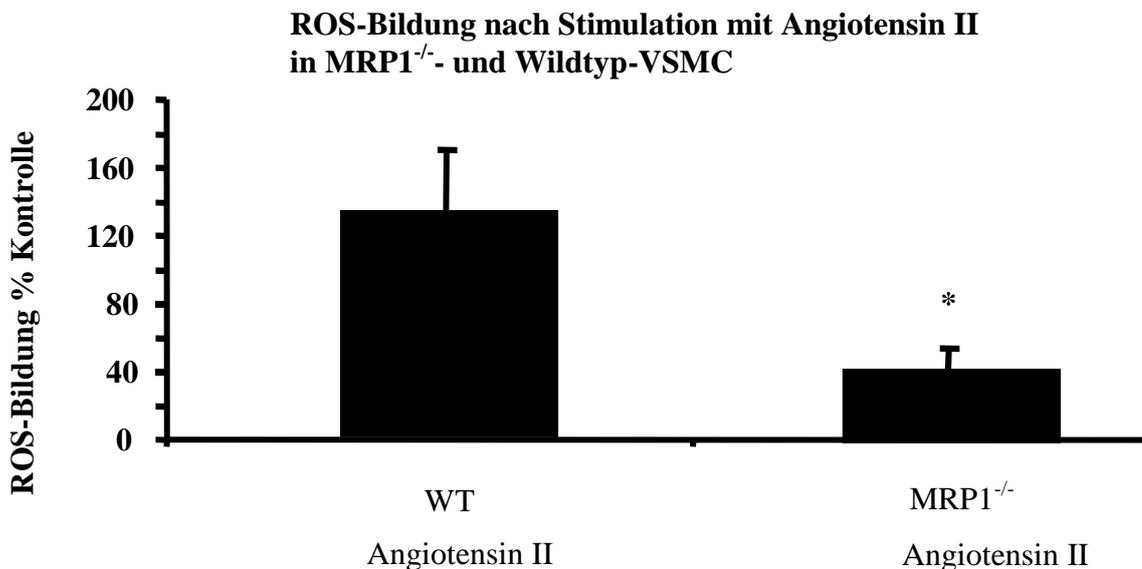


Abbildung 7: ROS-Bildung von VSMC unter Behandlung mit Angiotensin II

Die VSMC wurden mit Angiotensin II (10^{-6} mol/l), mit MK 571 ($5 \mu\text{mol/l}$) oder mit beiden Substanzen für 12 h inkubiert. Nach Stimulation wurde die ROS-Bildung mittels DCF-Fluoreszenz-Assay gemessen. **A:** Unbehandelte Kontrolle 100 ± 0 %, Angiotensin II 131 ± 28 %, MK 571 59 ± 5 %, Angiotensin II und MK 571 59 ± 5 %. ($n=4$; * $p < 0,05$ für Angiotensin II versus Kontrolle; ** $p < 0,05$ für MK571 und MK 571+Angiotensin II versus Kontrolle). **B:** Behandlung mit Angiotensin II in den MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC. In den MRP1^{-/-}-VSMC ist nach Angiotensin II-Behandlung die ROS-Bildung um 79 ± 9 % vermindert verglichen mit gleich behandelten Wildtyp-VSMC ($n=3$; * $p < 0,05$ für MRP1^{-/-}- versus Wildtyp- VSMC).

4.2 Die Wirkung von Angiotensin II auf die Freisetzung des LTC₄ in den MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC

Leukotriene sind Mediatoren der Entzündungsreaktion und spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Atherosklerose (Hansson 2005). Es wurde bereits nachgewiesen, dass Angiotensin II die Synthese des LTC₄ stimuliert (Nasjletti 1998). Das LTC₄ wirkt vasokonstriktiv über seinen spezifischen extrazellulären Membranrezeptor (Cys-LT1-Rezeptor). Der transmembranöse Transport des LTC₄ wird via MRP1 vermittelt.

Wir stellten die Hypothese auf, dass Angiotensin II in den VSMC zu einer Freisetzung des LTC₄ führt, dass LTC₄ via MRP1 aus der Zelle in den extrazellulären Raum transportiert wird und durch Bindung an den Cys-LT1-Rezeptor die ROS Generierung induziert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Konzentration von LTC₄ in kultivierten VSMC analysiert. Hierzu wurden MRP1^{-/-}- und Wildtyp-VSMC zuerst in einer 96-Loch-Kulturplatte kultiviert. Konfluente Zellrasen wurden mit Angiotensin II (10⁻⁶ mol/l) für 16 h behandelt. Die Konzentrationen von LTC₄ im Kulturmedium wurden mittels eines Leukotrien C4/D4/E4 Biotrak Assays und ELISA bestimmt (s. Kap. 3.2.4). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die ohne Angiotensin II ebenfalls 16 h inkubiert wurden (s. Abb. 8).

Die Applikation von Angiotensin II führte in den Wildtyp-VSMC zu einer Zunahme der LTC₄-Konzentration um 75 ± 5 % im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp-VSMC. Gleichzeitig blieb die Stimulation mittels Angiotensin II in MRP1^{-/-}-VSMC ohne Effekt auf die Freisetzung des LTC₄.

Zusammenfassend wurde in diesem Experiment festgestellt, dass Angiotensin II zur Freisetzung von LTC₄ in VSMC führte. Der Export des LTC₄ wurde über MRP1 vermittelt.

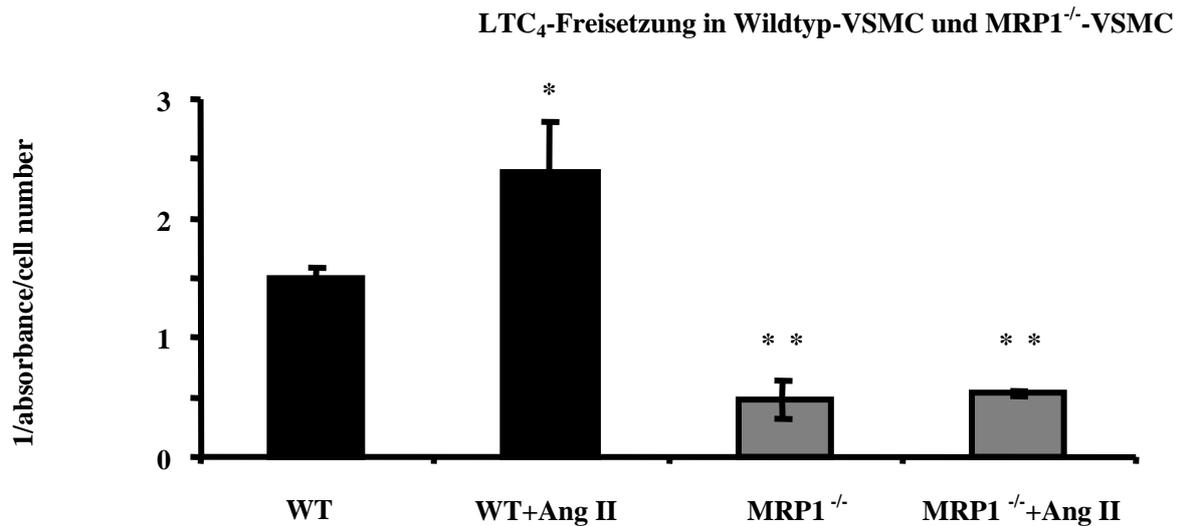


Abbildung 8: LTC₄-Freisetzung in Wildtyp- und MRP1^{-/-}-VSMC

Die konfluenten Wildtyp- und MRP1^{-/-}-VSMC wurden mit Angiotensin II (10⁻⁶ mmol/l) für 16 h behandelt oder 16 h ohne Behandlung weiter inkubiert. (n= 4; *p < 0,05, WT versus WT + Angiotensin II; ** p < 0,05, MRP1^{-/-} und MRP1^{-/-} +Angiotensin II versus WT).

4.3 Wirkung der MRP1 Inhibition und der Cys-LT1 Rezeptor Inhibition auf die Bildung von ROS in VSMC

Angiotensin II ist ein starker Stimulus für die ROS-Produktion in den VSMC und führt zur vermehrten Produktion von LTC₄, das via MRP1 in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. In den Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II zu einer relevanten Freisetzung von LTC₄ in VSMC führte. Nachfolgend sollte *in vitro* untersucht werden, ob

1. LTC₄ und Angiotensin II vergleichbar hohe Level an ROS in VSMC induzieren.
2. Die Inhibition von MRP1 und Cys-LT1 Rezeptor vergleichbare Effekte auf die ROS Generierung ausüben.

Konfluent gewachsene VSMC wurden mit LTC₄, Angiotensin II, MK 571 und Montelukast, einem pharmakologischen Cys-LT₁-Blocker, behandelt. Nach 12 h Inkubation wurde die Bildung von ROS mittels DCF-Messung bestimmt (s. Kap. 3.2.2.3)(Abb. 9A).

In den mit Angiotensin II (10⁻⁶ mol/l) und LTC₄ (10⁻⁶ mol/l) behandelten VSMC ergab sich erwartungsgemäß eine starke Freisetzung von ROS. Angiotensin II führte zu einer Zunahme der ROS-Bildung um 134 ± 30,4 %, und LTC₄ führte zu einer vergleichbar hohen Zunahme der ROS-Bildung um 107 ± 36,2 %. Die Stimulation mit MK571 allein hatte keinen Einfluss auf die ROS-Generierung. Zusätzliche Applikation von synthetischem LTC₄ führte trotz Stimulation mit MK 571 zu einem signifikanten Anstieg. Dies entsprach dem theoretisch zu erwartenden Ergebnis.

Die Ergebnisse deuteten daraufhin, dass LTC₄ via MRP1 in den extrazellulären Raum transportiert wird und anschließend zur vermehrten ROS-Bildung in den VSMC führt. Dieser Einfluss von synthetischem LTC₄ auf die ROS-Bildung konnte allein durch Gabe von Montelukast aber nicht durch Gabe von MK 571 gehemmt werden.

Danach wurde ein ähnliches Experiment mit den MRP1^{-/-}-VSMC durchgeführt, um unspezifische Effekte von MK 571 auszuschliessen (Abb. 9B). Die Behandlung mit LTC₄ führte zu einer signifikant erhöhten ROS-Produktion (LTC₄ 110 ± 21 %, Kontrolle 100 ± 0 %), während die Behandlung mit Angiotensin II keinen Effekt zeigte. Durch die Blockierung des Cys-LT-1 Rezeptors mit Montelukast konnte die Freisetzung von ROS auf das Niveau unbehandelter Kontrollzellen reduziert werden.

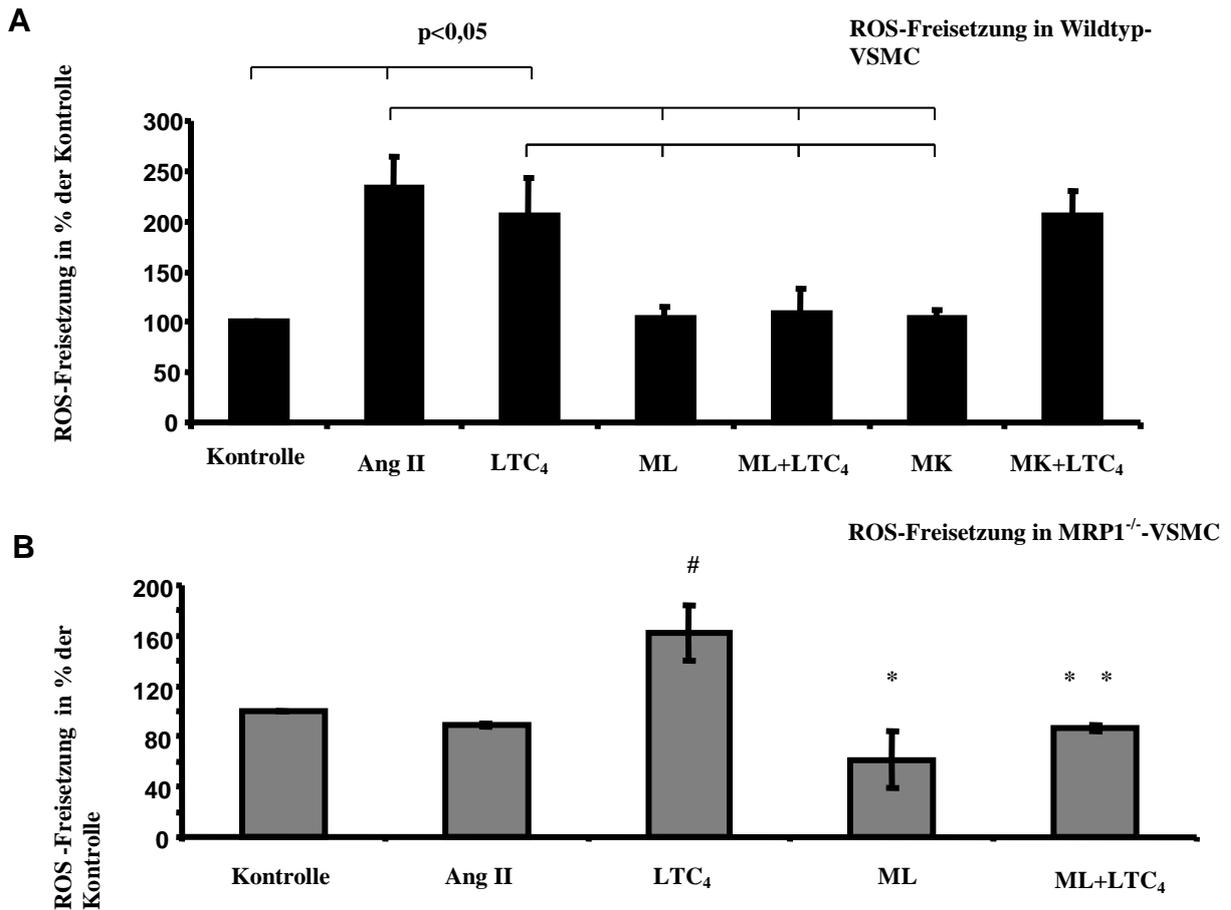


Abbildung 9: ROS-Freisetzung in Wildtyp- und MRP1^{-/-}-VSMC

A: Die Wildtyp-VSMC wurden für 12 h mit Angiotensin II (10^{-6} mol/l), LTC₄ (10^{-6} mol/l), MK 571 (MK) ($5 \mu\text{mol/l}$), Montelukast (ML) (10^{-6} mol/l), MK 571/LTC₄ und Montelukast/LTC₄ behandelt. Die ROS-Freisetzung wurde mittels DCF-Fluoreszenz gemessen ($n = 3-6$; $p < 0,05$, Angiotensin II und LTC₄ versus Kontrolle). **B:** Die MRP1^{-/-}-VSMC wurden für 12 h mit Angiotensin II (10^{-6} mol/l), LTC₄ (10^{-6} mol/l), Montelukast (ML) (10^{-6} mol/l), und Montelukast/LTC₄ behandelt ($n = 3-6$; * $p < 0,05$, ML versus LTC₄; ** $p < 0,05$, ML+LTC₄ versus LTC₄; # $p < 0,05$, Kontrolle versus LTC₄).

Zusammenfassend zeigte sich, dass Angiotensin II in VSMC zum MRP1 vermittelten Export von LTC₄ mit konsekutiver Bildung von ROS führte. Darüberhinaus wurde festgestellt, dass

der Anteil LTC₄ induzierter ROS offenbar einen ganz erheblichen Prozentsatz an der gesamten Angiotensin II induzierten ROS-Generierung ausmachte.

4.4 Wirkung der pharmakologischen Blockierungen des MRP1 und des Cys-LT1-Rezeptors auf die endotheliale Funktion und Atherosklerose in ApoE^{-/-}-Mäusen

Die *in vitro* gewonnen Befunde wurden im folgenden im *vivo* Model untersucht. Drei Monate alte ApoE^{-/-}-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) erhielten cholesterinreiches Futter und MK 571 (5 mg/kg/Tag), Montelukast (1 mg/kg/Tag) oder Placebo für sechs Wochen. Das cholesterinreiche Futter beinhaltete 21 % Fett, 19,5 % Kasein und 1,25 % Cholesterol. Im Anschluss wurden folgende Parameter analysiert:

1. Endotheliale Funktion
2. Atherosklerotische Läsionen im Aortensinus

Der pharmakologische Inhibitor des MRP1 (MK 571) und die Blockierung des Cys-LT1-Rezeptors (Montelukast) zeigten eine signifikante Verbesserung der endothelialen Funktion im Vergleich zur mit Placebo behandelten Kontrolle (s. Abb. 10). Die vom Endothel unabhängige Relaxation durch Nitroglycerin-Gabe blieb unverändert.

Weiterhin wurde die atherosklerotischen Läsionen in den Aortensinus analysiert (s. Abb. 11). Die Behandlung mit MK 571 verminderte die Größe der atherosklerotischen Läsionen (dargestellt durch Oil Red O Staining) um 52 ± 11 %. Die Behandlung mit Montelukast zeigte einen ähnlichen Effekt mit einer Reduktion um 61 ± 10 %.

Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl die pharmakologische Inhibition des Cys-LT1 Rezeptors als auch die pharmakologische Inhibition des MRP1 die Atherogenese in vergleichbarem Umfang reduzieren. Zugleich zeigten beide Therapien eine antioxidative Wirkung, die in einer verbesserten endothelialen Funktion resultierte.

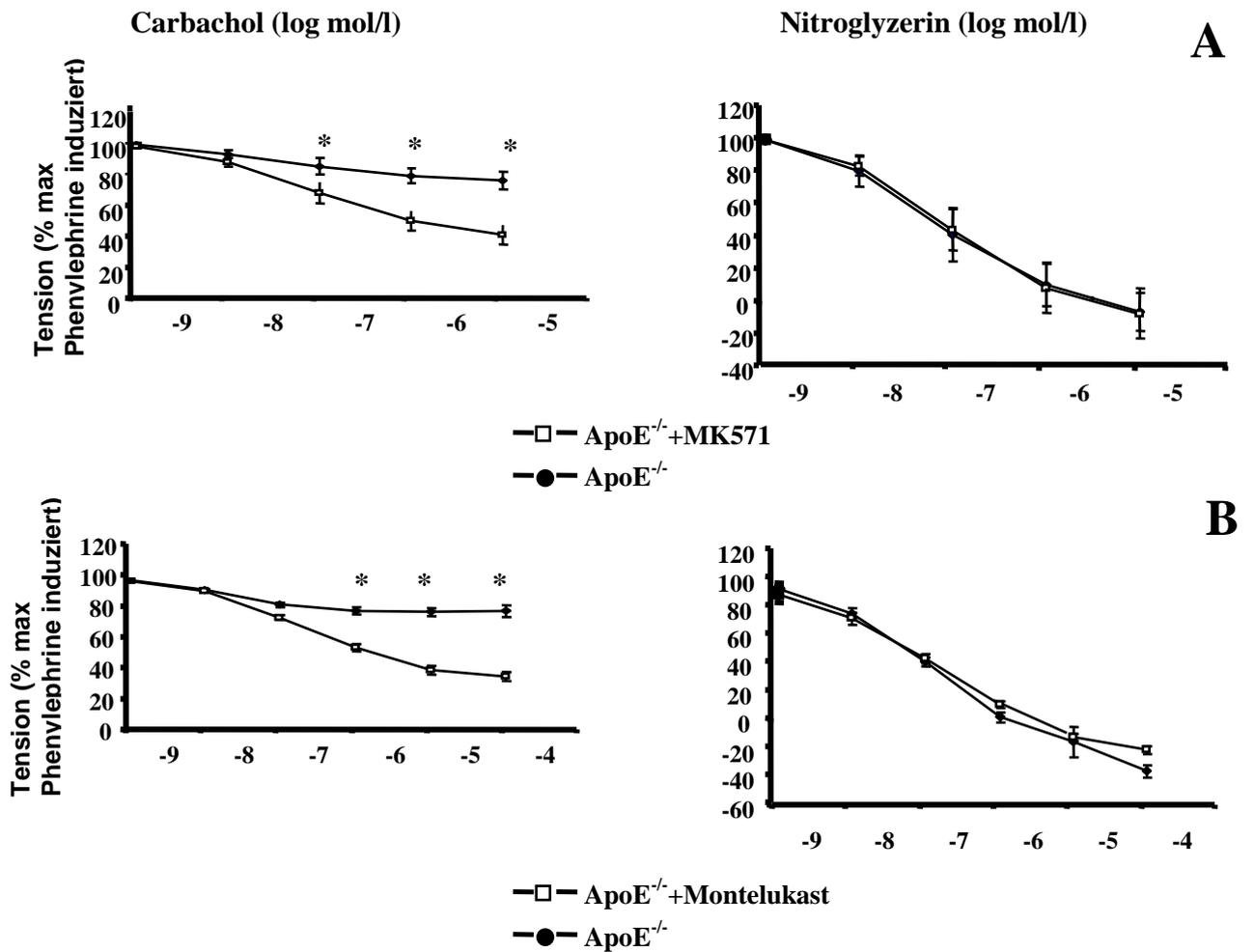


Abbildung 10: Endothel-abhängige Vasorelaxation von ApoE^{-/-}-Mäusen.

Drei Gruppen mit jeweils fünf Mäusen bekamen eine cholesterinreiche Diät für sechs Wochen. Eine Gruppe bekam MK 571 ins Trinkwasser (5 mg/kg/Tag). Eine andere Gruppe bekam Montelukast (1 mg/kg/Tag). Dann wurden die Mäuse präpariert, die Aorta entfernt und die endotheliale Funktion untersucht. Der pharmakologische Blocker des MRP1 (MK 571) und die Inhibition des Cys-LT1-Rezeptors (Montelukast) zeigten eine signifikante Verbesserung der endothelialen Funktion im Vergleich zur mit Placebo behandelten Kontrolle. Die vom Endothel unabhängige Relaxation (Nitroglycerin) blieb unverändert (n= 5; *p < 0,05).

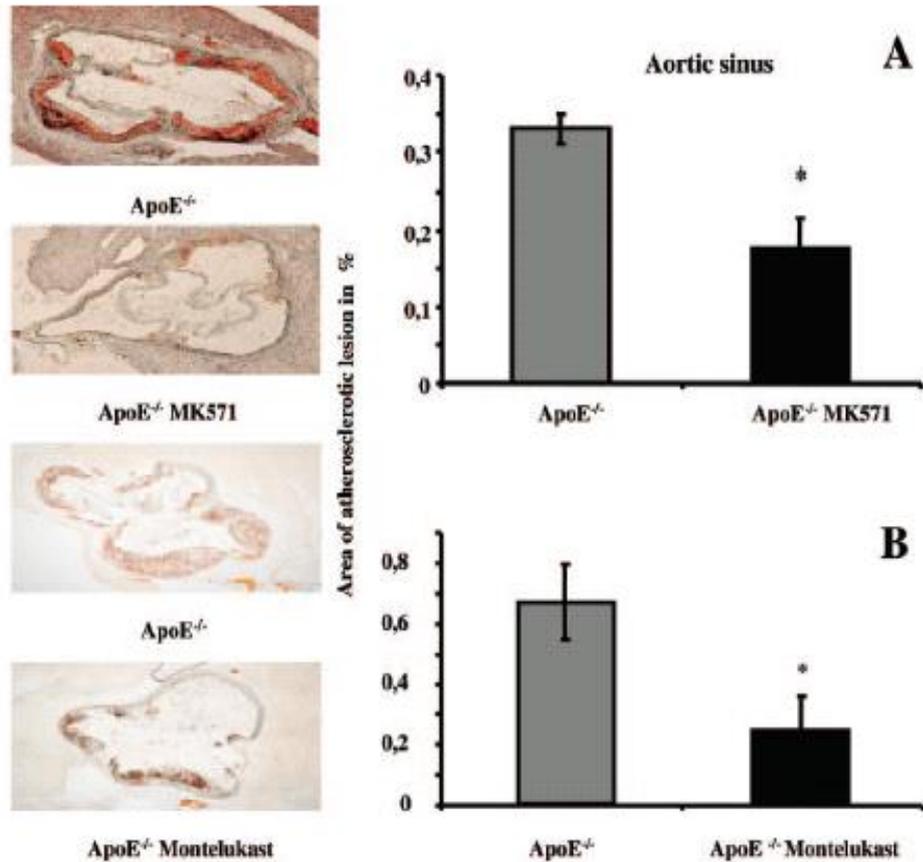


Abbildung 11: Analyse der atherosklerotischen Läsionen in dem Aortensinus

A. Die Behandlung mit MK 571 verminderte die Größe der atherosklerotischen Läsionen (gefärbt durch Oil Red O Staining) um 52 ± 11 %. **B.** Unter der Behandlung mit Montelukast zeigte sich ein ähnlicher Effekt mit einer Reduktion der atherosklerotischen Läsionen um 61 ± 10 % ($n=5$; $*p < 0,05$, ApoE^{-/-} +MK 571 versus ApoE^{-/-})

5. Diskussion

5.1 Bedeutung des MRP1 im Bezug auf Atherosklerose

In den letzten Jahren wurde MRP1 im Bereich der Resistenzentwicklung der Chemotherapeutika intensiv erforscht (Flens 1994, Kruh 2003). Die Rolle des MRP1 in der Atherosklerose blieb weiterhin unklar. Zu den MRP1-Substraten gehören reduziertes GSH, GSSG sowie LTC₄, die für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und die Entstehung der Atherosklerose eine Rolle spielten. Es konnte nachgewiesen werden, dass unter steigender Angiotensin II-Konzentration eine Heraufregulation der MRP1-Expression in VSMC resultierte. Diese ließ vermuten, dass MRP1 am Metabolismus der Angiotensin II induzierten ROS in VSMC beteiligt war. Die Funktion des MRP1 war daher von größtem Interesse für die Entstehung der Atherosklerose.

In der vorliegenden Arbeit konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die durch Angiotensin II induzierte ROS-Bildung in VSMC setzte die Anwesenheit von MRP1 voraus.
- Die durch Angiotensin II induzierte ROS-Bildung in VSMC stand in einem engen Zusammenhang mit der Angiotensin II induzierten LTC₄-Freisetzung.
- Die Inhibition des MRP1 hatte eine antioxidative und antiatheroklerotische Wirkung in VSMC.
- Die antioxidative Wirkung einer Blockierung von MRP1 in VSMC konnte in Verbindung mit einer Inhibition des LTC₄ gebracht werden.

Die antioxidative und antiatherosklerotische Wirkung der Inhibition von MRP1 oder von LTC₄ bieten somit einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von Atherosklerose an.

5.2 MRP1-Inhibition als antioxidativer Mechanismus

Unter oxidativem Stress exportieren Astrozyten über MRP1 das GSH-Dimer (GSSG), um das intrazelluläre Redoxpotential aufrechtzuerhalten (Dringen 1999). Eine MRP1-Inhibition verhindert den GSSG-Export und hatte eine antioxidative Wirkung zur Folge. Der Export von

GSSG unter oxidativem Stress wurde ebenfalls in Endothelzellen beobachtet. Eine MRP1-Inhibition in Endothelzellen zeigte eine signifikante Verbesserung des intrazellulären Redoxpotentials und eine verminderte Apoptose der Endothelzellen (Müller et al. 2005). Eine antioxidative Wirkung der MRP1-Inhibition wurde auch in Makrophagen (Leite 2007, Watts 2006) und in endothelialen Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells, Abkürzung EPC) (Müller et al. 2010) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den VSMC die MRP1-Inhibition ebenfalls eine antioxidative Wirkung generierte. Eine mögliche Erklärung schien, dass das intrazellulär akkumulierte GSSG durch Aktivierung der Glutathion-Reduktase in GSH umgewandelt wurde. Eine Folge davon war eine Reduktion der ROS-Bildung. Die Umwandlung von GSSG in GSH unter oxidativem Stress konnte bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden (Müller et al. 2005a). Pathophysiologisch müssen also andere Mechanismen zum Tragen kommen, die die antioxidative Wirkung des MRP1 erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass unter ROS-Exposition vermehrt LTC₄ in den VSMC produziert wurde. Der Export des LTC₄ erfolgte über MRP1. Eine Nicht-Expression von MRP1 hatte eine deutlich erniedrigte LTC₄-Freisetzung in den VSMC zur Folge, was letztlich in einer Verminderung der ROS-Freisetzung in VSMC resultierte. Die antioxidative Wirkung der MRP1-Inhibition konnte also auf die Inhibition der LTC₄-Freisetzung zurückzuführen sein.

5.3 Die Bedeutung des LTC₄ in den VSMC

Leukotriene sind Stoffwechselprodukte des Arachidonsäurestoffwechsels und vermitteln Entzündungsreaktionen im Körper. Das Schlüsselenzym der Leukotrien-Bildung ist die 5-Lipoxygenase. Dass Leukotriene, insbesondere LTC₄, LTB₄, und 5-Lipoxygenase an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind und Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt darstellen, wurde hinreichend publiziert (Funk 2005, Qiu et al. 2006, Helgadottir et al. 2004, Spanbroek et al. 2003).

LTC₄ als cysteinylhaltiges Leukotrien kann eine starke Vasokonstriktion für Koronargefäß hervorrufen. Bei Patienten, die unter koronarer Herzerkrankung leiden, wurde vermehrt die Produktion von cysteinylhaltigen Leukotrienen beobachtet (Allen 1998, Carry 1992). Im Tiermodell verursacht LTC₄ eine Kontraktion der Koronargefäße. Dieser Effekt konnte durch Gabe von Antagonisten des Cys-LT1-Rezeptors gehemmt werden (Allen 1998, Bäck 2007). Im menschlichen Bauchaortenaneurysma wurde eine erhöhte Menge an Leukotrien C₄-

Synthetase beobachtet (Di Gennaro 2010). LTC₄ ist ein wichtiger Mediator der inflammatorischen Reaktion im respiratorischen Trakt und unter anderem auch an der Entstehung des Asthmas beteiligt (Balzano et al. 2002). LTC₄ entsteht aus LTA₄ und Glutathion und erhöht die Kapillarpermeabilität, die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen und die Freisetzung von ROS (Funk 2001). Das intrazellulär produzierte LTC₄ muss zuerst in den extrazellulären Raum transportiert werden, damit es an seinen spezifischen Cys-LT1-Rezeptor binden kann. Als Transportprotein des LTC₄ in Hela-Zellen wurde MRP1 identifiziert. (Leier 1994, Loe 1996). Während der inflammatorischen Reaktion bei Erkrankungen wie beispielweise Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, exportiert MRP1 LTC₄ aus den Endothelzellen (Blokzijl et. al 2008). LTC₄ zeigt eine hohe Affinität zu MRP1. Unter unterschiedlichen Stimuli wird LTC₄ hauptsächlich von Makrophagen freigesetzt (Funk 2005). Neben Leukozyten können vaskuläre Zellen wie beispielweise VSMC und Endothelzellen ebenfalls Leukotriene sezernieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass LTC₄ in VSMC zu einer erhöhten ROS-Bildung führte, vergleichbar mit der Zunahme nach einer Angiotensin II-Behandlung. Auch bei einer Blockierung des MRP1 durch MK 571 oder bei einer Nichtexpression von MRP1 (MRP1^{-/-}-VSMC) konnte LTC₄ die ROS-Bildung in den VSMC steigern. Die LTC₄ induzierte ROS-Bildung in VSMC konnte durch Gabe eines spezifischen Blockers des Cys-LT1-Rezeptors (Montelukast) reduziert werden. In dieser Arbeit wurde erstmals dargestellt, dass MRP1 als ein Transportprotein für Angiotensin II induziertes LTC₄ in VSMC diente, was letztlich zur erhöhten ROS-Freisetzung führte. Eine MRP1-Inhibition oder Nicht-Expression von MRP1 hatten eine verminderte LTC₄-Freisetzung und anschließend eine Reduktion der ROS zur Folge. Im Tiermodell zeigte eine Blockierung des LTC₄ durch Gabe von Montelukast eine verbesserte Endothelfunktion und eine verminderte atherosklerotische Läsion. Die MRP1-Inhibition im Tiermodell zeigte einen vergleichbaren Effekt, weshalb die antioxidative Wirkung der MRP1-Inhibition mit einer Inhibition des LTC₄ in Verbindung gebracht werden kann.

Neben LTC₄ spielte LTB₄ ebenfalls eine wichtige Rolle für vaskuläre Erkrankungen. LTB₄ ist ein nicht-cysteinylhaltiges Leukotrien und entsteht aus LTA₄ durch die Wirkung von LTA₄-Hydroxylase. LTB₄ bindet an den BLT1-Rezeptor und induziert eine Leukozytenaggregation im vaskulären Endothelium und aktiviert dadurch CD 8+ zytotoxische T-Lymphozyten (Gimbrone 1984, Goodarzi 2003). Bei fehlendem BLT1-Rezeptor oder durch Gabe von LTB₄-Antagonisten wurde eine Verminderung der Makrophagenaggregation und der atherosklerotischen Läsion beobachtet (Aiello 2002, Heller 2005, Subbarao 2004). Der transmembranöse Transport des LTB₄ erfolgt via MRP4 in Thrombozyten (Rius 2008). Ob

sich die antiatherosklerotische Wirkung des LTB₄ ebenfalls durch MRP4-Inhibition erklären lässt, ist noch unklar.

5.4 Die Bedeutung der Interaktion von LTC₄ und Angiotensin II in den VSMC

Angiotensin II-Gabe führte in VSMC zur Freisetzung von LTC₄ (Luchtefeld et al. 2003 und Stanke-Labesque et al. 2001). Die Befunde in dieser Arbeit konnten die publizierten Ergebnissen bestätigen. Es konnte jetzt erstmals gezeigt werden, dass Angiotensin II zu einem über MRP1 vermittelten Leukotrien C₄-Export beiträgt und somit die vermehrte ROS-Bildung in VSMC bewirkt. Im Vergleich zu Wildtyp-VSMC exportierten MRP1^{-/-}-VSMC weniger LTC₄. Unter Gabe von Angiotensin II in MRP1^{-/-}-VSMC zeigte sich keine Zunahme der LTC₄-Konzentration, während die Gabe von Angiotensin II in Wildtyp-VSMC eine deutliche Zunahme der LTC₄-Konzentration um 75 ± 15 % ergab. Diese ROS-Bildung konnte durch Gabe von Cys-LT1-Rezeptor-Inhibitor (Montelukast) gehemmt werden. Interessant war auch, dass sich zum Großteil der Angiotensin II induzierte ROS-Anstieg auf den LTC₄ induzierten ROS-Anstieg zurückführen ist. Dies weist darauf hin, dass über MRP1 exportiertes LTC₄ eine Schlüsselrolle für Angiotensin II induzierte ROS in VSMC spielt und dies könnte auch erklären, warum eine Inhibition des Cys-LT1-Rezeptors einen vergleichbaren Effekt wie die Inhibition des MRP1 *in vivo* hatte. Angiotensin II spielte auch eine Schlüsselrolle im Renin-Angiotensin-System, den es regulierte nicht nur den Blutdruck, sondern regulierte auch die Freisetzung von Cytokinen und die dadurch entstehenden inflammatorischen Folgereaktionen. Die Hemmung der Angiotensin II-Effekte durch Gabe von AT1-Rezeptor-Blocker oder ACE-Hemmer wird zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt. AT1-Rezeptor-Blocker und ACE-Hemmer hemmen sowohl den Blutdruck, als auch die Angiotensin II induzierten inflammatorischen Reaktionen. Shindo et al. demonstrierten, das Captopril, ein ACE-Hemmer, die Synthese der Leukotriene hemmt (Shindo et al. 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die über Angiotensin II induzierten inflammatorischen Reaktionen in Verbindung mit Angiotensin II induzierter Leukotrien-Freisetzung steht. Es ist also möglich, dass die kardioprotektive Wirkung von ACE-Hemmern auf der Hemmung der Leukotrien-Freisetzung und der anschließend entstehenden ROS-Produktion beruht.

In MRP1^{-/-}-VSMC konnte Angiotensin II weder eine LTC₄- noch eine ROS-Bildung induzieren. Die Blockierung von MRP1 und des LTC₄ hatten sowohl eine ähnlich antioxidative Wirkung als auch einen vergleichbaren antiatherosklerotischen Effekt. Eine

mögliche Interpretation dieser Befunde ist, dass eine Voraussetzung für eine Angiotensin II induzierte ROS-Bildung der Export von LTC₄ durch MRP1 sein muss. Die LTC₄ vermittelte ROS-Bildung, war - wie schon erwähnt - eine physiologische Reaktion nach Angiotensin II-Stimulation in den VSMC. LTC₄ wurde über MRP1 in den extrazellulären Raum exportiert. Dort band LTC₄ an den Cys-LT₁-Rezeptor. Dieser Aktion führte zur zusätzlichen Bildung von ROS und zur vermehrten Generierung von LTC₄. In den menschlichen glatten Muskelzellen des respiratorischen Trakts induziert LTC₄ die ROS-Bildung via EGF-Rezeptor und ERK1/2-Phosphorylation (Ravasi et al. 2006). Unsere Ergebnisse wiesen darauf hin, dass LTC₄ in VSMC ebenfalls zur ROS-Bildung führt und verantwortlich für die durch Angiotensin II induzierten inflammatorischen Reaktionen ist.

Neben VSMC können auch Makrophagen LTC₄ generieren. Makrophagen und glatte Muskelzellen sind wichtig für die Entstehung von ROS und für das Wachstum atherosklerotischer Läsionen. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass LTC₄ in glatten Muskelzellen die ROS-Bildung induziert. In vivo produzierten Makrophagen die meisten ROS (Stanke-Labesque et al. 2002 und Funk 2001). Es ist denkbar, dass LTC₄ ebenfalls in Makrophagen ROS-Bildung induziert. Vermutlich trägt LTC₄ in Makrophagen sowohl zur ROS-Bildung als auch zur anschließenden inflammatorischen Reaktion bei. Die Mitwirkung der Makrophagen und glatten Muskelzellen auf LTC₄-Freisetzung hat möglicherweise eine besondere Stellung für das Vorhersagen des atherosklerotischen Plaqueswachstums.

Durch die Blockierung von MRP1 (MK 571), die sekundär die Freisetzung von LTC₄ hemmte, und durch eine Blockade der von LTC₄ vermittelten Effekte (mittels Montelukast) konnte die von Angiotensin II induzierte ROS-Bildung in VSMC verhindert werden und ein vasoprotektiver Effekt in ApoE^{-/-}-Mäusen erreicht werden. Montelukast band an Cys-LT₁-Rezeptoren im respiratorischen Trakt (Balzano et al. 2002). Schließlich wurde die Wirkung der Leukotriene hinsichtlich Verstärkung von Entzündungsvorgängen und vermehrter Schleimsekretion unterbunden. Montelukast wird deshalb in der Asthma-Therapie eingesetzt. Atherosklerose entsteht ebenfalls durch eine Reihe der vaskulären inflammatorischen Reaktionen. Vermutlich kann Montelukast diese Befunden zufolge potential für die Therapie der Atherosklerose interessant sein. Diesbezüglich wären jedoch weitere Untersuchungen im Tiermodell notwendig.

5.5 Ausblick

Die vaskuläre protektive Wirkung der MRP1-Inhibition wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen könnten weitere Experimente durchgeführt werden, die die Auswirkung der über Angiotensin II vermittelten LTC₄-Freisetzung auf die Apoptose und die Proliferation von VSMC *in vivo* und *in vitro* untersuchen. Weiterhin sollte überprüft werden, wie eine Herabregulation des MRP1 die LTC₄-Freisetzung und die ROS-Bildung moduliert.

Die Expression von MRP1 in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen von Patienten, die unter ischämischer Kardiomyopathie leiden, wäre ein weiterer interessanter Parameter. Parallel dazu müßte natürlich die Serumkonzentration von Leukotrien C₄ bestimmt werden, um eine Korrelation zu zeigen.

Die Blockierung des MRP1 durch Applikation von MK 571 wurde experimentell *in vivo* und *in vitro* untersucht, aber ein Arzneimittel aus der Substanz MK 571 wurde bisher noch nicht entwickelt. Montelukast hat eine ähnliche chemische Struktur wie MK 571. Darüber hinaus zeigte Montelukast in Endothelzellen eine vergleichbare MRP2-Inhibitions-Wirkung (Roy et al. 2009). Montelukast wurde bereits, im Gegensatz zu MK 571 zur klinischen Therapie des Asthma eingesetzt und es konnte eine verbesserte Lungenfunktion und eine verminderte bronchiale Hyperaktivität bei Kindern mit Asthma beobachtet werden (Jarvis und Markham 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Montelukast eine antioxidative und antiatherosklerotische Wirkung *in vitro* und *in vivo* hat. Es existiert bereits eine Idee, wie man klinisch, aufbauend auf unsere Erkenntnisse, prüfen kann, welche Effekte Montelukast auf das menschliche kardiovaskuläre System hat. In randomisierten Studien könnten Probanden in 2 Gruppen geteilt werden. Eine Gruppe bekäme Placebo, die andere Gruppe Montelukast. Sechs Monate später könnte dann der Blutdruck mittels Blutdruckmanschetten in den Armen, Dopplerindex der Knöchel und Arme, die endotheliale Funktion mittels Ultraschall sowie die Konzentration der Leukotriene im Blut ermittelt und ausgewertet werden. Zusätzlich wäre eine ähnliche Studie mit Patienten, die unter koronarer Herzerkrankung leiden, zu erwägen. Diese Gruppeneinteilung verlief ebenfalls doppelblind. Primäre Endpunkte könnten vaskuläre Ereignisse wie beispielweise Herzinfarkt, Apoplex und unerwünschte Nebenwirkungen sein. Die erhaltenen Befunde würden vermutlich noch mehr zur Klärung der Rolle von MRP1 in der Entstehung der Atherosklerose beitragen und würden vielleicht einen neuen therapeutischen Ansatz ermöglichen .

6. Literaturverzeichnis

1. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ.(2002) Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:443
2. Allen RG, Tresini M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28(3): 463-99.
3. Allen S, Dashwood M, Morrison K, Yacoub M. (1998) Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation.* 97(24):2406-13.
4. Bäck M. (2007) Leukotriene receptors: crucial components in vascular inflammation. *The Scientific World Journal.* 7: 1422-39.
5. Bakos E, Hegedüs T, Holló Z, Welker E, Tusnády GE, Zaman GJ, Flens MJ, Váradi A, Sarkadi B. (1996) Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem.* 271(21): 12322-6.
6. Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. (2005) Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol.* 204(3): 238-55.
7. Balzano G, Fuschillo S, Gaudiosi C. (2002) Leukotriene receptor antagonists in the treatment of asthma: an update. *Allergy.* 57: 16–19.
8. Blokzijl H, van Steenpaal A, Vander Borghst S, Bok LI, Libbrecht L, Tamminga M, Geuken M, Roskams TA, Dijkstra G, Moshage H, Jansen PL, Faber KN. (2008) Up-regulation and cytoprotective role of epithelial multidrug resistance-associated protein 1 in inflammatory bowel disease. *J Biol Chem.* 283(51):35630-7.
9. Cai H, Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87: 840-4.
10. Carry M, Korley V, Willerson JT, Weigelt L, Ford-Hutchinson AW, Tagari P. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation.* 85(1):230-6.
11. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59:1-61.

12. Corte ED, Stripe F. (1972) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Bioche J.* 126(3): 739-45
13. Di Gennaro A, Wågsäter D, Mäyränpää MI, Gabrielsen A, Swedenborg J, Hamsten A, Samuelsson B, Eriksson P, Haeggström JZ. (2010) Increased expression of leukotriene C4 synthase and predominant formation of cysteinyl-leukotrienes in human abdominal aortic aneurysm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(49):21093-7.
14. Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B. (1999) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem.* 72: 2523-30.
15. Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL, Fritz JM, Meijer CJ, Scheper RJ, Zaman GJ. (1994) Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 54(17): 4557-63.
16. Fosslie E. (2003) Review: Mitochondrial medicine-cardiomyopathy caused by defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sc.* 33: 371-95
17. Fridel HP, Till GO, Ryan US, Ward PA. (1989) Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *FASEB J.* 3(13): 2512-8
18. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. (2002) Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 55: 239-49.
19. Funk CD. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 294; 1871-5.
20. Funk CD. (2005) Leukotriene modifiers as potential therapeutics of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 4:664-672
21. Gimbrone MA Jr, Brock AF, Schafer AI. (1984) Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 74(4):1552-5.
22. Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, von Andrian UH. (2003) Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat Immunol.* 4(10):965-73.
23. Griending KK, Harrison DG. (1999) Dual Role of Reactive Oxygen Species in Vascular Growth. *Circ. Res.* 85; 562-563

24. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 74: 1141-8.
25. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 2175-83.
26. Halliwell B. (1993) The Role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis.* 23: 118-26.
27. Hansson GK. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352(16): 1685-95.
28. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. (2004) The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 36(3):233-9.
29. Heller EA, Liu E, Tager AM, Sinha S, Roberts JD, Koehn SL, Libby P, Aikawa ER, Chen JQ, Huang P, Freeman MW, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. (2005) Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation.* 112(4):578-86.
30. Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG, Cole SP. (1997) Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *Biol Chem.* 272(38): 23623-30.
31. Jarvis B, Markham A. (2000) Montelukast: A Review of its Therapeutic Potential in Persistent Asthma. *Drugs.* 59(4):891-928
32. Kast C and Gros P. (1997) Topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. *J. Biol. Chem.* 272: 26479-87.
33. Kruh GD, Belinsky MG. (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 22: 7537-52.

34. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 111: 1201-9.
35. Leite DF, Echevarria-Lima J, Calixto JB, Rumjanek VM. (2007) Multidrug resistance related protein (ABCC1) and its role on nitrite production by the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 73(5):665-74.
36. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem.* 269(45): 27807-10.
37. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. (2001) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology.* 167: 3-23
38. Lisovyy OO, Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovska LV, Korol MO, Surova OV, Moibenko OO. (2009) Cardioprotective effect of 5-lipoxygenase gene (ALOX5) silencing in ischemia-reperfusion. *Acta Biochim Pol.* 56(4): 687-94.
39. Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SP. (1996) Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem.* 271(16):9675-82.
40. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-75.
41. Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer M. (2003) 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD(P)H-oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 308: 668–72.
42. Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. (2005) Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost* 3: 254–67.
43. Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ. (2002) Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ. Res.* 91: 120-126.
44. Müller C, Widder J, McNally J, McCann L, Jones DP, Harrison DG. (2005a) The role of the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1) in Modulation of Endothelial Cell Oxidative Stress. *Circ Res.* 97(7): 637-44.
45. Müller CF, Laude K, McNally S, Harrison DG. (2005b) Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 274-278

46. Mueller CF, Afzal S, Becher UM, Wassmann S, Nickenig G, Wassmann K. (2010) Role of the multidrug resistance protein-1 (MRP1) for endothelial progenitor cell function and survival. *J Mol Cell Cardiol.* 49(3):482-9.
47. Müller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL. (1994) Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26): 13033-7.
48. Nageswara R, Madamanchi, Aleksandr Vendrov, Marschall S. Runge. (2005) Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 29-38.
49. Nasjletti A. (1998) The role of eicosanoids in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 31: 194–200.
50. Peters-Golden M, Henderson WR Jr. (2007) Leukotrienes. *N Engl J Med.* 357: 1841–54.
51. Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, Wan M, Wetterholm A, Wong CH, Hedin U, Swedenborg J, Hansson GK, Samuelsson B, Paulsson-Berne G, Haeggström JZ. (2006) Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(21):8161-6.
52. Ravasi S, Citro S, Viviani B, Capra V, Rovati GE (2006) CysLT1 receptor- induced human airway smooth muscle cells proliferation requires ROS generation, EGF receptor transactivation and ERK1/2 phosphorylation. *Respir Res* 7:42
53. Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D (2008) ATP-Dependent Transport of Leukotrienes B4 and C4 by the Multidrug Resistance Protein ABCC4 (MRP4). *J Pharmacol Exp Ther.* 324 (1):86-94.
54. Ross R. (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med.* 340: 115-26.
55. Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 362: 801-9.
56. Roy U, Chakravarty G, Honer Zu Bentrup K, Mondal D. (2009) Montelukast is a potent and durable inhibitor of multidrug resistance protein 2-mediated efflux of taxol and saquinavir. *Biol Pharm Bull.* 32(12):2002-9.
57. Sakuma S, Fujimoto Y, Sakamoto Y, Uchiyama T, Yoshioka K, Nishida H, Fujita T. (1997) Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 230:476–9.

58. Shindo K, Baker JR, Munafo DA, Bigby TD. (1994) Captopril inhibits neutrophil synthesis of leukotriene B4 in vitro and in vivo. *J Immunol.* 153(12):5750-9.
59. Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, Hildner M, Urbach A, Ruhling K, Moos MP, Kaiser B, Cohnert TU, Wahlers T, Zieske A, Plenz G, Robenek H, Salbach P, Kuhn H, Radmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. (2003) Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3): 1238-43.
60. Stanke-Labesque F, Devillier P, Veitl S, Caron F, Cracowski JL, Bessard G. (2001) Cysteinyl leukotrienes are involved in angiotensin II-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 49(1): 152-60.
61. Statistisches Bundesamt. (2012) Todesursachen in Deutschland 2008. Statistisches Bundesamt, Fachserie 12 Reihe 4
62. Subbarao K, Jala VR, Mathis S, Suttles J, Zacharias W, Ahamed J, Ali H, Tseng MT, Haribabu B. (2004) Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:369 –375.
63. Touyz RM. (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 37(8): 1263-73.
64. Vasquez-Vivar J, Duquaine D, Whitsett J, Kalyanaraman B, Rajagopalan S. (2002) Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22: 1655-16
65. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44(4): 381-6.
66. Watts RN, Hawkins C, Ponka P, Richardson DR. (2006) Nitrogen monoxide (NO)-mediated iron release from cells is linked to NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(20):7670-5.
67. Widder JD, Guzik TJ, Mueller CFH, Clempus RE, Schmidt HH, Dikalov SI, Griendling KK, Jones DP, Harrison DG. (2007) Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 762-8
68. Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, Borst P. (1997) Increased sensitivity to anticancer

drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med.* 3(11): 1275-9.

7. Publikationen

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit ist folgende Publikation entstanden:

1. Mueller CF, Becher MU, Zimmer S, Wassmann S, Keuler B, Nickenig G. (2010) Angiotensin II triggers release of leukotriene C4 in vascular smooth muscle cells via the multidrug resistance-related protein 1. *Mol Cell Biochem.* 333(1-2):261-7
2. Mueller CF, Wassmann K, Widder JD, Wassmann S, Chen CH, Keuler B, Kudin A, Kunz WS, Nickenig G (2008) Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C4 export. [Circulation.](#) 117(22):2912-8