

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Die Rolle des  
Multidrug Resistance Associated Protein-1  
bei der Tumornekrosefaktor- $\alpha$   
vermittelten Apoptose in  
Endothelzellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians Universität Würzburg

vorgelegt von

**Christian Krümpel**

aus Gaibach

Würzburg, Juni 2013



## Referentenblatt

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Julian Widder

**Korreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Carola Förster

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 21.März 2014

**Der Promovend ist Arzt**

**Meinen Eltern und Großeltern  
gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

## **I. Einleitung** **1**

1.	<b>Endotheliale Dysfunktion und die Rolle des Tumor-Nekrose-Faktor-<math>\alpha</math></b>	1
2.	<b>Reaktive Sauerstoffspezies</b>	2
2.1	Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	4
2.1.1	NAD(P)H-Oxidase	5
2.1.2	Xanthin-Oxidase	5
2.1.3	NO-Synthase	6
2.1.4	Mitochondriale Atmungskette	7
2.2	Zelluläre Mechanismen zur Protektion gegenüber ROS	8
2.2.1	Superoxiddismutase	8
2.2.2	Katalase	8
2.2.3	Glutathion Redoxzyklus	9
3.	<b>Apoptose</b>	11
3.1	Die Biologie des programmierten Zelltods	11
3.2	Signalwege	12
3.2.1	Der rezeptorvermittelte / extrinsische Signalweg (z.B. TNF-R1)	12
3.2.2	Der mitochondriale / intrinsische Signalweg	15
3.2.3	Die Caspase-Kaskade	16
3.3	Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei Apoptose	16
4.	<b>Das Multidrug Resistance Associated Protein-1 (MRP-1)</b>	18
5.	<b>Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	20

## **II. Material** **22**

1.	<b>Chemikalien, Reagenzien, Standards und Zellkulturmaterial</b>	22
2.	<b>Puffer und Lösungen</b>	23
3.	<b>Antikörper</b>	25
4.	<b>siRNA</b>	26
5.	<b>Zelllinien</b>	26
6.	<b>Geräte und Verbrauchsmaterial</b>	26
7.	<b>Software</b>	27

## III. Methoden 28

1.	<b>Zellkultur</b>	28
1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen (HAEC)	28
1.2	RNA-Interferenz	28
1.2.1	Transfektion der HAEC mit MRP-1 siRNA und Negative Silencer siRNA	30
1.3	Applikation von N-Acetylcystein	30
1.4	Applikation von TNF- $\alpha$ und Cycloheximid	31
1.5	Gewinnung der Zellproben (Zellernte)	31
1.5.1	Zellproben für den Western-Blot	31
1.5.2	Zellproben für die HPLC-Analyse	32
1.5.3	Zellproben für die FACS-Analyse (Annexin-V-Fluorescein Analyse)	33
2.	<b>Proteinbestimmung nach Bradford</b>	33
3.	<b>Western-Blot</b>	34
3.1	SDS-PAGE	34
3.2	Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran	35
3.3	Immunofärbung und Peroxidasenachweis	35
3.4	Graphische Auswertung des Western-Blots	36
4.	<b>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</b>	37
4.1	Funktionsweise und Aufbau des HPLC-Systems	37
4.2	Die Messung von Superoxidanionen mittels Dihydroethidium (DHE)	39
4.3	Elektrochemische Detektion und graphische Auswertung	40
5.	<b>Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)</b>	42
5.1	Durchflusszytometrische Messung der Phosphatidylserin-Exposition (Annexin-V-Fluorescein Analyse)	43
5.2	Auswertung der FACS-Analyse	43
6.	<b>Statistische Auswertung</b>	44

## IV. Ergebnisse 45

1.	<b>Überprüfung der Transfektionseffizienz</b>	45
2.	<b>Der Effekt von MRP-1 siRNA und TNF-<math>\alpha</math>/CHX auf die Apoptoserate von humanen aortalen Endothelzellen</b>	46
2.1	FACS-Analyse der Phosphatidylserin-Exposition mittels Annexin-V-Fluorescein Färbung	46
2.2	Western-Blot Analyse der Caspase-3 Spaltungsrate	48

3.	Der Effekt von N-Acetylcystein und TNF- $\alpha$ /CHX auf die Caspase-3 Spaltungsrate (Western-Blot Analyse)	50
4.	Der Effekt von MRP-1 siRNA und TNF- $\alpha$ /CHX auf die intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration (DHE-HPLC)	52
5.	Der Einfluss von MRP-1 siRNA und TNF- $\alpha$ /CHX auf ausgewählte Proteine der TNF-R1 Signalkaskade	54
5.1	Western-Blot Analyse der FADD Phosphorylierungsrate	54
5.2	Western-Blot Analyse der Caspase-8 Spaltungsrate	55
5.3	Western-Blot Analyse der Caspase-7 Spaltungsrate	57
5.4	Western-Blot Analyse der P38 MAPK Phosphorylierungsrate	59
5.5	Western-Blot Analyse der SAPK/JNK Phosphorylierungsrate	60

## **V. Diskussion** **62**

## **VI. Zusammenfassung** **75**

## **VII. Abbildungen, Tabellen, Abkürzungen, Literatur** **78**

1.	Abbildungsverzeichnis	78
2.	Tabellenverzeichnis	79
3.	Abkürzungsverzeichnis	80
4.	Literaturverzeichnis	84

## **VIII. Anhang**

1.	Danksagung
2.	Curriculum Vitae

# I. Einleitung

## **1. Endotheliale Dysfunktion und die Rolle des Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Das Endothel wurde lange Zeit für eine einfache kernhaltige Zellschicht oder relativ inaktive Barriere zwischen Gefäßwand und Blutstrom gehalten. Mittlerweile wurden unzählige wissenschaftliche Veröffentlichungen über die verschiedensten Facetten der endothelialen Zellbiologie publiziert und die Wichtigkeit der Endothelzellschicht für die vaskuläre Homöostase erkannt (Chen, Andresen et al. 2008). Endothelzellen reagieren auf unterschiedlichste mechanische und biologische Stimuli, indem sie eine Vielzahl von Faktoren synthetisieren und sezernieren, welche die Angiogenese, Inflammation, Gefäßtonus und -permeabilität regulieren. Die Verletzung oder Dysfunktion des endothelialen Zellapparates ist somit ein entscheidender Faktor in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. So wurde gezeigt, dass die endotheliale Dysfunktion (ED) eine entscheidende Rolle bei Erkrankungen wie Atherosklerose, arterielle Hypertonie, KHK, vaskulären Komplikationen bei Diabetes, Chronische Nierenerkrankung, Insulin-Resistenz und Hypercholesterinämie spielt (Feletou and Vanhoutte 2006). Die ED ist ein proinflammatorischer und proapoptotischer Zustand des Endothels mit einhergehender reduzierter Vasodilatation, erhöhter Vasokonstriktion und einer prothrombotischen Wirkung (Endemann and Schiffrin 2004).

Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer ED spielt nach neueren Erkenntnissen auch das inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  (Chen, Andresen et al. 2008; Zhang, Park et al. 2009). TNF- $\alpha$  wird heutzutage als eines der wichtigsten Zytokine des menschlichen Organismus betrachtet und spielt eine große Rolle bei der Adaption des Immunsystems, der Zellproliferation und bei Apoptosevorgängen (Poher and Min 2006; Chen, Andresen et al. 2008). Mehrere klinische Studien an Patienten mit rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder Vaskulitiden, bei denen man mit dem TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab behandelt hat, konnten zeigen, dass sich die Endothelfunktion bei den jeweiligen Patienten unter Infliximab signifikant verbesserte

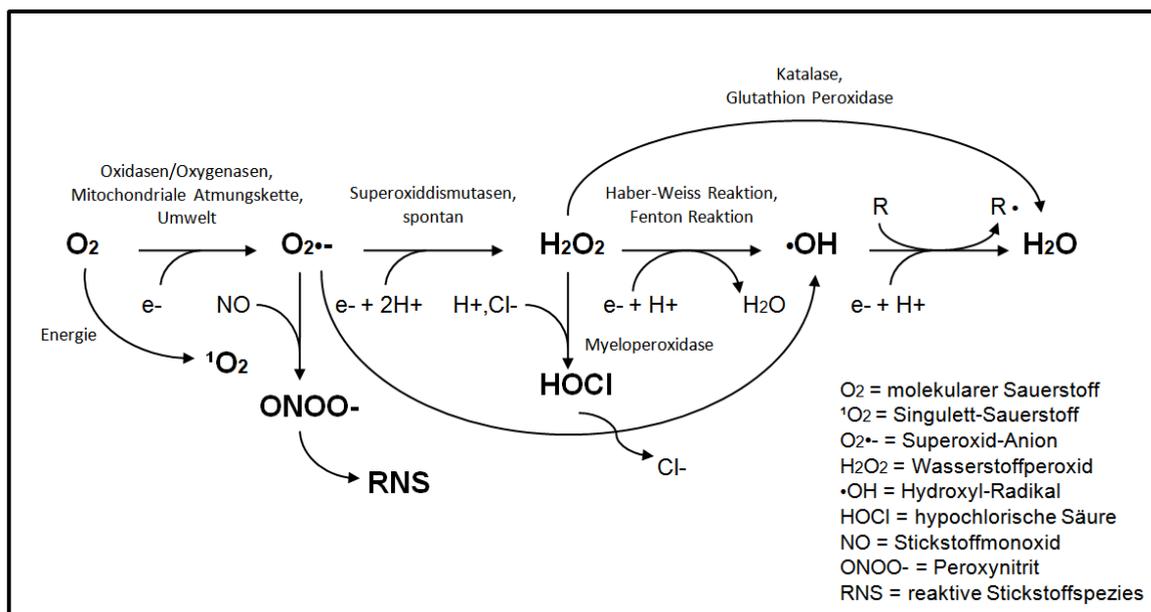
(Hurlimann, Forster et al. 2002; Booth, Jayne et al. 2004; Cardillo, Schinzari et al. 2006; Schinzari, Armuzzi et al. 2008). Aber auch für andere Anti-TNF- $\alpha$  Therapeutika wie Etanercept oder Adalimumab wurde bereits nachgewiesen, dass sie die Endothelfunktion bei Patienten mit rheumatoider Arthritis verbessern können (Bilsborough, Keen et al. 2006; Gonzalez-Juanatey, Llorca et al. 2006). Ein entscheidender Mechanismus bei der Entstehung der ED durch TNF- $\alpha$  ist die TNF- $\alpha$ -induzierte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies in den Endothelzellen, wobei TNF- $\alpha$  vor allem die mitochondriale Atmungskette, die NAD(P)H-Oxidase, die Xanthin-Oxidase und NO-Synthetase beeinflusst (Chen, Andresen et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Prozess, der unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  bei der ED abläuft, ist die rezeptorvermittelte Einleitung der Endothelzell-Apoptose (Zhang, Park et al. 2009). Auf diese beiden Punkte soll nun in den folgenden Abschnitten noch einmal näher eingegangen werden.

## **2. Reaktive Sauerstoffspezies**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden im Rahmen des enzymgebundenen Elektronentransports gebildet, der in allen biologischen Systemen einen wichtigen und natürlichen Prozess darstellt (Sharp and Chapman 1999). Es handelt sich dabei um äußerst reaktionsfähige Sauerstoffverbindungen, die als Nebenprodukt des Zellstoffwechsels gebildet werden. Der Organismus schützt sich vor der toxischen Wirkung der Radikale durch verschiedene Mechanismen (Hemnani and Parihar 1998). Übersteigt die zelluläre Produktion von ROS die Kapazität der Schutzmechanismen, so werden zelleigene Fette, Proteine und DNA geschädigt (Cai and Harrison 2000). Dieser in der Literatur oftmals als "oxidativer Stress" bezeichnete Zustand wird für eine Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. Atherosklerose, vaskuläre Komplikationen bei Diabetes mellitus und Hypertonie, aber auch bei der Lungenfibrose oder Tumorerkrankungen mitverantwortlich gemacht (Cross, Halliwell et al. 1987; Thannickal and Fanburg 2000; Harrison, Gongora et al. 2007; Zhang, Park et al. 2009).

Reaktive Sauerstoffspezies besitzen zumeist ungepaarte Elektronen und werden daher auch als freie Radikale bezeichnet. Dazu gehören Moleküle wie das **Superoxidationion ( $O_2^{\bullet-}$ )**, das **Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\bullet}$ )**, **Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ )** und **Lipid-Radikale**. Andere ROS wie **Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ )**, **Peroxynitrit ( $ONOO^-$ )** und **hypochlorische Säure ( $HOCl$ )** sind selbst keine freien Radikale, haben aber oxidierende Effekte (Cai and Harrison 2000). Außerdem sind sie im Gegensatz zu den freien Radikalen stabiler, diffusionsfähig und relativ langlebig (Finkel and Holbrook 2000).

ROS sind aber nicht nur toxische Nebenprodukte des Zellstoffwechsels, sondern haben in niedrigeren Konzentrationen auch eine Funktion als second messenger und spielen eine wichtige Rolle im zellulären Signaltransduktionssystem (Finkel 1998; Rhee 1999; Ullrich and Bachschmid 2000). Aufgrund ihrer Eigenschaften sind sie an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. Zellproliferation, Zelladaption an hypoxische Zustände, Apoptose und Aufrechterhaltung oder Anpassung der Redoxhomöostase (Chandel and Schumacker 2000; Droge 2002; Droge 2003). In den folgenden Abschnitten sollen die wichtigsten Produktions- und Abbaumechanismen von ROS näher erläutert werden. Abbildung 1 und Tabelle 1 geben vorab einen Überblick.



**Abbildung 1: Der Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies**

ROS Produzenten	ROS Abbaumechanismen
Mitochondriale Atmungskette	Superoxiddismutasen
NAD(P)H-Oxidasen (Nox und Duox Familien)	Katalase
Xanthin-Oxidasen	Glutathion System
Superoxiddismutasen	Peroxiredoxin
NO-Synthasen	Antioxidantien (Vitamine A, C, E, Coeruloplasmin, Ubiquinon, Harnsäure, Bilirubin, usw.)
Monoaminoxidasen	NO
Lipoxygenase	Uncoupling proteins (?)
Cyclooxygenase	
Cytochrom P450	
Haber-Weiss and Fenton Reaktionen	
Umwelt (ionisierende Strahlung, usw.)	
Reaktive Stickstoffspezies	

**Tabelle 1: Produktion und Abbau von ROS**

## **2.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies**

Es kommen verschiedene zelluläre Enzymsysteme (siehe Tab. 1) als Entstehungsort für ROS in Frage, die entweder im Zytosol oder in den Mitochondrien lokalisiert sind (Cross and Jones 1991; Zulueta, Yu et al. 1995; Jones, O'Donnell et al. 1996; Szasz, Thakali et al. 2007).

Nahezu alle diese Enzyme werden auch in Endothelzellen exprimiert, weshalb man in Endothelzellen eine wichtige Quelle der vaskulären ROS Bildung sieht und ihnen eine bedeutende Rolle in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zukommen lässt (Touyz and Schiffrin 2004; Azevedo, Janiszewski et al. 2006; Chen, Andresen et al. 2008).

Die wichtigsten dieser Enzyme werden im Folgenden näher beschrieben. Hierzu gehören die NAD(P)H-Oxidase, die Xanthin-Oxidase, die NO-Synthase und die mitochondriale Atmungskette.

### **2.1.1 NAD(P)H-Oxidase**

Die NAD(P)H-Oxidase ist ein membrangebundenes Enzym, welches die Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  aus molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und NADPH katalysiert:



Die Familie der NAD(P)H Oxidasen, wird aus den Nox und Duox Enzymfamilien gebildet (Lambeth 2002). Die NAD(P)H-Oxidase wurde zuerst als ein Abwehrmechanismus in Neutrophilen Granulozyten beschrieben (Babior 2000; Finkel and Holbrook 2000). Es finden sich allerdings weitere Isoformen in einer Vielzahl verschiedener Zellarten, wie z.B. in Zellen des vaskulären Systems (Lassegue and Clempus 2003). Außerdem wurde bereits beschrieben, dass TNF- $\alpha$  durch die direkte Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in Endothelzellen die Entstehung der endothelialen Dysfunktion durch vermehrte Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  vorantreibt (Chen, Andresen et al. 2008; Zhang, Park et al. 2009). In Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen wurde nachgewiesen, dass TNF- $\alpha$  auch in der Lage ist die Neuexpression der NAD(P)H-Oxidase zu induzieren (De Keulenaer, Alexander et al. 1998).

### **2.1.2 Xanthin-Oxidase**

Die Xanthin-Oxidase (XO) stellt ein weiteres  $O_2^{\bullet-}$ -produzierendes Enzym dar. Es handelt sich dabei um ein membranassoziertes Enzym, das in Endothelzellen und anderen Zellen gefunden wurde (Ullrich and Bachschmid 2000). Es ist für den Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Urat verantwortlich ist (Jornot and Junod 1989; Szasz, Thakali et al. 2007).

Als Oxidationsmittel für diese beiden Reaktionen dient molekularer Sauerstoff, welcher zu  $H_2O_2$  reduziert wird. Diese Reaktion verläuft primär über die Entstehung von  $O_2^{\bullet-}$ , welches dann spontan oder enzymatisch katalysiert zu  $H_2O_2$  dismutiert. Es ist nicht genau geklärt, ob TNF- $\alpha$  einen Effekt auf die XO hat. Zum einen scheiterte der

Versuch die TNF- $\alpha$  induzierte ROS Bildung in Endothelzellen mittels des XO-Inhibitors Allopurinol zu inhibieren (Corda, Laplace et al. 2001; Chen, Andresen et al. 2008). Auf der anderen Seite aber gab es Versuche, die nachweisen konnten, dass TNF- $\alpha$  in Koronararteriolen von Schweinen in der Lage ist JNK und XO zu aktivieren (Zhang, Hein et al. 2006).

### **2.1.3 NO-Synthase**

Die Stickstoffmonoxid Synthase (NO-Synthase, NOS) ist für die Generierung von NO zuständig und kommt in drei Isoformen vor. Diese drei Isoformen werden als NOS-1 (nNOS, neuronale NOS), NOS-2 (iNOS, induzierbare NOS) und NOS-3 (eNOS, endotheliale NOS) bezeichnet (Szasz, Thakali et al. 2007).

Unter physiologischen Bedingungen katalysiert NOS die Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin und NO. Dabei nutzt NOS verschiedene Kofaktoren, wie NADPH, FAD, FMN und 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) (Alderton, Cooper et al. 2001). Kommt es jedoch zu einem Mangel an BH<sub>4</sub> oder an L-Arginin, wird die NOS entkoppelt und produziert O<sub>2</sub><sup>•-</sup> anstelle von NO (Szasz, Thakali et al. 2007). Weiterhin interagieren Superoxidanionen mit NO (s. Abb. 1) und bilden dadurch ONOO<sup>-</sup> (Peroxynitrit), ein Mitglied der Familie der ROS (Beckman and Koppenol 1996).

TNF- $\alpha$  hat ebenfalls Einfluss auf die Aktivität der NO-Synthasen. Bei der Behandlung von HAEC mit TNF- $\alpha$  für 8h konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  die iNOS mRNA Expression induzieren kann, aber die eNOS mRNA Expression herunterreguliert (MacNaul and Hutchinson 1993). Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass TNF- $\alpha$  in HUVEC über rezeptorvermittelte Mechanismen die eNOS aktivieren kann (De Palma, Meacci et al. 2006). Prinzipiell hat die zelluläre Produktion von NO durch die NOS, speziell durch die eNOS, eine positive Wirkung auf die Endothelfunktion, da NO eine relaxierende Wirkung auf die Gefäßwand hat. Allerdings stimuliert TNF- $\alpha$  über andere Mechanismen die O<sub>2</sub><sup>•-</sup> Produktion und beschleunigt somit die Bildung von ONOO<sup>-</sup>, was zur Entstehung der ED beiträgt, indem die Bioverfügbarkeit von NO

gesenkt wird und somit auch das Dilatationsvermögen der Gefäßwand (Phelps, Ferro et al. 1995; Neumann, Gertzberg et al. 2006; Bauersachs and Widder 2008).

NO ist außerdem auch ein Modulator der Thrombozyten-Aktivität und ein verringerter NO-Spiegel führt zu einer verstärkten Thrombozyten-Aktivierung, was wiederum zu einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse z.B. bei einer Herzinsuffizienz führen kann (Bauersachs and Widder 2008).

#### **2.1.4 Mitochondriale Atmungskette**

Die mitochondriale Atmungskette ist die Hauptenergiequelle der Zelle. Ihr Sitz ist an der inneren Mitochondrienmembran und sie katalysiert den Elektronentransfer bei der Herstellung von ATP. An diesem Transportmechanismus sind mehr als 80 Peptide, in vier Komplexen organisiert, beteiligt. Der Transfer von Elektronen wird unterstützt durch Coenzym Q, sowie Cytochrom C und führt normalerweise zur Bildung von ATP durch den fünften Komplex (Szasz, Thakali et al. 2007). Jedoch entweicht auch eine gewisse Menge (1-2% in vitro) an Elektronen (Finkel and Holbrook 2000), normalerweise an Komplex III (Ubichinon-Cytochrom C Reduktase), aber auch an Komplex I (NADH-Dehydrogenase) und bildet  $O_2^{\bullet-}$  (St-Pierre, Buckingham et al. 2002; Smith, Kelso et al. 2003).

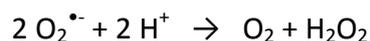
Man nimmt an, dass die ROS Produktion im Mitochondrium eine entscheidende Rolle bei der Zytotoxizität von TNF- $\alpha$  spielt. TNF- $\alpha$  aktiviert die  $O_2^{\bullet-}$  Bildung prinzipiell an Komplex III und somit an der inneren Mitochondrien-Membran, was zu einem Anstieg von  $O_2^{\bullet-}$  innerhalb des Mitochondriums führt (Schulze-Osthoff, Bakker et al. 1992). Dieser Vorgang wird über das auf Sphingosin basierende Lipidsignalmolekül Ceramide vermittelt (Corda, Laplace et al. 2001).

## **2.2 Zelluläre Mechanismen zur Protektion gegenüber ROS**

Um sich gegen die negativen Auswirkungen einer vermehrten zellulären ROS Produktion zu erwehren, verfolgt die Zelle mehrere Abwehrstrategien (siehe Tab.1). Die wichtigsten dieser Abwehrmechanismen sind die Superoxiddismutase, die Katalase und das thiolbasierte Glutathion Redoxsystem.

### **2.2.1 Superoxiddismutase**

Die Superoxiddismutase (SOD) ist ein Enzym, dessen Aufgabe es ist, intrazelluläres  $O_2^{\bullet-}$  zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  umzusetzen:



Diese Reaktion nennt sich Dismutation, da das Substrat  $O_2^{\bullet-}$  mit sich selbst reagiert und so ein oxidiertes Produkt (hier  $O_2$ ) und ein reduziertes Produkt (hier  $H_2O_2$ ) entstehen. Die Aufgabe der SOD ist es, die intrazelluläre Konzentration von  $O_2^{\bullet-}$  niedrig zu halten. Ohne die SOD würde die Dismutationsreaktion zwar ebenfalls spontan ablaufen, jedoch müsste dafür die Konzentration an freien  $O_2^{\bullet-}$ -Molekülen deutlich höher sein. Im Endeffekt ist also die intrazelluläre  $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration durch die enzymkatalysierte Dismutation geringer als nur durch die Spontanreaktion (Babior 2000).

### **2.2.2 Katalase**

Die Katalase ist ein Enzym, welches vornehmlich in den Peroxisomen der Zelle lokalisiert ist. Dort dient es der Detoxifikation von  $H_2O_2$  (Titorenko and Rachubinski 2004). Das Enzym katalysiert eine Reaktion, in deren Verlauf das reaktionsfreudige  $H_2O_2$  zu Wasser und molekularem Sauerstoff umgesetzt wird. Dies geschieht mit einer der höchsten in der Enzymologie bekannten Umschlagsraten ( $\sim 10^7$  l/mol/sec)(Szasz, Thakali et al. 2007).

### **2.2.3 Glutathion Redoxzyklus**

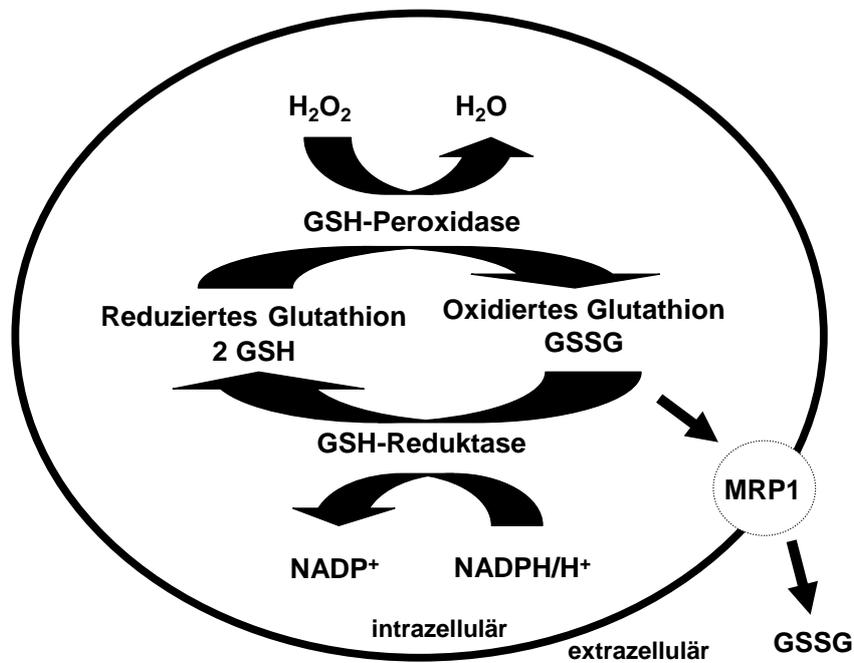
Ein weiterer wichtiger Abwehrmechanismus gegen ROS ist das reduzierte Glutathion (GSH), ein Tripeptid bestehend aus Cystein, Glutamat und Glycin (Andreoli, Mallett et al. 1986; Dickinson and Forman 2002; Mueller, Widder et al. 2005). Als dominierendes intrazelluläres Thiol spielt GSH eine bedeutende Rolle bei der Protektion der Zelle gegenüber ROS, zur Entgiftung bzw. in der Signaltransduktion (Dickinson and Forman 2002).

Durch seine Fähigkeit ROS, und insbesondere Wasserstoffperoxid, mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase in  $H_2O$  und oxidiertes Glutathion-Disulfid (GSSG) umzuwandeln, trägt GSH zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxstatus bei. Dies zeigt sich etwa dadurch, dass die Blockade der de-novo-Synthese von Glutathion zur Verminderung der endothelabhängigen Relaxation und zu Bluthochdruck bei Ratten führt (Vaziri, Wang et al. 2000; Laursen, Boesgaard et al. 2001). Eine Überexpression der Glutathion-Peroxidase hingegen hat positive Auswirkungen auf die Endothelfunktion (Weiss, Zhang et al. 2001).

Unter physiologischen Bedingungen ist der intrazelluläre Anteil von GSH mit etwa 98% des Gesamtglutathion-Pools deutlich größer, während GSSG in Endothelzellen nur etwa 2% ausmacht. Dieses Verhältnis wird von der Zelle fein reguliert und möglichst aufrechterhalten. Eine dauerhafte Verschiebung in Richtung GSSG mit Verlust von GSH führt zu Dysfunktion des Zellmetabolismus und letztlich zur Apoptose (Hall 1999). Das Verhältnis des Redox-Paares GSH/GSSG stellt daher ein exzellentes Maß für den Redoxstatus der Zelle dar, welcher mit Hilfe der Nernst-Gleichung (Nernst-Potential für GSH/GSSG) beschrieben werden kann (Schafer and Buettner 2001).

Um das GSH/GSSG-Gleichgewicht unter erhöhten ROS-Spiegeln aufrechtzuhalten, kann die Zelle entweder mittels Hochregulation des Enzyms GSH-Synthetase GSH neu synthetisieren (Moellering, Mc Andrew et al. 1999) oder den GSSG-Spiegel modulieren. Die Modulation des GSSG-Spiegels erfolgt einerseits durch die Reduktion von GSSG zurück zu GSH mit Hilfe der Glutathion-Reduktase oder durch den Export von GSSG aus der Zelle (Mueller, Widder et al. 2005). Als geeignete Kandidaten für den Transport von

GSSG aus Endothelzellen kommen Proteine der ABCC-Familie in Frage und hierbei insbesondere das Multidrug Resistance Associated Protein-1 (MRP-1) (Borst, Evers et al. 1999), welches unter I./4. näher beschrieben wird. Für die in dieser Arbeit verwendeten humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) wurde MRP-1 bereits als Hauptexportmechanismus für GSSG identifiziert (Mueller, Widder et al. 2005). Einen kurzen zusammenfassenden Überblick über den Glutathionstoffwechsel soll Abbildung 2 geben.



**Abbildung 2:** Intrazellulärer Glutathionstoffwechsel und die Rolle von MRP-1 für den GSSG-Export (aus Mueller, Widder et al. 2005)

### **3. Apoptose**

#### **3.1 Die Biologie des programmierten Zelltods**

Die Apoptose ist als physiologische Form des Zelltodes sowohl für die Homöostase, als auch für die Differenzierung von Geweben essentiell (Desagher and Martinou 2000). Dieser „programmierte“ Zelltod findet während des gesamten Lebens in unterschiedlichem Ausmaß statt. So ist Apoptose z.B. während der Ontogenese an der Rückbildung der Schwimmhäute zwischen den Fingern und Zehen beteiligt (Hurle, Ros et al. 1996) und später dann an der Eliminierung funktionsuntüchtiger oder maligner Zellen.

Apoptose auslösende Ereignisse, wie die Stimulierung bestimmter Oberflächenrezeptoren auf der Zelle (z.B. TNF-Rezeptor-1), Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden oder Störungen im Zellmetabolismus, setzen eine fest vorgegebene Maschinerie in Gang, die in den gemeinsamen Endweg der Apoptose mündet. Die Zelle schrumpft, zerstört sich selbst und stirbt ab. Entscheidend dabei ist, dass der Zellinhalt nicht unkontrolliert an die Umgebung abgegeben wird, wie dies bei der Nekrose der Fall ist, sondern sich die einzelnen zytoplasmatischen Bestandteile über Vesikel vom Zellrest abschnüren, um dann anschließend phagozytiert zu werden.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Nekrose, der pathologischen Form des Zelltods, zu einem Zusammenbrechen des Aktionspotentials der Zelle durch physikalische oder chemische Noxen. Es kommt zu unkontrollierten Ionenströmen und damit zum osmotischen Platzen der Zelle, wodurch die Zellorganellen ins umliegende Gewebe gelangen und dort Entzündungsreaktionen verursachen (Hotchkiss, Strasser et al. 2009).

Wie wichtig der kontrollierte Ablauf der Apoptose ist, zeigt sich, wenn sich Fehler in diese fest vorgegebene Maschinerie einschleichen. Apoptose wird mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Zusammenhang gebracht und diese lassen sich unter anderem durch „zu viel“ oder „zu wenig“ Apoptose in den Zellen der erkrankten Organe erklären. Erkrankungen mit „zu viel“ Apoptose sind z.B. der Schlaganfall, der Herzinfarkt (Lorenz, Herrmann et al. 2000), Atherosklerose und endotheliale

Dysfunktion (Berk, Abe et al. 2001). Krankheiten mit „zu wenig“ Apoptose sind z.B. maligne Entartung von Zellen oder Autoimmunerkrankungen (Sarasin 1999; Lorenz, Herrmann et al. 2000)

### **3.2 Signalwege**

Bisher sind zwei unterschiedliche Hauptsignalwege bekannt, über die Apoptose initiiert werden kann:

1. Über die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren, welche auch als „Todesrezeptoren“ bezeichnet werden, wie z.B. der TNF- oder der Fas-Rezeptor. Dies geschieht durch ihre spezifischen Liganden (extrinsischer Weg) (Miura and Koyanagi 2005; Malhi, Gores et al. 2006).
2. Über den mitochondrialen Weg (intrinsischer Weg) (Nieminen 2003).

#### **3.2.1 Der rezeptorvermittelte / extrinsische Signalweg (z.B. TNF-R1)**

Extrinsisch induzierte Apoptosesignale werden über die Interaktion von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, den sogenannten Todesrezeptoren, mit ihren entsprechenden Liganden vermittelt. Diese Todesrezeptoren gehören einer Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie an (Schulze-Osthoff, Ferrari et al. 1998). Intensiv untersucht wurden vor allem die Zytokine TNF- $\alpha$  und Fas-L (Synonyme: CD95, APO1) und ihre jeweiligen Rezeptoren TNF-R1 und Fas-Rezeptor.

Tabelle 2 soll einen Überblick über die bekanntesten Rezeptoren innerhalb der TNF-Rezeptor-Superfamilie vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Fokus aber auf dem TNF-R1 Signalweg liegen, daher beziehen sich die nachfolgenden Beschreibungen in erster Linie exemplarisch auf den TNF-R1-vermittelten Signalweg, der rezeptorvermittelten Apoptose durch TNF- $\alpha$ .

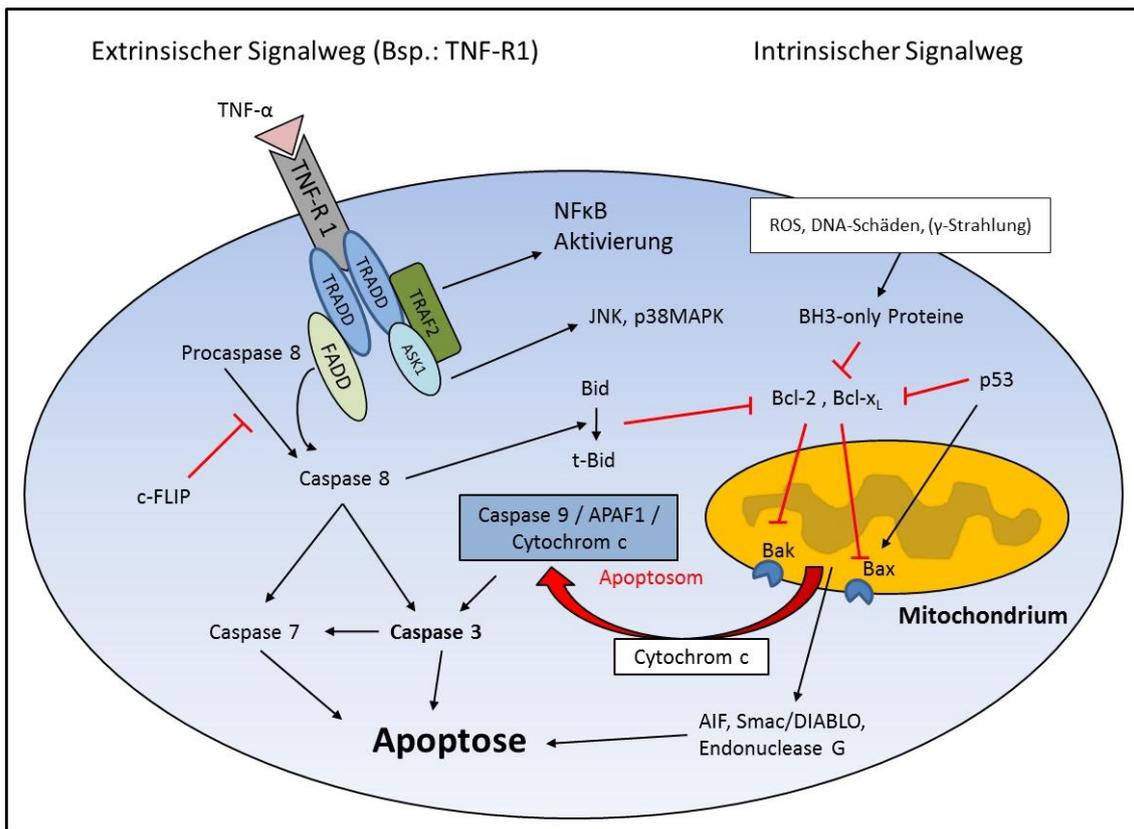
Rezeptor	Ligand
CD 95 / Apo 1 / Fas	CD 95 L / Apo 1 L / Fas L
TRAIL-R1	TRAIL / Apo-2L
TRAIL-R2	TRAIL / Apo-2L
TNF-R1	TNF- $\alpha$ / TNF- $\beta$
DR 3	VEGI
DR 6	Unbekannt
P 75 NGFR	NGF
EDAR	EDA – A1

**Tabelle 2: Todesrezeptoren und ihre spezifischen Liganden (Wajant 2003)**

Die Signalübertragung läuft bei allen diesen Rezeptoren nach dem gleichen Schema ab. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Oligomerisierung der Transmembrandomänen, was zu einer Konformationsänderung des jeweiligen Rezeptors führt und Adaptermolekülen, wie z.B. FADD (Fas associated death domain) oder TRADD (TNF-receptor-1-associated death domain), ermöglicht, sich an die intrazelluläre Todesdomäne der Rezeptoren anzulagern. FADD und TRADD enthalten in sich selbst eine Todesdomäne, so dass sie mit der Todesdomäne des Rezeptors interagieren können. Hierdurch entsteht der sogenannte DISC (Death Inducing Signaling Complex). Der für diese Arbeit relevante TNF-R1 bindet zunächst an TRADD, welches dann FADD rekrutiert. Andere Rezeptoren wie z.B. der Fas-Rezeptor oder die TRAIL-Rezeptoren sind aber auch in der Lage direkt an FADD zu binden (Park, Schickel et al. 2005). Diese Adapterproteine sind zusätzlich noch mit einer N-terminalen Todeseffektordomäne (DED) ausgestattet, die an eine analoge Domäne der Procaspase-8 bindet. Durch eine Konformationsänderung kommt es zu einer autokatalytischen Spaltung der Procaspase-8. Die aktive Form der Initiatorcaspase-8 leitet mittels Aktivierung der Effektorcaspasen den Zelltod ein (Peter and Krammer 2003; Thorburn 2004; Hotchkiss, Strasser et al. 2009). Die darauffolgende Caspase-Kaskade wird unter I./3.2.3 separat beschrieben.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass diese Rezeptoren zusätzlich auch vielfach nicht apoptotische Aktivitäten besitzen (Park, Schickel et al. 2005). Der TNF-R1 z.B. kann an sein Adapterprotein TRADD nicht nur FADD binden, sondern auch an

TRAF2 (TNF-R-associated factor 2) und über diesen dann den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren. Über den NF- $\kappa$ B-Weg hat TNF- $\alpha$  dann z.B. über eine transkriptionsfaktorvermittelte vermehrte Bildung von c-FLIP, welches die Spaltung der Procaspase-8 durch den DISC hemmt, auch eine antiapoptotische Wirkung (Xu and Shi 2007). Des Weiteren werden auch diverse Proteinkinase Signalwege durch TNF- $\alpha$  aktiviert. Erwähnenswert ist hierbei die Aktivierung der proapoptotischen Kinasen JNK (c-Jun N-terminal kinase) und der p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) (Natoli, Costanzo et al. 1997; Winston, Chan et al. 1997).



**Abbildung 3: Hauptsignalwege der Apoptose**

### **3.2.2 Der mitochondriale / intrinsische Signalweg**

Mitochondrien fungieren nicht nur als „Energieförderer“ der Zelle, sondern spielen auch im intrinsischen Apoptoseweg eine zentrale Rolle. Die Zelle reagiert dabei auf die Exposition gegenüber verschiedenen exogenen Stimuli, wie Hypoxie, Hitzeschock, dem Entzug von Wachstumsfaktoren, zytotoxischen Substanzen, ionisierender Strahlung (Kluck, Bossy-Wetzler et al. 1997) oder aber auch auf „oxidativen Stress“ (Ott, Gogvadze et al. 2007).

Ein Schlüsselschritt im mitochondrial initiierten Signalweg ist die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Diese Freisetzung wird durch Proteine der Bcl-2-Familie, deren Mitglieder entweder pro- oder antiapoptotische Funktion haben, kontrolliert (Adams 2003). Bcl-2, das bekannteste Antiapoptose-Mitglied der Bcl-2-Familie, bindet proapoptotische Proteine wie Bax und inhibiert diese dadurch. Weitere antiapoptotisch wirkende Proteine der Bcl-2 Familie sind Bcl-xL und Mcl-1, proapoptotische Funktion haben z.B. Bax, Bad, Puma und Bid, welches auch durch Caspase-8 aktiviert werden kann und so die Verbindung zum extrinsischen Signalweg darstellt (Yin 2000). Viele Mitglieder der Bcl-2-Familie sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. An dieser entscheidet sich, ob das Apoptosesignal gehemmt oder weitergeleitet wird. Sofern die Aktivität der proapoptotischen Bcl-2-Proteine dominiert, werden Strukturveränderungen der Membranaußenseite induziert, die daraufhin permeabel wird (Arnoult, Parone et al. 2002; Antonsson 2004). Es kommt zum Zusammenbruch der Atmungskette und des mitochondrialen Membranpotentials, was die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium wie AIF (apoptosis inducing factor), Smac/DIABLO, Endonuclease G und vor allem Cytochrom c induziert (Chen, Crosby et al. 2003; Tsujimoto, Nakagawa et al. 2006).

Das nun im Zytosol vorliegende Cytochrom c assoziiert unter Beteiligung von ATP mit dem zytosolischen Adapterprotein Apaf-1. Die Procaspase-9 kann sich nun an Apaf-1 anlagern. Diesen Komplex, bestehend aus Procaspase-9, Apaf-1 und Cytochrom c, bezeichnet man als Apoptosom. Dabei kommt es zur autokatalytischen Spaltung der

Procaspase-9. Die somit aktivierte Initiatorcaspase-9 setzt dann die Caspase-Kaskade in Gang (Cain, Bratton et al. 2002; Cain 2003; Hill, Adrain et al. 2003).

### **3.2.3 Die Caspase-Kaskade**

Die Aktivierung von Caspasen (= Cysteinyl **Aspartat** spezifische **Proteasen**) ist der entscheidende Schritt auf dem gemeinsamen Endweg der Apoptose. Extrinsisch induzierte Apoptose wird über die Caspase-8-vermittelt, intrinsische Apoptose über die Caspase-9. Caspasen existieren intrazellulär als Proenzyme und werden durch Autoaktivierung, spezifische Proteolyse oder durch Assoziation mit Kofaktoren aktiviert. Die Initiatorcaspasen-8 und -9 aktivieren nach ihrer Aktivierung die Effektorcaspasen-3, -6 und -7. Diese wiederum aktivieren ebenfalls sekundäre Zielproteine, wie z.B. die caspase-activated DNase (CAD), sind aber auch selbst am Abbau des Zytoskeletts (Lamin, Actin, Fodrin und Gelsolin) beteiligt (Hengartner 2000). Ein weiteres Substrat der Effektorcaspasen ist unter anderem auch PARP (Konopleva, Zhao et al. 1999). PARP spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur. Das Enzym wird aufgrund von DNA-Strangbrüchen aktiv und aktiviert seinerseits DNA-Reparaturenzyme. Während der Apoptose wird PARP schnell gespalten, damit es die DNA-Reparatur nicht weiter unterstützen kann. Charakteristische Apoptosemerkmale sind zum einen die Kondensation des sich im Zellkern befindenden Chromatins und andererseits ein kontrollierter schrittweiser Abbau der DNA zuerst in 50-300 kbp- und später in 180 bp-Fragmente (Oberhammer, Wilson et al. 1993). Dieser Mechanismus wird auch als „DNA-laddering“ bezeichnet. So wird die Zelle Stück für Stück abgebaut, in Vesikeln abgeschnürt, welche dann schließlich von Makrophagen phagozytiert werden.

### **3.3 Die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies bei Apoptose**

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine zentrale Rolle beim Ablauf des intrazellulären Apoptoseprogramms. Zum einen kann oxidativer Stress Apoptose induzieren, indem

die durch ROS verursachten Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden dazu führen, dass die Zelle beschließt den programmierten Zelltod einzuleiten (Ott, Gogvadze et al. 2007). Andererseits führt die durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose zu einer vermehrten intrazellulären Produktion von ROS (Zhang, Park et al. 2009).

Weiterhin ist mittlerweile auch bekannt, dass ROS in der Zelle als second messenger fungieren können und auf diese Weise Einfluss nehmen. Der wohl größte Anteil der ROS wird in den Mitochondrien produziert. Diese werden dann aber auch Opfer des „oxidativen Stresses“, denn die ROS verändern die Permeabilität der Mitochondrienmembran und leiten so über den mitochondrialen Signalweg den Apoptosevorgang ein, indem Sie die vermehrte Freisetzung von proapoptischen Faktoren aus dem Mitochondrium, wie Cytochrom C, AIF, Smac/DIABLO oder Endonuclease G, begünstigen (Chen, Crosby et al. 2003; Le Bras, Clement et al. 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ROS direkt an der Caspase-9 Aktivierung beteiligt sind und dessen Bindung an Apaf-1 via Disulfid-Bildung vermitteln (Zuo, Xiang et al. 2009). Somit spielen ROS bei der Bildung des Apoptosoms, was einer der wichtigsten Schritte im mitochondrialen Apoptoseweg ist, eine zentrale Rolle. Dies konnte auch in-vitro in einem System ohne Mitochondrien gezeigt werden (Zuo, Xiang et al. 2009).

Weiterhin wird auch p53, ein zentrales Protein im Zellzyklus und bei Zellteilung mit proapoptischer Funktion, durch ROS hochreguliert (Lee, Rhee et al. 2009). Dies zeigt, dass ROS durch Apoptoseinduktion auch Einfluss auf den Zellteilungsprozess nehmen können.

Ein sehr interessanter Aspekt ist die Regulation der TNF- $\alpha$  Signalkaskade durch den Redoxstatus der Zelle, welcher ausschlaggebend dafür ist, ob die pro- (z.B. TRADD) oder die antiapoptische (NF- $\kappa$ B) Komponente überwiegt. ROS vermitteln z.B. auch innerhalb des TNF-Signalweges eine bleibende Aktivierung der JNK, was wiederum zur Einleitung der Apoptose führen kann (Han, Ybanez et al. 2009).

#### 4. Das Multidrug Resistance Associated Protein-1 (MRP-1)

Das 190-kDa Protein MRP-1 gehört zur Superfamilie der ATP-binding-cassette (ABC) Transportproteine und innerhalb dieser zur Subfamilie C, weshalb es auch als ABCC1 Protein bezeichnet werden kann. Das MRP-1-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16, an der Stelle 16p13.1 und kodiert für ein Protein mit 1531 Aminosäuren. MRP-1 ist ein integrales Membran-Glykophosphoprotein und fungiert als primärer aktiver Transporter, welcher die durch ATP-Bindung und -Hydrolyse entstehende Energie für seine Transportprozesse nutzt (Bakos and Homolya 2007).

Das MRP-1-Protein wurde erstmals 1992 aufgrund seiner Überexpression in der chemoresistenten kleinzelligen Lungenkrebs Zelllinie H69AR identifiziert (Cole, Bhardwaj et al. 1992; Cole and Deeley 2006). Des Weiteren ist MRP-1 auch in einigen anderen multichemoresistenten Tumorarten, z.B. in Tumoren der Lunge, Brust, Prostata oder dem Neuroblastom, überexprimiert und am Scheitern einer Chemotherapie bei diesen malignen Erkrankungen mit beteiligt (Deeley, Westlake et al. 2006; Munoz, Henderson et al. 2007).

Substrate	Beispiele
<b>Endobiotische Konjugate</b> GSH-Konjugate	Leukotrien C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> ; Prostaglandin A <sub>2</sub>
Glucuronid-Konjugate	Glucuronosylbilirubin; Estradiol
Sulfat-Konjugate	Dehydroepiandrosteron-3-Sulfat
<b>Xenobiotische Konjugate</b> GSH-Konjugate	Aflatoxin B <sub>1</sub> ; Chlorambucil
<b>Zytostatika</b>	Anthrazykline (Daunorubicin, Doxorubicin); Vinca-Alkaloide (Vinblastin, Vincristin, Etoposid); Methotrexat
<b>HIV Proteasehemmer</b>	Ritonavir, Saquinavir
<b>Peptide</b>	GSSG

**Tabelle 3:** ausgewählte Substrate des Zellmembrantransporters MRP-1 (Bakos and Homolya 2007)

Die Anzahl an Substraten, die von MRP-1 über die Zellmembran transportiert werden, ist sehr groß. Die meisten dieser Substrate werden konjugiert an GSH, Glucuronid oder Sulfat transportiert. Einige von ihnen werden aber auch unverändert von MRP-1 über die Zellmembran befördert (Bakos and Homolya 2007). Die charakteristischsten Substrate werden in Tabelle 3 zusammengefasst.

MRP-1 ist in einer gemäßigten Anzahl in den meisten Gewebetypen exprimiert, wird aber vor allem in Geweben mit Absorptionsfunktion (Lunge, Darm) oder hoher Metabolisations- oder Eliminationsrate (Leber, Niere) nachgewiesen (Cole, Bhardwaj et al. 1992; Leslie, Deeley et al. 2005).

In polaren Epithel- und Endothelzellen ist MRP-1 an der basolateralen Membran lokalisiert (Deeley, Westlake et al. 2006) und ist z.B. aufgrund seiner Eigenschaften Bestandteil des aktiven Transportprozesses an der Bluthirnschranke im ZNS (Wijnholds, deLange et al. 2000; de Lange 2004; Nies, Jedlitschky et al. 2004; Zhang, Schuetz et al. 2004). Bei der Analyse von MRP1<sup>-/-</sup> Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass MRP1 jene Gewebe schützt, welche es exprimieren, indem es die zelluläre Akkumulation von Xenobiotika und ihren Metaboliten vermindert (Wijnholds, deLange et al. 2000; Tribull, Bruner et al. 2003; Leslie, Deeley et al. 2005).

Außerdem gibt es Untersuchungen, welche belegen, dass MRP-1 an der Regulation des Blutdrucks und der vaskulären Sauerstoffradikalproduktion beteiligt ist (Widder, Guzik et al. 2007). Aufgrund seiner Fähigkeit GSSG und GSH-Konjugate aus der Zelle zu transportieren, hat MRP-1 das Potential die zelluläre GSH/GSSG Balance zu beeinflussen und spielt deshalb womöglich eine entscheidende Rolle bei den durch ROS vermittelten Signalwegen oder der zellulären Antwort auf „oxidativen Stress“, welcher z.B. durch Medikamente verursacht sein kann oder mit einer Reihe von kardiovaskulären Krankheiten assoziiert ist (Mueller, Widder et al. 2005; Cole and Deeley 2006; Munoz, Henderson et al. 2007; Chen, Andresen et al. 2008).

Es gibt bereits Hinweise, dass erhöhte ROS-Konzentrationen und niedrige Glutathionspiegel in Endothelzellen Apoptose induzieren können und MRP-1 dabei wohl eine entscheidende Rolle spielt. Eine Herunterregulation von MRP-1 verhindert

nämlich die durch oszillierende Schubspannung induzierte Apoptose in Endothelzellen (Mueller, Widder et al. 2005). Der Mechanismus ist derzeit allerdings noch unklar. Wie unter I./3.3 bereits beschrieben, spielen ROS eine große Rolle beim Ablauf der Apoptose. Der Erhalt des intrazellulären Glutathionspiegel durch Herunterregulation von MRP-1 könnte somit durch Protektion gegenüber ROS die Zellen vor Apoptose schützen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Substitution von Glutathion durch N-Acetylcystein die zelluläre Apoptoserate unter oxidativem Stress in H9c2 Herzmuskelzellen vermindert (Kumar and Sitasawad 2009). Interessanterweise gibt es auch Beobachtungen, dass eine exogene Erhöhung des GSSG-Spiegel zur intrazellulären Signalaktivierung des p38 MAP-Kinase-Weges führt und dadurch Apoptose induziert (Filomeni, Rotilio et al. 2003).

Betrachtet man ein klinisches Beispiel, so führen ROS und Inflammation beim kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden zur Infiltration von Leukozyten und Ausschüttung von Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , was letztendlich zur Apoptoseinduktion führt. Aber auch in dieser Situation spielt der Glutathionspiegel eine wesentliche Rolle, denn Untersuchungen zeigen, dass eine Überexpression der Glutathion-Peroxidase den kardialen Ischämie/Reperfusionsschaden vermindert (Singh, Lee et al. 1989; Yoshida, Watanabe et al. 1996).

### **5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Wie bereits erwähnt, spielt TNF- $\alpha$  eine zentrale Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Dies geschieht in erster Linie durch die rezeptorvermittelte Induktion von Apoptose in den Endothelzellen und durch die vermehrte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, wobei beide Mechanismen ineinandergreifen. Bereits in Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 die Apoptoserate in Endothelzellen unter oszillierender Schubspannung senkt. Dies geschah vor allem durch den intrazellulären Erhalt von GSH und des Redoxstatus der Zellen (Mueller, Widder et al. 2005).

## I. Einleitung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht nun folgende Frage: Welche Rolle spielt MRP-1 bei der TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose in humanen aortalen Endothelzellen und inwiefern sind hierbei reaktive Sauerstoffspezies involviert?

## II. Material

### 1. Chemikalien, Reagenzien, Standards und Zellkulturmedien

Produkt	Firma/Hersteller
3,4-Dihydroxymzimtsäure	Fluka Chemie AG
Acetonitril	Sigma-Aldrich Co.
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Analysis System	GE Healthcare
Amersham™ ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare
Amoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche Diagnostics GmbH
Aqua ad ad iniectabilia	Delta Select
BD FACS Clean	BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company
BD FACS Flow	BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company
BD Shutdown Solution	BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company
Biotinylated Protein Ladder Detection Pack	Cell Signaling Technology, Inc.
Biotinylated standards for blotting	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Blue Loading Buffer Pack	New England Biolabs, Inc.
Calcium Chloride (CaCl)	Sigma-Aldrich Co.
Cell Lysisbuffer 10x	Cell Signaling Technology, Inc.
Clonetics® EBM®-2 Endothelial Cell Basal Medium-2	LONZA Group Ltd.
Clonetics® EGM™-2 Single Quots®	LONZA Group Ltd
Dihydroethidium	Invitrogen Corporation
DPBS	Pan™ Biotech GmbH
Gelatin from bovine skin, Type B	Sigma-Aldrich Co.
GIBCO OPTI-MEM®	Invitrogen Corporation
Glucose	Sigma-Aldrich Co.
Glycine for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co.
Hepes (free acid Ultrol 1M solution)	Calbiochem AG
Hydrochloride Acid (HCl) 5N	Sigma-Aldrich Co.
Isopropanol	Sigma-Aldrich Co.
Magnesium Chloride (MgCl)	Sigma-Aldrich Co.
Membrane Blocking Agent	GE Healthcare
Methanol	Sigma-Aldrich Co.
N-Acetyl-L-Cysteine	Sigma-Aldrich Co.
Natronlauge (NaOH) 1M	Sigma-Aldrich Co.
Oktansulfonat	Sigma-Aldrich Co.
Oligofectamine Reagent	Invitrogen Corporation
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Co.
PMSF	Sigma-Aldrich Co.
Potassium Chloride (KCl)	Sigma-Aldrich Co.
Protein Assay Kit (Bradford)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamide/ 0,8% Bisacrylamide)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sodium Chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich Co.
Sodium dodecyl sulfate solution (SDS), 10%	Sigma-Aldrich Co.

## II. Material

Sodium Phosphate (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Co.
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylenediamine)	Sigma-Aldrich Co.
Trizma Pre Set Crystals pH8,8	Sigma-Aldrich Co.
Trizma® Base	Sigma-Aldrich Co.
Trizma® hydrochloride buffer solution (pH 7,6)	Sigma-Aldrich Co.
Trypsin (0,25%)/EDTA (0,02%) Solution	BioChrom AG
Tween® 20, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co.

**Tabelle 4: verwendete Chemikalien, Reagenzien, Standards und Zellkulturmedien**

## 2. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
5x Elektrophorese Puffer	Western-Blot	Trizma® Base (15,15 g/l), Glycine (72 g/l), SDS (5 g/l), Aqua ad iniectabilia
10x TRIS-Glycine Transfer Puffer	Western-Blot	Trizma® Base (30,3 g/l), Glycine (144 g/l), Aqua ad iniectabilia
TBS-Tween Puffer (pH 7,7)	Western-Blot	16 g NaCl, 2 ml Tween® 20, 40 ml Trizma® HCl buffer solution (pH 7,6), 2 l Aqua ad iniectabilia
Sample Puffer	Western-Blot	20 µl DTT-Lösung, 180 µl SDS Sample Puffer  (beide Reagenzien sind im Blue Loading Buffer Pack enthalten)
TrisBase-Stammlösung pH 8,8	Western-Blot	190,8 g Trizma Pre Set Crystals pH8,8, 4 g SDS, 1 l Aqua ad iniectabilia
TrisBase-Stammlösung pH 6,8	Western-Blot	100 ml Trizma® HCl buffer solution (pH 7,6), 0,5 g SDS, 50 ml Aqua ad iniectabilia Mit 5N HCl auf pH 6,8 einstellen, Lösung mit Aqua ad iniectabilia auf 200ml auffüllen
Trenngellösungen (verschiedene Ansätze)	Western-Blot	<u>7,5% Polyacrylamid-Gel:</u> 2,5 ml Rotiphorese® Gel 30, 2,5 ml TrisBase-Stammlösung pH 8,8 5 ml Aqua ad iniectabilia 33,3 µl APS (10%) 6,68 µl TEMED  <u>10% Polyacrylamid-Gel:</u> 3,325 ml Rotiphorese® Gel 30, 2,5 ml TrisBase-Stammlösung pH 8,8 4,175 ml Aqua ad iniectabilia 33,3 µl APS (10%) 6,68 µl TEMED

## II. Material

		<p><u>12% Polyacrylamid-Gel:</u>  4 ml Rotiphorese® Gel 30,  2,5 ml TrisBase-Stammlösung pH 8,8  3,5 ml Aqua ad iniectabilia  33,3 µl APS (10%)  6,68 µl TEMED</p> <p><u>15% Polyacrylamid-Gel:</u>  5 ml Rotiphorese® Gel 30,  2,5 ml TrisBase-Stammlösung pH 8,8  2,5 ml Aqua ad iniectabilia  33,3 µl APS (10%)  6,68 µl TEMED</p>
Sammelgellösung	Western-Blot	0,815 ml Rotiphorese® Gel 30, 1,564 ml TrisBase-Stammlösung pH 6,8, 3,813 ml Aqua ad iniectabilia 31,3 µl APS 10% 6,25 µl TEMED
Blockpuffer (5%)	Western-Blot	2 g Membrane Blocking Agent, 40 ml TBS-Tween Puffer (pH 7,7)
RIPA Cell Lysis Puffer	Zellkultur, Western-Blot	1000 µl Cell Lysisbuffer (10x), 100 µl PMSF, 8900 µl Aqua ad iniectabilia
10x HEPES Puffer	HPLC	Hepes 1M, NaCl 132mM, Glucose 5,0mM, KCL 4,0mM, MgCl2 0,49mM, CaCl2 1,0mM, Aqua ad iniectabilia  (pH 7,4 bei 37°C mit NaOH einstellen und bei -80°C aufbewahren)
HEPES-Dihydroethidium (DHE)-Lösung	HPLC	1xHEPES-Puffer, DHE 25mM
3,4-Dihydroxymizsäure-Lösung	Zellkultur, HPLC	3,4-Dihydroxymizsäure (10 ng/ml), 100%Methanol
mobile Phase/Eluent der HPLC	HPLC	Oktansulfonat (30 mg/l), 85% (w/v) Phosphorsäure, auf pH 2.7 eingestelltes NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7 g/l), 35% (v/v) Acetonitril  (das Eluent wurde mittels 0,45 µm Filter von Millipore gefiltert und vor Gebrauch Vakuum entgast)
Annexin-V-Lösung	FACS	20 µl Annexin-V-Fluos labeling reagent , 1 ml Hepes-Inkubationspuffer  (bei den Reagenzien sind im Annexin-V-Fluos Staining Kit enthalten)

**Tabelle 5: verwendete Puffer und Lösungen**

### 3. Antikörper

Antigen	Hersteller	Spezies; Typ	Anwendung
Caspase-3	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen; polyklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
Caspase-7 (C7)	Cell Signaling Technology, Inc.	Maus; monoklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
Caspase-8	Cell Signaling Technology, Inc.	Maus; monoklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
FADD	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen; polyklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
GAPDH	Abcam plc	Maus; monoklonal	1:50000; 30min; Raumtemperatur
MRP1, clone MRPr1, (IgG2a)	Kamiya Biomedical	Ratte; monoklonal	1:50; 90min; Raumtemperatur
p38MAPK	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen; polyklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
phospho-FADD	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen; polyklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
phospho-p38MAPK	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen; polyklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
phospho-SAPK/JNK	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen; monoklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C
SAPK/JNK (56G8)	Cell Signaling Technology, Inc.	Kaninchen; monoklonal	1:1000; über Nacht bei 4°C

**Tabelle 6: verwendete Primärantikörper**

Die entsprechenden Sekundärantikörper für die Immundetektion sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Mouse HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc.	1:10000; 60min; RT
Anti-Rabbit HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc.	1:10000; 60min; RT
Anti-Rat HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc.	1:2000; 60min; RT

**Tabelle 7: verwendete Sekundärantikörper**

#### 4. siRNA

Gen	Sequenz 5`→3`	Firma/Hersteller
Negative-Silencer-siRNA	von Ambion nicht veröffentlicht	Ambion, Inc.
siABCC1 (MRP1-siRNA)	sense: GGU GUU AUA CAA GAC CUU U antisense: AAA GGU CUU GUA UAA CAC C	Ambion, Inc.

**Tabelle 8: verwendete siRNA**

#### 5. Zelllinien

Für die Versuche wurden ausschließlich **humane aortale Endothelzellen (HAEC)** der Firma LONZA Group Ltd. (Basel, Schweiz) verwendet. Es handelt sich hierbei um primäre Endothelzellen aus der Aorta, welche von der Firma aus humanem Gewebe (aortales Endothel) isoliert und im Labor bei  $-196\text{ °C}$  in flüssigem Stickstoff für die weitere Anzucht aufbewahrt wurden.

#### 6. Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
0,45-µm-Filter	Millipore, Merck KGaA
1ml Einmalspritzen; Omnifix®	Braun Melsungen AG
Acrodisc® CR 4mm Syringe-Filter	Pall Corporation
Amersham™ Hyperfilm ECL (5 × 7 inches)	GE Healthcare
Analysezelle Modell 5011	ESA, Inc.
C-18-Umkehrphasen-Säule (Nucleosil 250, 4,5mm Säulendurchmesser, 5µm Partikeldurchmesser)	Sigma-Aldrich Co.
Cell Scraper, steril	SPL Life Sciences Co.
Costar stripette (verschiedene Größen)	Corning, Inc.
Criterion™ Blotter Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Eppendorf Stößel	Eppendorf AG
FACSCalibur	BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company
FACS-Röhrchen	BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company
Filter-Tips, Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Sarstedt AG & Co.
Gewebekulturflasche, steril, 250ml, mit Filter	Greiner Bio-One GmbH
Gewebekulturplatte 6well, steril, mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One GmbH

## II. Material

Gewebekulturplatte 96well, steril, mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One GmbH
HERAcell CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Immun-Blot™ PVDF Membrane for Protein Blotting (0,2µm)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Mastercycler gradient	Eppendorf AG
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
PCR-Tubes, ultraAMP PCR Products, 0,65ml	Sorenson™ Bioscience, Inc.
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences GmbH
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf AG
Power Pac™ 300	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf AG
Safe-Lock Tubes 2,0ml	Eppendorf AG
Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Inc.
Tischzentrifuge DW-41	Qualitron, Inc.
Universal 320R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen - Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.

**Tabelle 9: verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien**

## 7. Software

Software name	Hersteller
CELLQuest, Version 3.1f	BD Biosciences; Becton, Dickinson and Company
Corel Paint Shop Pro Photo X2	Corel Corporation
GraphPad Prism 4	GraphPad Software Inc.
ImageJ 1.42q	National Institutes of Health, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2007	Microsoft Corporation
EZChrom™ Chromatography Data System Version 6.5	Scientific Software, Inc.

**Tabelle 10: verwendete Software**

## III. Methoden

### 1. Zellkultur

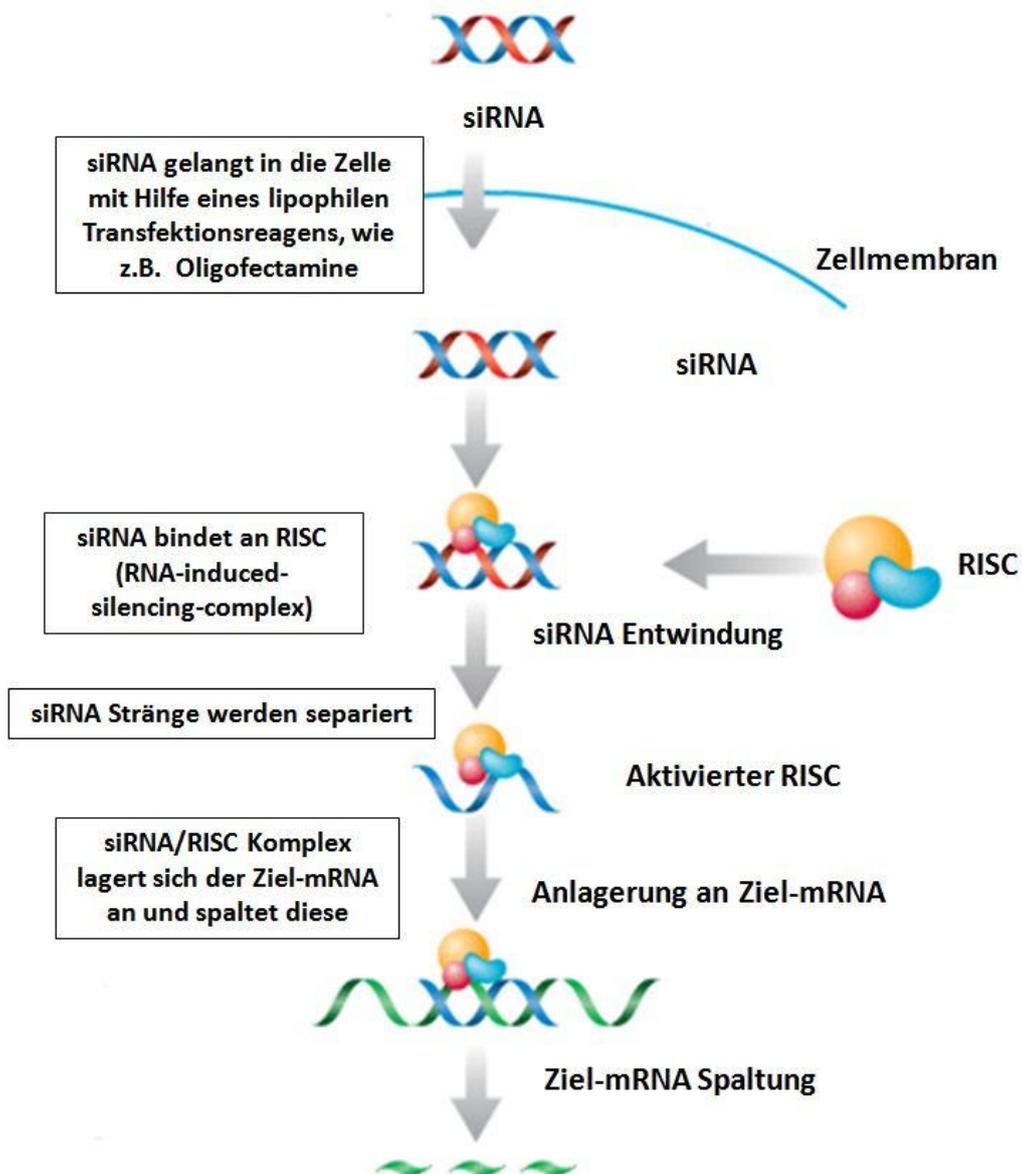
#### 1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen (HAEC)

Die Kultivierung der HAEC erfolgte in T75-Flaschen bei 37° C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% im Inkubator (HERAcell CO<sub>2</sub> Incubator). Als Standardmedium diente das antibiotikahaltige Endothelzell-Basal-Medium-2 (EBM-2) mit einem FBS-Gehalt (fetal bovine serum) von 2%. Des Weiteren enthielt das Medium geringe Mengen an Hydrokortison, Wachstumsfaktoren, Ascorbinsäure, Gentamicin, Amphotericin B sowie Heparin und wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Konfluente HAEC wurden entweder zur weiteren Verwendung auf 6-Loch-Platten oder wieder in neue T75-Flaschen passagiert. Hierbei wurden die Endothelzellen zweimal mit sterilem DPBS gewaschen, mit 0,5% Trypsin-EDTA (1,5ml pro Flasche) abgelöst, wieder in das Kulturmedium aufgenommen und entsprechend in die zuvor gelatinierten (0,05% Gelatine) neuen Flaschen bzw. 6-Loch-Platten überführt.

#### 1.2 RNA-Interferenz

Unter RNA-Interferenz oder auch kurz RNAi bzw. RNA-Silencing versteht man einen natürlichen Mechanismus in eukaryotischen Zellen, welcher den Zellen eine zielgerichtete Abschaltung bestimmter Gene ermöglicht. RNAi beruht auf der Wechselwirkung zwischen kurzen RNA-Stücken (siRNA) und der entsprechenden mRNA, deren Funktion das Übertragen von Erbinformation ist. Mit Hilfe mehrerer Enzymkomplexe (RISC, RNA-induced-silencing-complex) wird die mRNA dann gespalten und dadurch die Translation der Erbinformation am Ribosom verhindert (siehe Abb. 4). Dies führt dazu, dass das entsprechende Protein erst gar nicht gebildet wird (Fire, Xu et al. 1998; Mello and Conte 2004). In den Biowissenschaften hat sich die RNA-Interferenz als molekularbiologische Methode zur Stilllegung von bestimmten Genen

(„Gen-Knockdown“) etabliert. Um die applizierte siRNA über die Zellmembran zu transportieren wurden spezielle Transfektionsverfahren entwickelt. In dieser Arbeit wurde für die HAEC das Transfektionsreagens Oligofectamine verwendet, welches die jeweilige siRNA (MRP-1 siRNA, Negative Silencer siRNA) bindet und diese aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften über die Zellmembran transportiert.



**Abbildung 4:** RNA-Interferenz Methodik

### **1.2.1 Transfektion der HAEC mit MRP-1 siRNA und Negative Silencer**

#### **siRNA**

Um HAEC mit siRNA zu transfizieren hat sich der Einsatz von Zellen der Passagen 4-8 und des Transfektionsreagenz Oligofectamine als optimal erwiesen. Die Zellen wurden, nachdem sie auf 6-Loch-Platten passagiert wurden, so lange im Inkubator aufbewahrt bis sie eine Konfluenz von ca. 70-80% erreicht haben.

Folgender Ansatz bezieht sich auf die Transfektion von je zwei 6-Loch-Platten mit MRP1- bzw. Neg.-siRNA:

Zuerst wurden je 6µl MRP1- bzw. Neg.-siRNA mit jeweils 2214µl OptiMEM in je einem Mikrozentrifugengefäß verdünnt. Danach wurde in einem weiteren Mikrozentrifugengefäß die Transfektionsreagenzverdünnung vorbereitet, indem man 75µl Oligofectamine mit 300µl OptiMEM mischte und dann bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten inkubieren ließ. Von diesem Oligofectamine-OptiMEM-Gemisch wurden dann jeweils 180µl zu den beiden siRNA-Verdünnungen gegeben, bei Raumtemperatur für 15-20 Minuten inkubiert und dann mit jeweils 9,6ml warmen OptiMEM (37°C) versetzt. Daraufhin wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit warmen DPBS gewaschen und in jede Vertiefung der 6-Loch-Platten 1ml der Gemische (entweder MRP1- oder Neg.-siRNA) gegeben, was in der Umgebung der Zellen für eine finale siRNA-Konzentration von 25nM sorgte. Die Zellen wurden danach für 4 Stunden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 4 Stunden wurden in jede Vertiefung noch 2ml EBM2-Medium gegeben. Dieser Vorgang wurde dann 48 Stunden später im Rahmen einer Retransfektion noch einmal wiederholt.

### **1.3 Applikation von N-Acetylcystein**

N-Acetylcystein (NAC) ist ein bekanntes Pharmakon und Antioxidans. Seine Hauptwirkung wird zwei Mechanismen zugeschrieben. Zum einen hat NAC eine direkte antioxidative Wirkung über seine SH-Gruppe. Des Weiteren hat NAC eine indirekte antioxidative Wirkung, da nach Deacetylierung die Aminosäure Cystein vermehrt für

die intrazelluläre Synthese von GSH bereitgestellt wird. Diese Mechanismen konnten auch für in-vitro Versuche an Endothelzellen bestätigt werden (Cotgreave, Moldeus et al. 1991). Für diese Arbeit erfolgte die Gabe von NAC auf 100% konfluente HAEC in 6-Loch-Platten.

Es wurden ausschließlich Zellen verwendet, an denen zuvor keine Transfektion vorgenommen wurde. Hierfür wurden die Zellen vor der Gabe von TNF- $\alpha$ /CHX für eine Stunde mit im Medium gelöstem NAC in einer Konzentration von 10mmol/ml inkubiert.

#### **1.4 Applikation von TNF- $\alpha$ und Cycloheximid**

Um bei den Versuchszellen den natürlichen Zelltod einzuleiten wurde TNF- $\alpha$  in Kombination mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) auf die Zellen gegeben. Dies geschah bei Zellen, die nach zweimaliger Transfektion eine Konfluenz von 100% erreicht haben oder ohne Transfektion zuvor mit NAC behandelt wurden. Hierbei wurden TNF- $\alpha$ /CHX entweder gar nicht (Kontrolle) oder 3 bzw. 6 Stunden vor der Zellernte dem zellumgebenden Medium beigemischt, um verschiedene Proben zum Vergleich zu erhalten. Die verwendeten Endkonzentrationen im Medium waren 10ng/ml TNF- $\alpha$  bzw. 10 $\mu$ g/ml CHX.

#### **1.5 Gewinnung der Zellproben (Zellernte)**

##### **1.5.1 Zellproben für den Western-Blot**

Zur Gewinnung der Zellproben für den Western-Blot wurden die Zellen in den 6-Loch-Platten zweimal auf Eis mit kaltem DPBS gewaschen und dann in RIPA Cell-Lysispuffer lysiert. Von diesem wurden jeweils 200 $\mu$ l in jede Vertiefung gegeben. Dann wurden nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten die Zellen mit einem Zellschaber von der 6-Loch-Platte gelöst und in Mikrozentrifugengefäße (Safe-Lock-

Tubes, Eppendorf) überführt. Die Proben wurden mittels einer Tischzentrifuge (Qualitron) kurz zentrifugiert und anschließend gevortext.

Die unlöslichen Reste der lysierten Zellen wurden daraufhin durch zehninütige Zentrifugation (Universal 320R von Hettich) bei 12000 U/min und 4°C entfernt. Die Lagerung der Proben erfolgte in Kühlfächern bei -20°C.

#### **1.5.2 Zellproben für die HPLC-Analyse**

Für die HPLC-Messungen wurden die HAEC zweimal auf Eis mit kaltem DPBS gewaschen und unter Lichtschutz, in 2ml Hepes-DHE-Lösung pro Vertiefung der 6-Loch-Platte, für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lösung wieder abgesaugt und die Zellen wiederum zweimal mit kaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurde 200µl 3,4-Dihydroxizimtsäure-Lösung in jede Vertiefung der 6-Loch-Platten gegeben, die Zellen mittels Zellschaber abgelöst und in Mikrozentrifugengefäße (Safe-Lock-Tubes, Eppendorf) überführt.

Die Proben wurden mittels einer Tischzentrifuge (Qualitron) kurz zentrifugiert und anschließend gevortext. Daraufhin wurden die Zellen mit einem Eppendorf-Stößel zerkleinert. Die Mikrozentrifugengefäße mit den zerkleinerten Zellen wurden nun gevortext und anschließend bei 12000 U/min und 4°C für 12 Minuten zentrifugiert (Universal 320R von Hettich). Der Überstand, der durch die Zentrifugation entstand, wurde mittels 1ml Omnifix-Einmalspritzen entnommen, durch einen auf die Spritzen aufgesetzten Filter (Acrodisc CR 4mm Syringe-Filter) gefiltert und anschließend wieder in neuen Mikrozentrifugengefäßen aufgenommen.

Die Proben wurden bis zu den Messungen in einem Kühlfach bei -80°C gelagert. Die dem Stößel noch anhaftenden Proteine wurden in 150µl 1M NaOH aufgelöst und für eine Proteinbestimmung (siehe III/2.) verwendet. Diese Proteinbestimmung erfolgte, um die später in der HPLC gemessenen Werte zu normalisieren.

### **1.5.3 Zellproben für die FACS-Analyse (Annexin-V-Fluorescein Analyse)**

Für die FACS-Analyse wurden die HAEC zweimal auf Eis mit kaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurde in jede Kammer der 6-Loch-Platten 100µl der Annexin-V-Lösung pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Lösung wieder abgesaugt, die Zellen einmal mit kaltem DPBS gewaschen und vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers in 0,5ml HEPES-Inkubationspuffer (Bestandteil des Annexin-V-FLUOS Kit) in die FACS-Röhrchen aufgenommen und der FACS-Analyse (siehe III./5.) zugeführt.

## **2. Proteinbestimmung nach Bradford**

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt. Dessen Prinzip beruht auf der Methode nach Bradford, die darin besteht, dass der Farbstoff Coomassie-Blau mit basischen und aromatischen Aminosäuren reagiert und dadurch das Absorptionsmaximum der gelösten Proteine von 465nm hin zu 595nm verschiebt. Hierzu wurden 10µl jeder Probe mit 90µl destilliertem Wasser verdünnt und dann jeweils 10µl dieser Probenverdünnungen als Tripletts nebeneinander auf eine 96-Loch-Platte übertragen. Des Weiteren wurde zur Erstellung einer Eichkurve eine definierte Verdünnungsreihe des Bio-Rad Protein Assay Standards [1,48 mg/ml] angesetzt und ebenfalls je 10µl in Tripletts auf die 96-Loch-Platte übertragen. Daraufhin wurde das Farbstoffkonzentrat (Bio-Rad Protein Assay) 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und dann jeweils 200µl der Farbstoffkonzentratverdünnung pro Vertiefung in die 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend wurde nach einer Inkubationszeit von 2-3 Minuten die Absorption bei 595nm am Microplate-Reader gemessen und daraus die aus einem Tripletts gemittelte Proteinkonzentration ermittelt.

### **3. Western-Blot**

Beim Western-Blot handelt es sich um ein international etabliertes molekularbiologisches Verfahren zum selektiven Nachweis und zur Quantifizierung bestimmter Proteine innerhalb einer biologischen Probe. Hierbei werden die Proteine zuerst entsprechend ihrem Molekulargewicht im Rahmen einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend folgte im Rahmen eines Blotting-Verfahrens, der Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) und der Nachweis der Proteine auf der Membran mittels Antikörperassoziierter Immunofärbung. Um später eine gute visuelle Vergleichbarkeit des Blots zu ermöglichen, wurde für die einzelnen Versuche der Proteingehalt der verwendeten Proben nach einer zuvor durchgeführten Proteinbestimmung (siehe III./2.) ausgeglichen.

#### **3.1 SDS-PAGE**

Zur Auftrennung der Proteinproben wurde ein Polyacrylamidgel in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Biorad, Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System) verwendet. Zur Herstellung des Trenngels wurde eine Trenngellösung (7,5%, 10%, 12% oder 15% Polyacrylamid, Ansatz der Lösung: siehe II./2.) angesetzt, deren Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED gestartet wurde. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit Sammelgel (Ansatz der Lösung: siehe II./2.) überschichtet und der Kamm eingesetzt. Die Proben wurden nach Ausgleich der Proteinkonzentration mit Sample-Puffer versetzt, für 5min bei 95°C gekocht und anschließend auf das polymerisierte Sammelgel aufgetragen. Schließlich wurden die Proteine so lange mittels Elektrophorese unter einer Spannung von 15-20V aufgetrennt bis der Sample-Puffer das gesamte Gel durchlaufen hat.

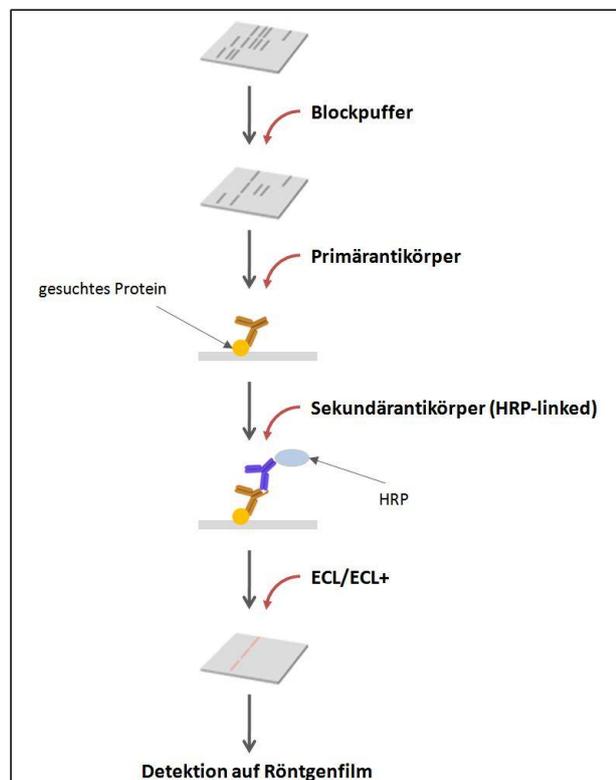
### 3.2 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer vertikalen Blotkammer (Biorad Mini Trans-Blot® Cell). Die Membran wurde nach Equilibrieren in 100 % Methanol in Transferpuffer getränkt und gemeinsam mit dem Gel wie folgt in die Blotkammer gelegt: Anode/ Whatman-Papier/ PVDF-Membran/ Gel/ Whatman-Papier/ Kathode. Das Blotting erfolgte für 1,5 Stunden auf Eis unter einer angelegten Spannung von 100 Volt.

### 3.3 Immunofärbung und Peroxidasennachweis

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran zunächst entweder über Nacht bei 4°C oder für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in Blockpuffer (5 % Amersham Blocking Agent (w/v) in TBS-T) geschwenkt. Nach 3x 5 Minuten Waschen der Membran in TBS-T folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper verdünnt in TBS-T. Je nach Antikörper geschah dies entweder bei 4°C über Nacht oder

bei Raumtemperatur für 0,5 - 1,5 Stunden (siehe auch II./3.). Nach erneutem Waschen (3x 5 Minuten) wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidasekonjugierten Sekundärantikörper (HRP-linked) ebenfalls verdünnt in TBS-T für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut für 3x 5 Minuten

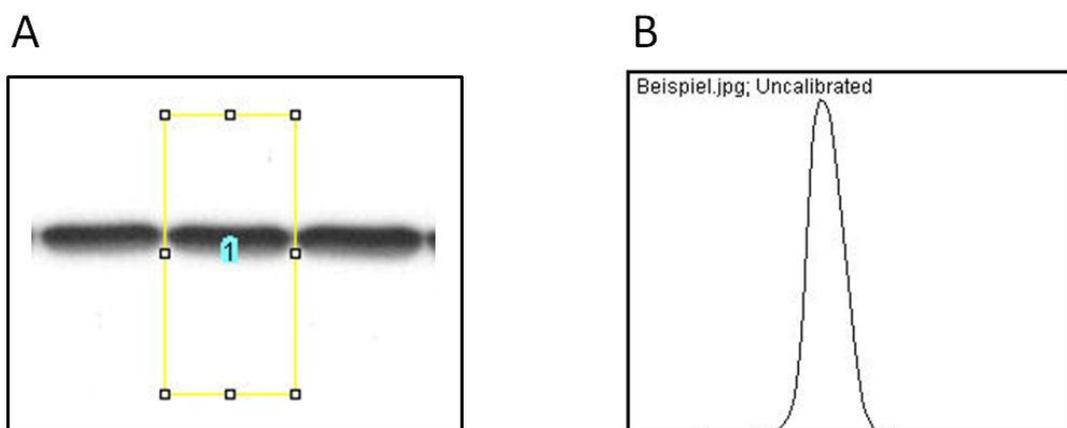


**Abbildung 5:** Schematischer Ablauf der Immunofärbung beim Western-Blot

in TBS-T gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Amersham) durchgeführt. Dieses System beruht darauf, dass die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase mit dem ECL-Substrat reagiert und bei dieser Reaktion Licht entsteht, welches mithilfe eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer nachgewiesen werden kann. Die mitgelieferten Lösungen wurden entweder im Falle des ECL-Systems zu gleichen Teilen gemischt und die Membran für eine Minute mit dem Gemisch inkubiert oder im Falle des ECL-plus-Systems 1:40 gemischt und die Membran dann 5min mit dem Gemisch inkubiert. Anschließend erfolgten verschieden lange Belichtungen (1 Sekunde – 30 Minuten) eines Röntgenfilms in einer lichtdichten Kassette.

### **3.4 Graphische Auswertung des Western-Blots**

Für die graphische Auswertung der Western-Blots wurde das Programm ImageJ verwendet. Hierbei wurden die einzelnen Banden der Western-Blots in vertikaler Richtung (siehe Abb.6/A) ausgewertet und als Graph aufgetragen. Für die Statistik wurde dann die jeweilige Fläche unter der Kurve der einzelnen Graphen (siehe Abb.6/B) bestimmt.



**Abbildung 6:** graphische Auswertung eines Western-Blots mittels ImageJ

**A:** vertikale Auswertung einer Western-Blot Bande

**B:** Graph einer ausgewerteten Bande

#### **4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

Die HPLC gehört zur Gruppe der Säulenchromatographien und kann zur Auftrennung und Analyse von diversen Stoffgemischen genutzt werden. Das Prinzip der HPLC gleicht anderen Chromatographie-Verfahren und basiert darauf, dass das zu untersuchende Stoffgemisch, in einer Flüssigkeit („Liquid“) enthalten, durch die Chromatographie-Säule gespült wird. Diese Flüssigkeit wird auch als mobile Phase der HPLC oder Eluent bezeichnet. Da sich die einzelnen Bestandteile der zu analysierenden Probe in ihrer Ladung, Polarität oder Größe unterscheiden, werden sie entsprechend diesen Eigenschaften in der Chromatographie-Säule, auch stationäre Phase der HPLC genannt, aufgetrennt. Die Genauigkeit der Auftrennung ist abhängig von der Wahl der Chromatographie-Säule. Je kleiner die Partikelgröße dieser Säulen ist, desto feiner lassen sich die einzelnen Bestandteile auftrennen (siehe Abb.7/B). Um die Auftrennung zu beschleunigen wird die mobile Phase mittels eines Pumpsystems unter einem hohen Druck („High Performance“) durch die Chromatographie-Säule gepumpt. Die aufgetrennten Stoffe werden dann nach durchlaufen der stationären Phase mit einem Detektor erfasst und an einem Computer entsprechend ihrer Quantität in einem Graph aufgetragen.

##### **4.1 Funktionsweise und Aufbau des HPLC-Systems**

In unserem Labor war bereits eine sensitive Methode zur Messung von DHE, 2-Hydroxyethidium (2-OH-E<sup>+</sup>) und Ethidium (E<sup>+</sup>) etabliert, mit der man die intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration bestimmen konnte.

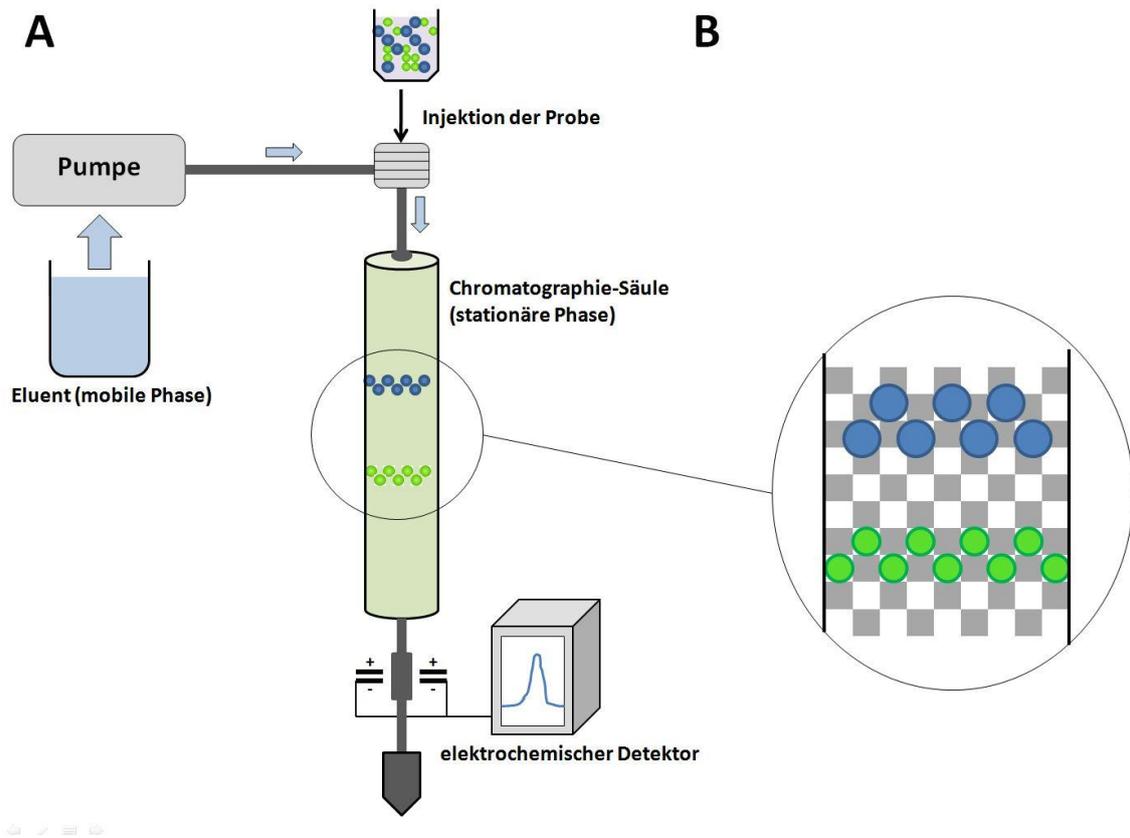
Es handelte sich dabei um ein System mit isokrater Auftrennung der Proben. Dies bedeutet, dass die mobile Phase zwischen den Messungen nicht verändert werden muss. Im Gegensatz hierzu wurden in der Literatur oftmals HPLC-Systeme beschrieben, welche mit dem Gradienten-System arbeiten, bei dem die mobile Phase während des Messvorgangs gewechselt wird (Fink, Laude et al. 2004; Fernandes, Wosniak et al. 2007). Dies hat den Vorteil, dass sich bei Substanzen, die stark verzögert aufgetrennt

werden, die Analysezeiten durch Veränderung der mobilen Phase stark verkürzen lassen. Allerdings benötigt man für diese Systeme zwei Pumpen und hat durch den Wechsel der Elutionsmittel eine höhere Fehleranfälligkeit bei den Messungen.

Für die von mir verwendete Methode der isokraten Auftrennung musste die mobile Phase während des Messvorgangs nicht verändert werden, es wurde folglich auch nur eine Pumpe benötigt. Das hatte zum einen eine geringere Fehleranfälligkeit zur Folge, aber auch den Vorteil, dass das System über einen längeren Zeitraum stabil bleibt. Es muss daher auch nicht gewartet werden bis sich das System nach einer Messung wieder stabilisiert hat, um eine erneute Messung zu tätigen. Um eine effektive Anwendung der isokraten Elution zu gewährleisten, musste somit erreicht werden, dass sich die einzelnen Substanzen in ihren Retentionszeiten (= Zeit von der Injektion bis zur Messung) nicht zu sehr unterscheiden, so dass keine Veränderung der mobilen Phase notwendig würde. Dies ist in unserem Labor für die Messung von DHE, 2-OH-E<sup>+</sup> und Ethidium gelungen.

Das verwendete HPLC-System (siehe Abb.7/A) bestand somit aus nur einer Pumpe, der mobilen Phase, einer C-18-Umkehrphasen-Säule (Nucleosil 250, 4,5mm Säulendurchmesser, 5µm Partikeldurchmesser; Sigma-Aldrich) und einem elektrochemischen Detektor (siehe III./4.3). Die Auftrennung erfolgte dann mit einer Flussrate von 0,9 ml/min bei Raumtemperatur.

Die tägliche Reinigung der Pumpe und des Detektors erfolgte unter Umgehung der Chromatographie-Säule mit destilliertem Wasser. Wurden über einen längeren Zeitraum keine Messungen durchgeführt, dann wurde das ganze System mit destilliertem Wasser und Methanol gereinigt.



**Abbildung 7:** HPLC-System;

**A:** Schematischer Aufbau des verwendeten HPLC-Systems mit nur einer Pumpe;

**B:** Schematischer Auszug aus der Chromatographiesäule - je nach Größe, Ladung und Polarität werden die einzelnen Bestandteile der Probe durch Interaktion mit den in der Säule enthaltenen Partikeln aufgetrennt

## 4.2 Die Messung von Superoxidanionen mittels Dihydroethidium (DHE)

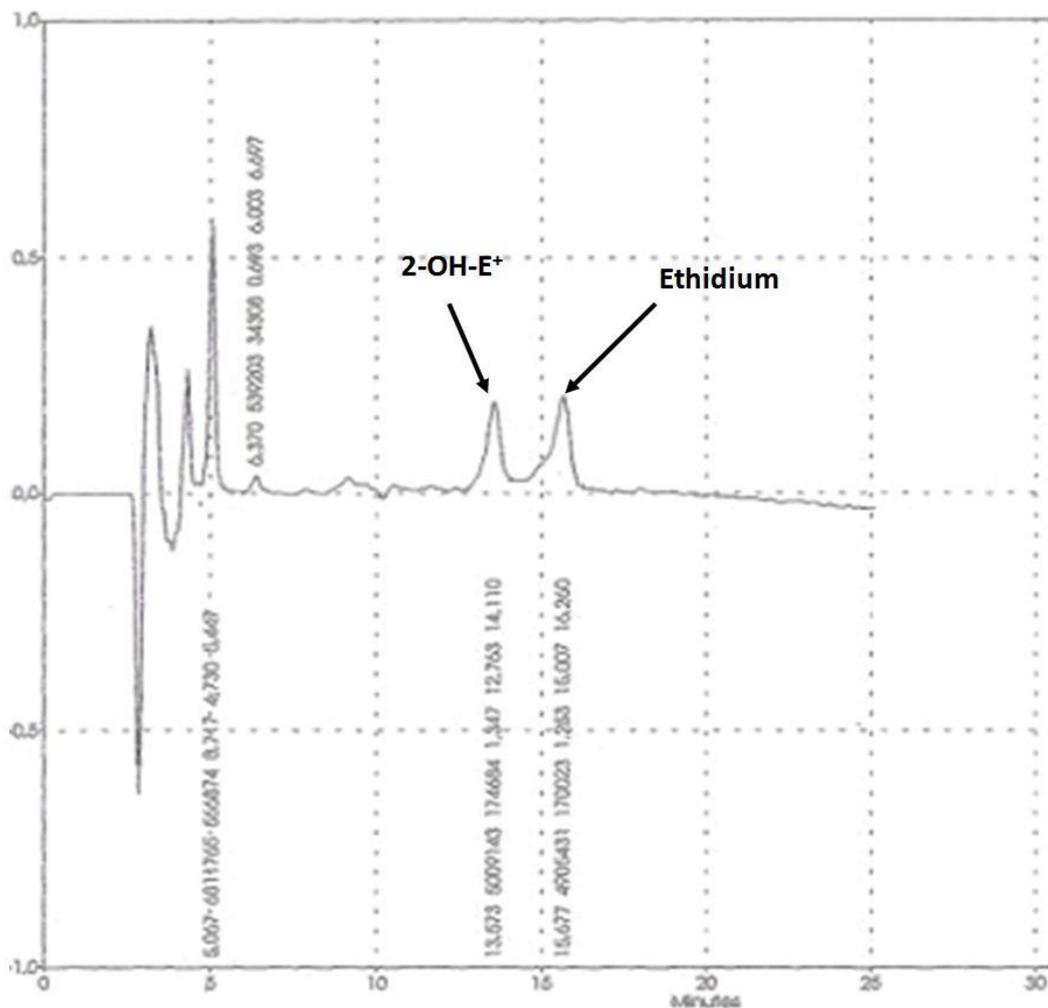
Die Messung der Produkte, welche aus der Reaktion zwischen DHE und  $O_2^{\cdot -}$  entstehen, ist eine bewährte Methode zur Messung der intrazellulären Superoxidanionen-Produktion. DHE wird durch  $O_2^{\cdot -}$  äußerst spezifisch zu  $2-OH-E^+$  oxidiert (Reaktionskonstante:  $2,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ). Dieses wiederum kann durch die HPLC nachgewiesen werden und ermöglicht somit eine relativ genaue Messung der Superoxidanionenkonzentration (Fink, Laude et al. 2004). Unabhängig von dieser Reaktion entsteht aus DHE mit Ethidium ein weiteres Oxidationsprodukt. Als Ursache

für die Oxidation von DHE zu Ethidium werden  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , redoxreaktive Metallionen oder Cytochrom C vermutet (Zhao, Joseph et al. 2005; Fernandes, Wosniak et al. 2007). Weiterhin gibt es Veröffentlichungen, die eine Lichtempfindlichkeit von DHE beschreiben (Zielonka, Vasquez-Vivar et al. 2006). Da es unter dem Einfluss von Licht zu vermehrter Oxidation von DHE und zu vermehrter Bildung von Ethidium kommen soll, wurden sämtliche Schritte in den Versuchen weitestmöglich im Dunkeln durchgeführt. Als optimales Lösungsmittel für die Proben hat sich Methanol erwiesen, da sich die Konzentration von  $2\text{-OH-E}^+$  in Methanol bei  $-20^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von bis zu einem Monat als äußerst stabil erwiesen hat (Fink, Laude et al. 2004). Ein Verdampfen (bei RT) des Lösungsmittels Methanol würde allerdings die Konzentration der zu messenden Substanzen fälschlicherweise ansteigen lassen. Daher wurde dem Methanol für die Versuche 3,4-Dihydroxymizinsäure in einer definierten Konzentration beigefügt, welches ebenfalls durch die verwendete HPLC-Methode nachgewiesen werden konnte und dessen Konzentration beim Verdampfen von Methanol im gleichen Maße ansteigen würde wie die Konzentration der zu messenden Substanz. Innerhalb einer Probe blieb somit der Quotient aus der zu messenden Substanz und 3,4-Dihydroxymizinsäure immer gleich groß.

#### **4.3 Elektrochemische Detektion und graphische Auswertung**

Für die Erfassung von DHE,  $2\text{-OH-E}^+$  und Ethidium wurde ein elektrochemischer Detektor (Analysezelle Modell 5011; ESA, Inc.) verwendet, welcher auf dem Prinzip der Coulometrie basiert. Die quantitative Messung beruht daher auf der Messung der elektrischen Ladung der jeweiligen Substanz, die an einer Arbeitselektrode umgesetzt wird. Dies stellt ein äußerst sensitives Messverfahren dar, mit dem auch kleinste Stoffmengen erfasst werden können. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde die erste Elektrode auf  $0,00\text{V}$  und die zweite Elektrode auf  $+0,35\text{V}$  eingestellt. Der Detektor lieferte dann entsprechend den im Stoffgemisch vorhandenen Substanzen und ihren Retentionszeiten eine Kurve (siehe Abb.8). Im Idealfall hat jede Substanz einen eigenen Peak und es kommt nicht zu Überlagerungen. Um die Retentionszeit für

die jeweiligen Stoffe zu definieren, musste diese zuvor anhand von Reinsubstanzen ermittelt werden. Für die graphische Auftragung wurde die Software EZChrom™ Chromatography Data System verwendet. In die Statistik ging der jeweilige Wert für die Fläche unter der Kurve des 2-OH-E<sup>+</sup> Peaks ein. Dieser wurde anhand des Proteingehalts der jeweiligen Probe normalisiert.



**Abbildung 8:** Beispielkurve einer HPLC-Analyse; Die Retentionszeiten von 2-OH-E<sup>+</sup> (ca. 14min) und Ethidium (ca. 16min) wurden zuvor mit Hilfe der jeweiligen Reinsubstanz ermittelt

## **5. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse = fluorescence activated cell sorting) ist ein etabliertes Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Es handelt sich bei der FACS-Analyse um eine spezielle Form der Durchflusszytometrie bei der Fluoreszenz-markierte Zellen detektiert und sortiert werden. Das allgemeine Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen, welche entstehen, wenn Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrom an einer Lichtquelle vorbeigeleitet werden.

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde ein FACSCalibur der Firma BD Biosciences verwendet. Das Zytometer arbeitet mit zwei Flüssigkeitssystemen, um zu gewährleisten, dass jeweils nur einzelne Zellen die Lichtquelle passieren. Eines dieser beiden Systeme ist ein Zuleitungssystem über das ein schnell fließender laminarer Transportstrom in der Messkammer erzeugt wird. Über eine zweite Kapillare wird dann die angesaugte Probe mit den darin enthaltenen Zellen in den Transportstrom eingebracht. Dadurch wird eine hydrodynamische Fokussierung der Zellen erreicht, was bedeutet, dass die Zellen einzeln und einander folgend im Zentrum des Transportstroms den Laserstrahl passieren.

Als Lichtquelle wurde bei den Messungen ein Argonlaser mit der Wellenlänge 488nm verwendet. Der Lichtstrahl dieses Lasers kreuzte die Messkammer rechtwinklig. Beim Auftreffen des Lichtstrahls auf die Zelle wird dieser gestreut, was als Seitwärtsstreuung (Side Scatter SSC) oder als Vorwärtsstreuung (Front Scatter FSC) detektiert werden kann. Außerdem kann der Laser fluoreszenzmarkierte Zellen im Rahmen der FACS-Analyse zur Fluoreszenz anregen, was dann ebenfalls detektiert werden kann.

### **5.1 Durchflusszytometrische Messung der Phosphatidylserin-Exposition (Annexin-V-Fluorescein Analyse)**

Im Verlauf der Apoptose kommt es zu diversen Veränderungen der Zelloberfläche. Ein frühes Merkmal der Apoptose ist z.B. der Verlust der asymmetrischen Anordnung der Membranphospholipide (Fadok, Voelker et al. 1992). Im Rahmen dieser Veränderung kommt es zur vermehrten Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite (Vermes, Haanen et al. 1995). Diese Tatsache macht man sich beim durchflusszytometrischen Nachweis apoptotischer Zellen zunutze. Durch Anfärbung der Zellen mit Annexin-V-Fluorescein, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin besitzt, können apoptotische Zellen nun nachgewiesen werden.

Da aber auch nekrotische Zellen aufgrund des Verlustes ihrer Membranintegrität Annexin-V-Fluorescein binden, gelingt hiermit nur der gemeinsame Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen.

Das Fluoreszenzsignal von Annexin-V-Fluorescein wurde mittels eines speziellen Filters bei einer Wellenlänge von 515nm detektiert. Die für die Messung in den FACS-Röhrchen vorbereiteten Proben (siehe III./1.5.3) wurden innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet.

### **5.2 Auswertung der FACS-Analyse**

Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mit der Software CELLQuest, V. 3.1f von der Firma BD Biosciences.

## **6. Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Versuche wurde das Programm GraphPad Prism 4 verwendet. Die Werte der einzelnen Gruppen wurden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt und mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Wurden in der ANOVA signifikante Unterschiede innerhalb der ermittelten Gruppen festgestellt, dann wurde anschließend der Student-Newman-Keuls Post-Hoc Test durchgeführt. Für den Vergleich von zwei einzelnen Gruppen wurde der Student's t-test verwendet. Die Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, falls  $p < 0,05$  war.

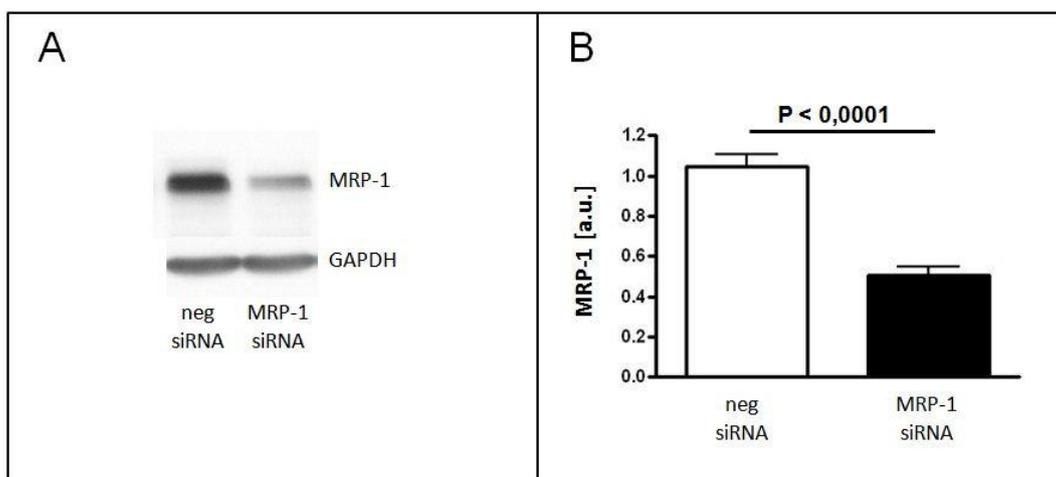
Um die gemessenen Werte der einzelnen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde zuvor der Mittelwert der basalen Kontrollen (neg. siRNA ctr. oder  $\emptyset$  NAC ctr.) in den einzelnen Versuchen gleich 1 gesetzt und die gemessenen Werte daran angeglichen. Die hierdurch entstandenen Werte wurden daraufhin in a.u. (arbitrary unit; willkürliche Einheit) angegeben.

Die Normalisierung der Werte erfolgte beim Western-Blot über ein mit ausgewertetes „housekeeping gene“ (GAPDH) oder bei Phosphorylisierungsnachweisen über die mit ausgewertete Gesamtfraktion des jeweiligen untersuchten Proteins. Bei der HPLC-Analyse wie auch bei der FACS-Analyse wurden die gemessenen Werte über den Proteingehalt der Proben normalisiert.

## IV. Ergebnisse

### 1. Überprüfung der Transfektionseffizienz

Zur Durchführung der weiteren Versuche musste eine suffiziente Herunterregulation des MRP-1 Proteins in den HAEC gewährleistet sein. Um dies zu erreichen, wurde als Methode die MRP-1 Proteinsynthesehemmung mittels RNA-Interferenz gewählt. Der Erfolg dieser Transfektions-Methode wurde kontrolliert, indem ein Teil der HAEC als Kontrolle mit der Negative-Silencer siRNA behandelt wurde. Diese Zellen wurden dann im Rahmen einer Western-Blot Analyse (siehe Abb. 9/A) den MRP-1 defizienten Zellen gegenübergestellt. Bei einer Anzahl von 12 Versuchen (n=12) konnte eine durchschnittliche Herunterregulation von MRP-1 um ca. 52% auf Proteinebene erreicht werden. Als „housekeeping gene“ wurde für die Versuche GAPDH verwendet. Die Mittelwerte für die Zellen, welche mit negative siRNA transfiziert wurden war  $1,045 \pm 0,05706$  a.u. (n=12) und für die Zellen, die mit MRP1 siRNA transfiziert wurden war er  $0,5047 \pm 0,04256$  a.u. (n=12). Nach statistischer Auswertung mittels student`s t-test (zweiseitig, ungepaart) war  $p < 0,0001$  (siehe Abb. 9/B).



**Abbildung 9: MRP-1 Western-Blot Analyse**

**A: MRP1 und GAPDH Western-Blot Banden (repräsentativ für alle Versuche)**

**B: Säulendiagramm der statistischen Auswertung (Mittelwerte ± SEM; Student`s t-test; n=12)**

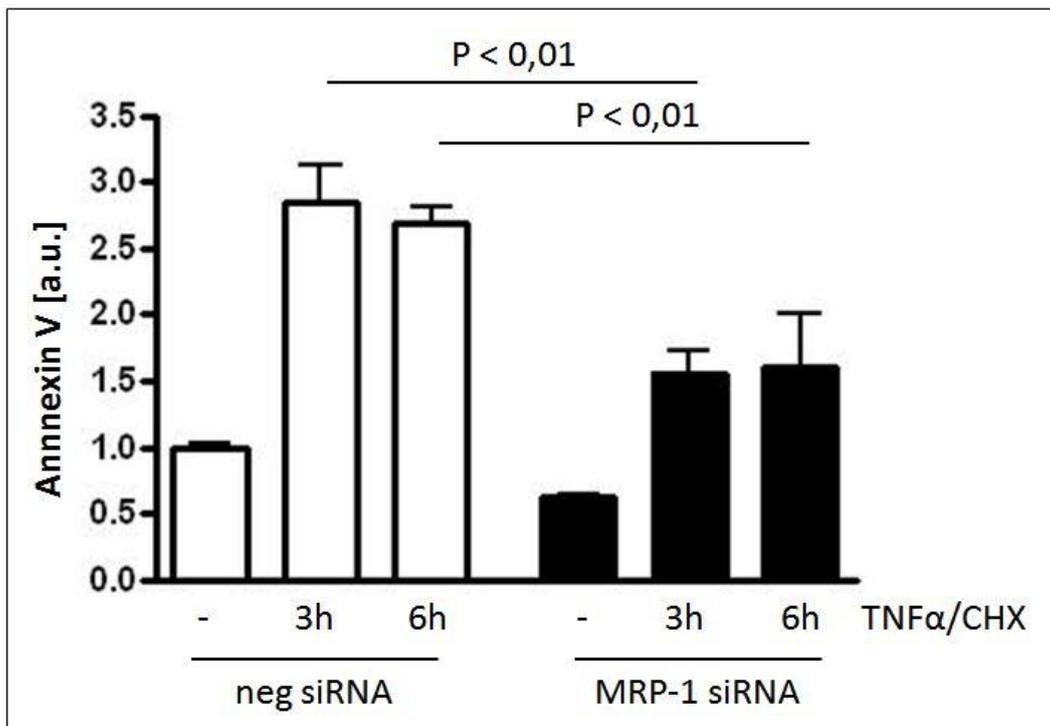
## **2. Der Effekt von MRP-1 siRNA und TNF- $\alpha$ /CHX auf die Apoptoserate von humanen aortalen Endothelzellen**

Anhand der gängigsten Apoptosemarker sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Suppression des MRP1 Proteins auf die Apoptoserate bei HAEC hat. Als Marker wurde hierbei zuerst Annexin-V-Fluorescein gewählt, ein fluoreszierendes Protein mit hoher Affinität zum Phospholipid Phosphatidylserin, welches durch die durchflusszytometrische FACS-Analyse quantifiziert werden konnte. Weitere Versuche sollten mittels Nachweis der Caspase-3 Spaltungsrate ebenfalls die Apoptoserate aufzeigen. Bei den Versuchen wurde die Apoptose durch Gabe von TNF- $\alpha$ /CHX über den extrinsischen Apoptoseweg induziert. Die Zellen wurden entweder drei oder sechs Stunden mit TNF- $\alpha$ /CHX inkubiert und in den Auswertungen unbehandelten Kontrollzellen gegenübergestellt.

### **2.1 FACS-Analyse der Phosphatidylserin-Exposition mittels Annexin-V-Fluorescein Färbung**

Ein sehr spezifisches Ereignis beim Ablauf des intrazellulären Apoptosevorganges ist die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran der apoptotischen Zellen. Mittels Annexin-V, ein Protein, das hochaffin zu Phosphatidylserin ist, lässt sich dieses auf der Außenseite der Zellmembran markieren und durchflusszytometrisch nachweisen. In den Versuchen dieser Arbeit sollten HAEC, welche mit MRP-1 siRNA transfiziert wurden, den mit Negative-Silencer siRNA transfizierten Kontrollzellen gegenüber gestellt werden. Die jeweiligen Apoptoseraten sollten basal, nach drei Stunden und nach sechs Stunden Inkubation mit TNF- $\alpha$ /CHX ermittelt und die einzelnen Gruppen nach einer ANOVA im Newman-Keuls Post-hoc Test verglichen werden (siehe Abb. 10). Basal konnte kein signifikanter ( $p > 0,05$ ) Unterschied der Apoptoserate zwischen den MRP-1 defizienten und den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Nach dreistündiger Inkubation mit TNF- $\alpha$ /CHX zeigte sich im Newman-Keuls Test statistisch ein hoch signifikanter

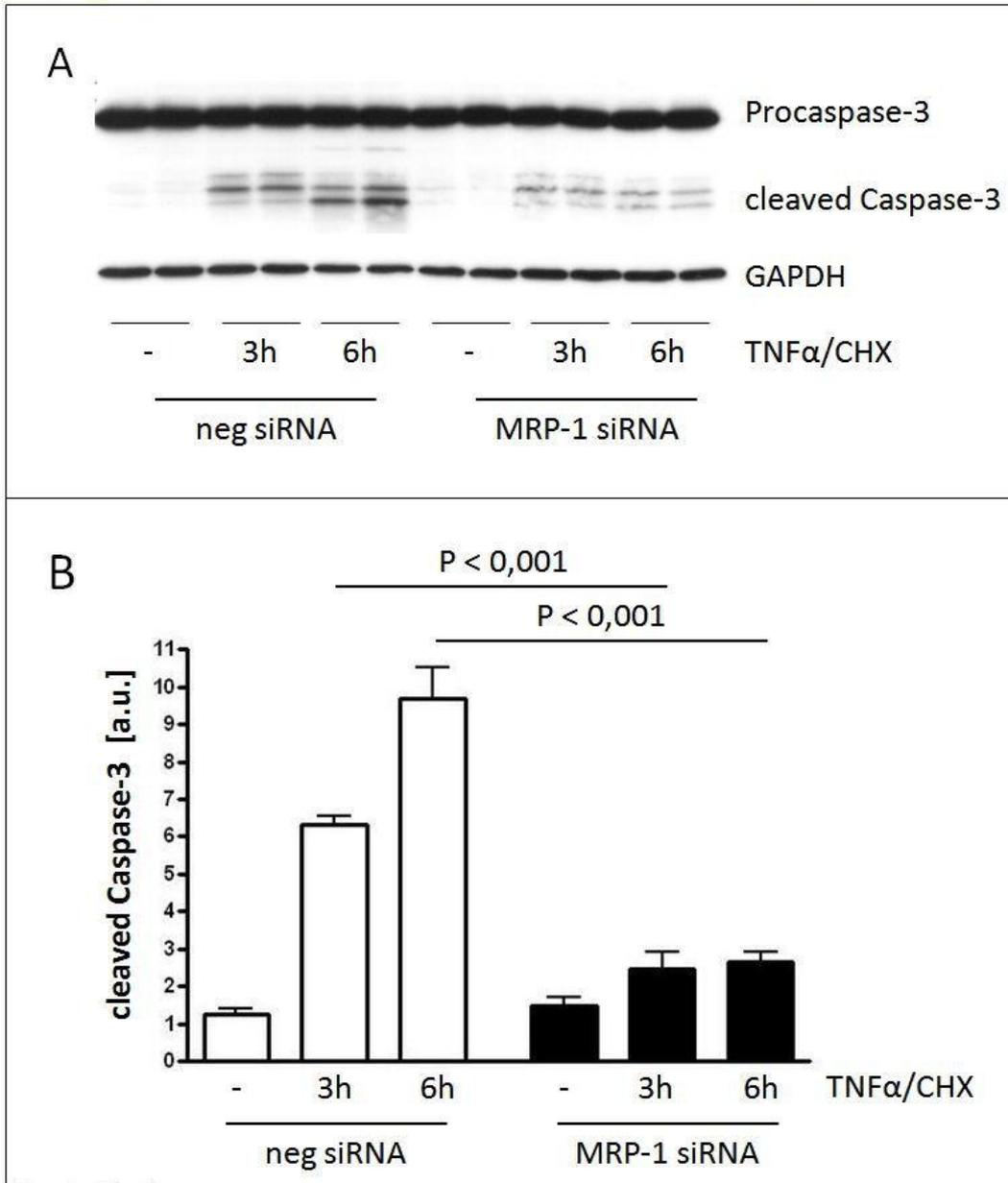
Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den MRP-1 defizienten Zellen und den Kontrollzellen, womit also eine hoch signifikante Reduzierung der Apoptoserate in den MRP-1 defizienten HAEC gegenüber den Kontrollzellen nach dreistündiger Inkubation mit  $\text{TNF-}\alpha/\text{CHX}$  nachgewiesen werden konnte. Analog hierzu war nach sechsstündiger Inkubation der Zellen mit  $\text{TNF-}\alpha/\text{CHX}$  ebenfalls eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Reduzierung der Annexin-V Anfärbung und somit der Apoptoserate in den MRP-1 defizienten HAEC gegenüber ihren Kontrollzellen zu erkennen.



**Abbildung 10: Annexin-V-Fluorescein FACS-Analyse**  
 Säulendiagramm der statistischen Auswertung  
 (Mittelwerte  $\pm$  SEM; ANOVA, Newman-Keuls Test; n=3-4)

## **2.2 Western-Blot Analyse der Caspase-3 Spaltungsrate**

Um ergänzend zum Nachweis von Annexin-V-Fluorescein eine spezifischere Aussage über die Apoptoserate in den HAEC treffen zu können, wurde zusätzlich eine Western-Blot Analyse der Caspase-3 Spaltungsrate durchgeführt (siehe Abb.11/A). Die Spaltung der Caspase-3 stellt aufgrund ihrer Rolle als Effektorcaspase die Endstrecke der rezeptorvermittelten Apoptose dar, wie sie z.B. nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  abläuft. Daher ist die Quantifizierung der Caspase-3 Spaltungsrate ein sehr gutes und spezifisches Maß, um die Apoptoserate in den Zellen abzuschätzen. Um den Einfluss von MRP-1 auf die TNF- $\alpha$ -vermittelte Apoptose darzustellen, wurden innerhalb dieser Versuchsreihe wiederum mit MRP-1 siRNA transfizierte HAEC Kontrollzellen gegenübergestellt, welche mit Negative-Silencer siRNA transfiziert wurden. Die ermittelten Werte wurden durch das „housekeeping gene“ GAPDH normalisiert. Die Caspase-3 Spaltungsrate wurde jeweils basal, nach drei- und nach sechsständiger Inkubation der HAEC mit TNF- $\alpha$ /CHX ermittelt und die einzelnen Gruppen nach einer ANOVA mittels des Newman-Keuls Post-Hoc Tests verglichen (siehe Abb.11/B). Zwischen den MRP-1 defizienten HAEC und den Kontrollzellen bestand basal kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der Caspase-3 Spaltungsrate. Nach drei- und sechsständiger Applikation von TNF- $\alpha$ /CHX erhöhte sich die Caspase-3 Spaltungsrate und somit die Apoptoserate bei den Kontrollzellen höchst signifikant (jeweils  $p < 0,001$ ) gegenüber der basalen Rate, was dem Effekt von TNF- $\alpha$ /CHX zuzuschreiben ist. Im Vergleich mit den Kontrollzellen ergab sich bei den MRP-1 defizienten Zellen nach dreistündiger Inkubation mit TNF- $\alpha$ /CHX eine höchst signifikante Reduzierung ( $p < 0,001$ ) der Caspase-3 Spaltungsrate. Nach sechsständiger Inkubation der HAEC mit TNF- $\alpha$ /CHX reduzierte sich die Caspase-3 Spaltungsrate der MRP-1 defizienten Zellen gegenüber der Rate in den Kontrollzellen ebenfalls höchst signifikant ( $p < 0,001$ ). Somit konnte nach dem Nachweis einer reduzierten Annexin-V Anfärbbarkeit der MRP-1 defizienten HAEC unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$ /CHX auch der Nachweis erbracht werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in den Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen auch zu einer Reduktion der Caspase-3 Spaltungsrate führt.



**Abbildung 11: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-3 (MRP-1 siRNA)**

**A:** Western-Blot Banden cleaved Caspase-3 und GAPDH (repräsentativ für alle Versuche)

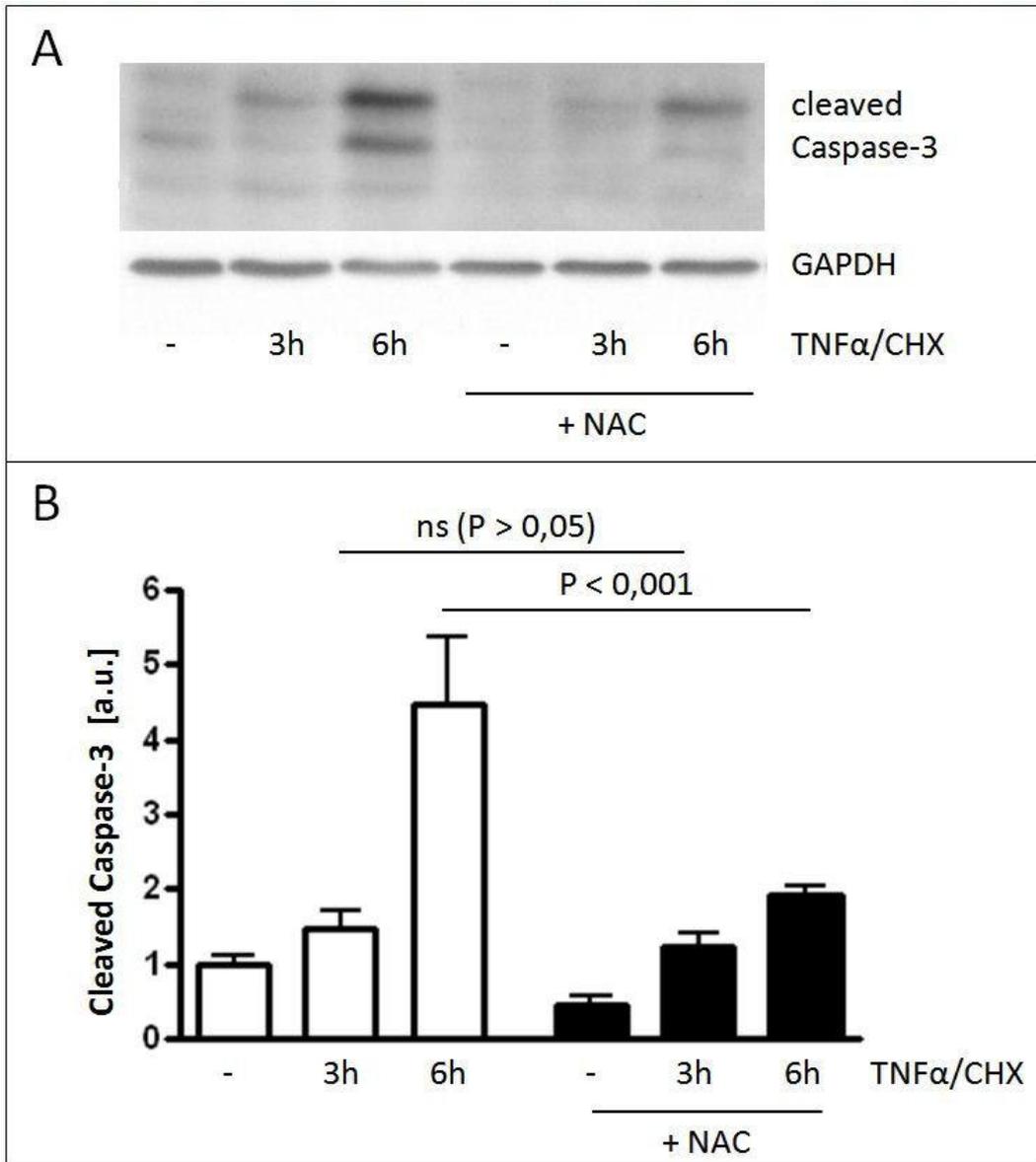
**B:** Säulendiagramm der statistischen Auswertung

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; ANOVA, Newman-Keuls Test; n=4)

### **3. Effekt von N-Acetylcystein und TNF- $\alpha$ /CHX auf die Caspase-3**

#### **Spaltungsrate (Western-Blot Analyse)**

Der Effekt von N-Acetylcystein auf die Caspase-3 Spaltungsrate der HAEC unter Einfluss von TNF- $\alpha$ /CHX sollte ermittelt werden, um abschätzen zu können, welche Rolle das Antioxidans Glutathion bei der Apoptose-reduzierenden Wirkung einer MRP-1 Defizienz in den Zellen spielen könnte, da NAC als Vorläufersubstanz für Glutathion gilt. Für die Versuche wurden mit NAC vorbehandelte HAEC mit unvorbehandelten Kontrollzellen verglichen und jeweils die Werte der Caspase-3 Spaltungsrate mittels Western-Blot (siehe Abb.12/A) basal, nach drei- und nach sechstündiger Inkubation mit TNF- $\alpha$ /CHX bestimmt. Die ermittelten Werte wurden durch das „housekeeping gene“ GAPDH normalisiert. Die einzelnen Gruppen wurden untereinander mittels einer ANOVA verglichen und danach mit dem Newman-Keuls Post-Hoc Test auf signifikante Unterschiede getestet (siehe Abb.12/B). Bei den basal ermittelten Werten zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) der Caspase-3 Spaltungsrate. Es war lediglich eine leichte nicht beweisfähige Tendenz zu erkennen, dass die mit NAC vorbehandelten Zellen bereits basal eine geringere Caspase-3 Spaltungsrate als die Kontrollzellen aufweisen könnten. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen in TNF- $\alpha$ /CHX konnte ebenfalls noch kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der Caspase-3 Spaltungsrate zwischen den mit NAC vorbehandelten und den unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden. Es war wiederum zwar eine leichte Tendenz zu erkennen, dass die mit NAC vorbehandelten Zellen nach drei Stunden TNF- $\alpha$ /CHX eine leicht reduzierte Apoptoserate aufweisen könnten, der statistische Beweis blieb allerdings aus. Nach sechstündiger Inkubation der Zellen in TNF- $\alpha$ /CHX zeigte sich dann allerdings eine höchst signifikante Reduzierung ( $p < 0,001$ ) der Caspase-3 Spaltungsrate in den mit NAC vorbehandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen. In den Versuchen gelang somit nur der teilweise Nachweis, dass NAC und damit vielleicht auch ein erhöhter intrazellulärer Glutathionspiegel die Apoptoserate unter Einfluss von TNF- $\alpha$ /CHX reduzieren kann.



**Abbildung 12: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-3 (NAC)**

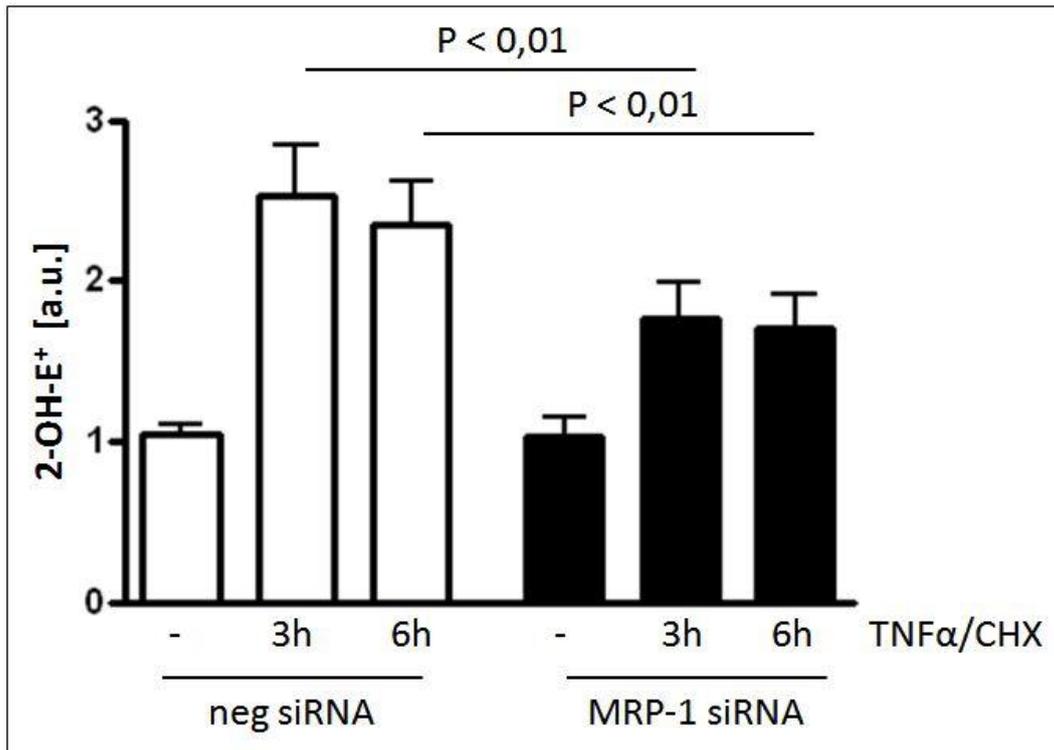
**A:** Western-Blot Banden cleaved Caspase-3 und GAPDH (repräsentativ für alle Versuche)

**B:** Säulendiagramm der statistischen Auswertung

(Mittelwerte  $\pm$  SEM; ANOVA, Newman-Keuls Test; n=5)

#### **4. Effekt von MRP-1 siRNA und TNF- $\alpha$ /CHX auf die intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration (DHE-HPLC)**

Im Verlauf dieser Arbeit sollte zusätzlich der Einfluss einer MRP-1 Defizienz in den HAEC auf die intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration unter Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX untersucht werden. Dies wurde mittels einer Dihydroethidium-HPLC Methode bewerkstelligt. Aufgrund der recht spezifischen Reaktion von Superoxidanionen mit DHE zu 2-OH-E<sup>+</sup> kann man über die Messung von 2-OH-E<sup>+</sup> indirekt die intrazelluläre Konzentration von Superoxidanionen bestimmen. Diese Messung wurde bei MRP-1 defizienten HAEC und mit Negative-Silencer siRNA transfizierten Kontrollzellen basal, nach drei- und nach sechsständiger Einwirkung von TNF- $\alpha$ /CHX durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden über den Proteingehalt der jeweilig gemessenen Probe normalisiert und die einzelnen Gruppen mittels ANOVA und nachfolgendem Newman-Keuls Post-Hoc Test auf signifikante Unterschiede untereinander getestet (siehe Abb.13). Basal war in den Kontrollen statistisch kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der intrazellulären Superoxidanionenkonzentration zwischen den MRP-1 defizienten Zellen und den Kontrollzellen auszumachen. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen in TNF- $\alpha$ /CHX war die Konzentration von Superoxidanionen in den MRP-1 defizienten Zellen hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) niedriger als in den Kontrollzellen. Aber auch nach sechsständiger Inkubation mit TNF- $\alpha$ /CHX war eine statistisch hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Reduzierung der Superoxidanionenkonzentration in den MRP-1 defizienten HAEC gegenüber den Kontrollzellen festzustellen. Somit konnte der statistische Nachweis erbracht werden, dass eine MRP-1 Defizienz in den HAEC sowohl nach drei- als auch nach sechsständiger Wirkung von TNF-/CHX die intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration gegenüber den Kontrollzellen signifikant reduziert.

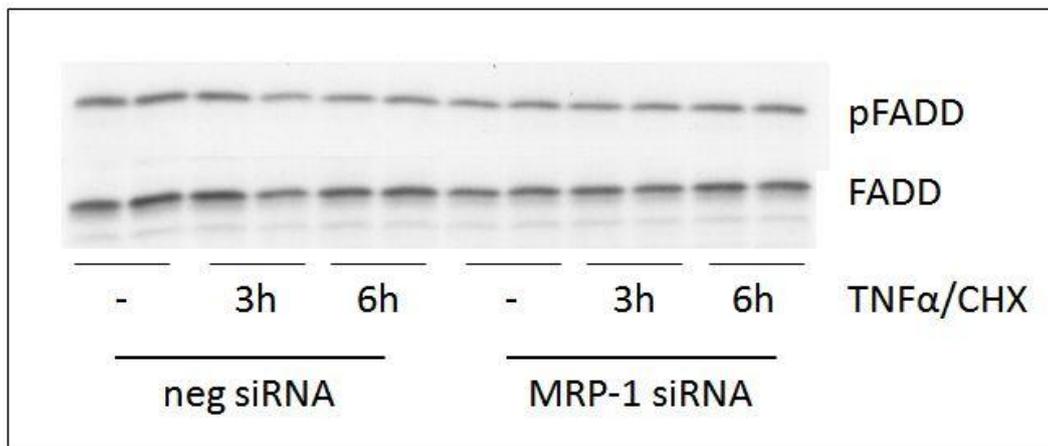


**Abbildung 13: Intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration (DHE-HPLC)**  
Säulendiagramm der statistischen Auswertung  
(Mittelwerte ± SEM; ANOVA, Newman-Keuls Test; n=4)

## 5. Einfluss von MRP-1 siRNA und TNF- $\alpha$ /CHX auf ausgewählte Proteine der TNF-R1 Signalkaskade

### 5.1 Western-Blot Analyse der FADD Phosphorylierungsrate

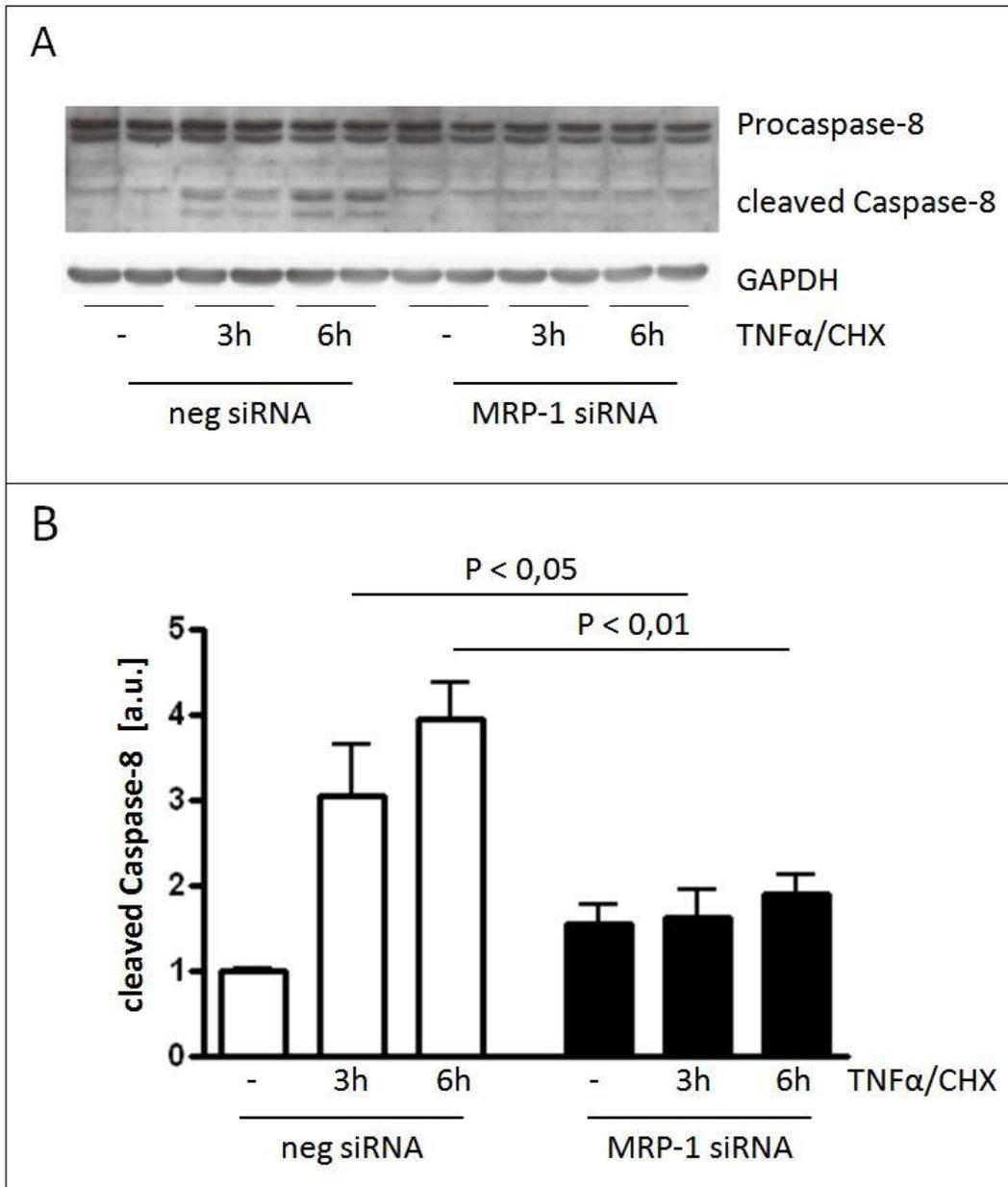
In der Auswertung der Western-Blots zeigten sich bereits optisch keinerlei Unterschiede im Grad der Phosphorylierung von FADD zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Abb.14), weshalb auf eine weitere statistische Auswertung verzichtet wurde. Es zeigte sich weder ein Unterschied zwischen den Zellen, welche für drei oder sechs Stunden durch TNF- $\alpha$ /CHX zur Apoptose stimuliert wurden und den unbehandelten Zellen, noch eine Veränderung im Phosphorylierungsgrad oder der Proteinmenge zwischen den MRP-1 defizienten Zellen und den mit Negative-Silencer siRNA transfizierten Kontrollzellen. Diese Feststellung konnte in vier vergleichbaren Versuchsreihen (n=4) aufgezeigt werden. Ein signifikanter Einfluss von MRP-1 auf die Phosphorylierungsrate von FADD konnte somit nicht festgestellt werden.



**Abbildung 14: Western-Blot Analyse der FADD Phosphorylierungsrate**  
Western-Blot Banden pFADD und FADD (repräsentativ für alle Versuche; n=4)

## **5.2 Western-Blot Analyse der Caspase-8 Spaltungsrate**

Als weiterer Bestandteil der TNF-R1 Signalkaskade sollte die Caspase-8 näher untersucht werden, da sie als Initiatorcaspase durch den DISC direkt am Rezeptor aktiviert wird und somit den Anfangspunkt der Caspase-Kaskade darstellt. Für die Versuche wurden wiederum HAEC, die mit MRP-1 siRNA transfiziert wurden, Kontrollzellen gegenübergestellt, welche mit Negative-Silencer siRNA transfiziert wurden. Die Spaltungsrate der Caspase-8 in den untersuchten Zellen wurde dann mittels Western-Blot Analyse basal, nach drei und sechs Stunden TNF- $\alpha$ /CHX quantifiziert (siehe Abb.15/A). Die ermittelten Werte wurden durch das „housekeeping gene“ GAPDH normalisiert. Die einzelnen Gruppen wurden daraufhin untereinander anhand einer ANOVA verglichen und danach mit dem Newman-Keuls Post-Hoc Test auf signifikante Unterschiede getestet (siehe Abb.15/B). Basal zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der Caspase-8 Spaltungsrate zwischen den MRP-1 defizienten HAEC und den Kontrollzellen. Nach drei Stunden TNF- $\alpha$ /CHX konnte dann eine signifikante Reduzierung ( $p < 0,05$ ) der Caspase-8 Spaltungsrate in den MRP-1 defizienten HAEC im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Nach sechs Stunden TNF- $\alpha$ /CHX war die Reduzierung der Caspase-8 Spaltungsrate in den MRP-1 defizienten Zellen gegenüber den Kontrollzellen sogar hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) nachweisbar. Somit konnte auch für die Aktivität der Caspase-8 der statistische Nachweis erbracht werden, dass diese in den mit MRP-1 defizienten Zellen niedriger ausfällt als in den Kontrollzellen. MRP-1 hat damit auch einen Einfluss auf die Spaltung der Caspase-8 und beeinflusst somit auch den Ablauf der TNF-R1 Signalkaskade.



**Abbildung 15: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-8**

**A:** Western-Blot Banden cleaved Caspase-8 und GAPDH (repräsentativ für alle Versuche)

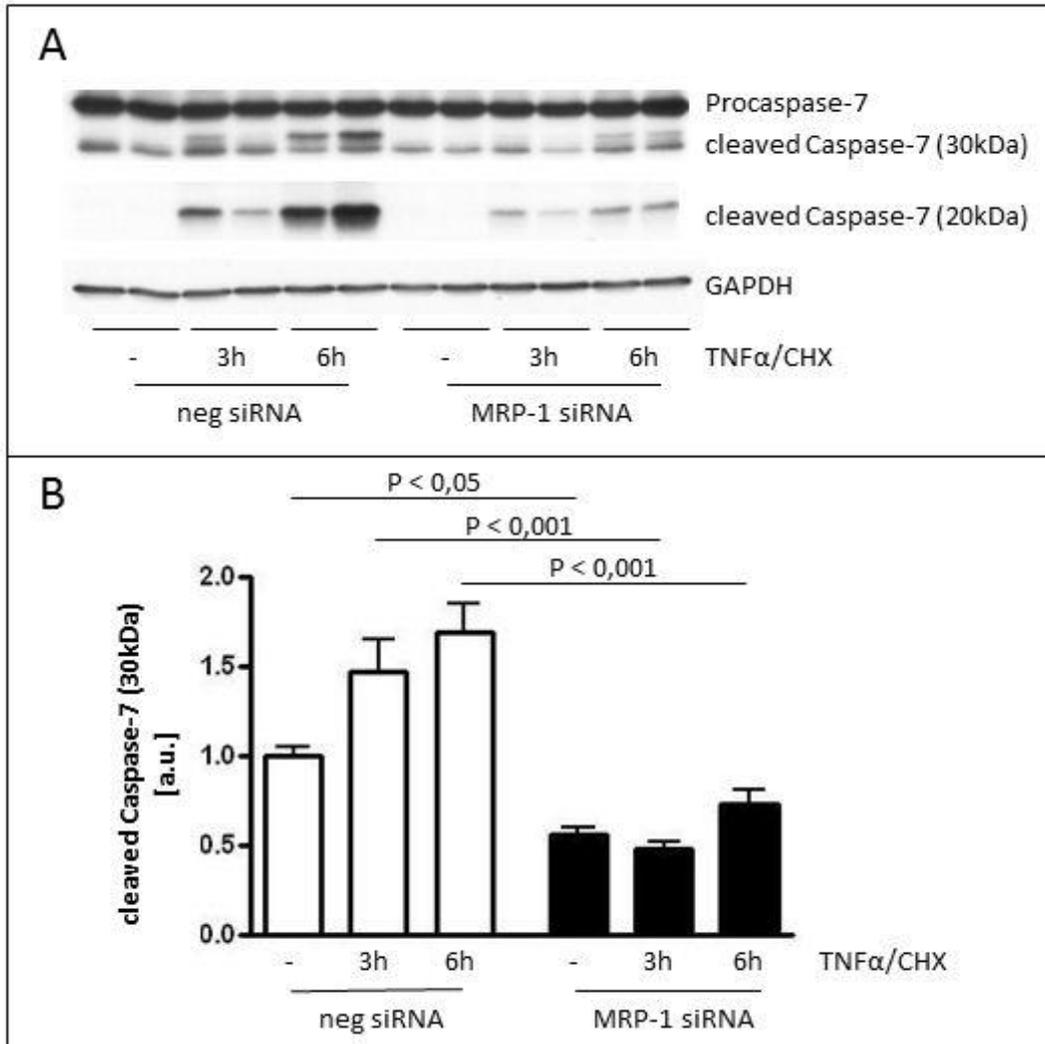
**B:** Säulendiagramm der statistischen Auswertung

(Mittelwerte ± SEM; ANOVA, Newman-Keuls Test; n=5-6)

### **5.3 Western-Blot Analyse der Caspase-7 Spaltungsrate**

Als weitere Effektorcaspase neben der Caspase-3 sollte die Aktivität der Caspase-7 näher untersucht werden. Dies sollte mittels einer Western-Blot Analyse bewerkstelligt werden. Neben der Procaspase-7 sind im Western-Blot zwei Formen der gespaltenen Caspase-7 nachweisbar (siehe Abb.16/A). Bei der gespaltenen Caspase-7, welche als Bande bei der 30 kDa Marke nachweisbar ist, handelt es sich um eine inaktive Vorstufe der aktivierten Caspase-7. Die aktive Form kann als abgespaltene große Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 20 kDa nachgewiesen werden. Im Rahmen der Versuche wurden wiederum MRP-1 defiziente HAEC mit Kontrollzellen verglichen, die mit der Negative-Silencer siRNA transfiziert wurden. Die Spaltungsrate der Caspase-7 (30 und 20 kDa) wurde dann basal, nach drei und sechs Stunden TNF- $\alpha$ /CHX gemessen. Für die Normalisierung der ermittelten Werte diente das „housekeeping gene“ GAPDH. Die einzelnen Gruppen wurden daraufhin untereinander anhand einer ANOVA verglichen und danach mit dem Newman-Keuls Post-Hoc Test auf signifikante Unterschiede getestet. Leider war dies nur für die inaktive Vorstufe der gespaltenen Caspase-7 (30 kDa) möglich (siehe Abb.16/B). Bei der aktiven Form der gespaltenen Caspase-7 (20 kDa) war eine statistische Auswertung leider nicht möglich, da basal bei den Kontrollzellen keinerlei Signal nachweisbar und somit eine Angleichung aller anderen Werte an den Mittelwert der basalen Kontrollzellen nicht möglich war. Aber die Western-Blots zeigten bereits rein optisch eine deutliche Reduzierung der Caspase-7 (20 kDa) Aktivität nach drei und sechs Stunden TNF- $\alpha$ /CHX in den MRP-1 defizienten HAEC im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (siehe Abb.16/A). Diese Beobachtung konnte bei einer Anzahl von sechs Versuchen (n=6) und einem konstanten „housekeeping gene“ GAPDH gemacht werden. Bei der Auswertung der inaktiven Vorstufe der gespaltenen Caspase-7 (30 kDa) zeigte sich bereits basal eine signifikante Reduzierung ( $p < 0,05$ ) der Spaltungsrate in den mit MRP-1 siRNA transfizierten HAEC gegenüber den Kontrollen. Nach drei und sechs Stunden Inkubation der HAEC mit TNF- $\alpha$ /CHX waren die Proteinmengen der inaktiven Vorstufe in den MRP-1 defizienten HAEC im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert. Dies zeigt, dass MRP-1 auch Einfluss auf die

Aktivierung der Caspase-7 hat und eine MRP-1 Defizienz in den HAEC bereits basal die Proteinmenge der inaktiven Vorstufe in den HAEC reduziert.



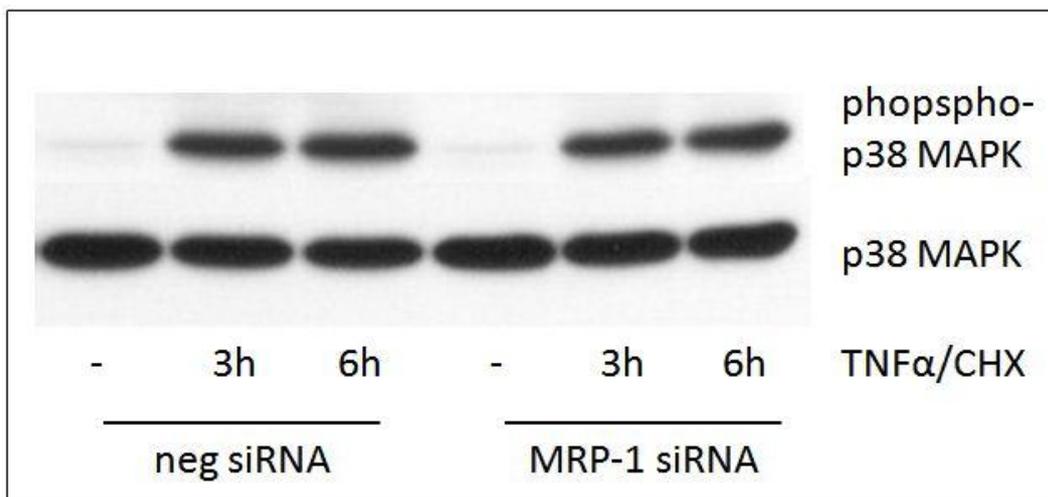
**Abbildung 16: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-7**

**A:** Western-Blot Banden cleaved Procaspase-7, Caspase-7 (30 kDa und 20 kDa) und GAPDH (repräsentativ für alle Versuche; n=6)

**B:** Säulendiagramm der statistischen Auswertung, cleaved Caspase-7 30kDa (Mittelwerte  $\pm$  SEM; ANOVA, Newman-Keuls Test; n=6)

### 5.4 Western-Blot Analyse der p38 MAPK Phosphorylierungsrate

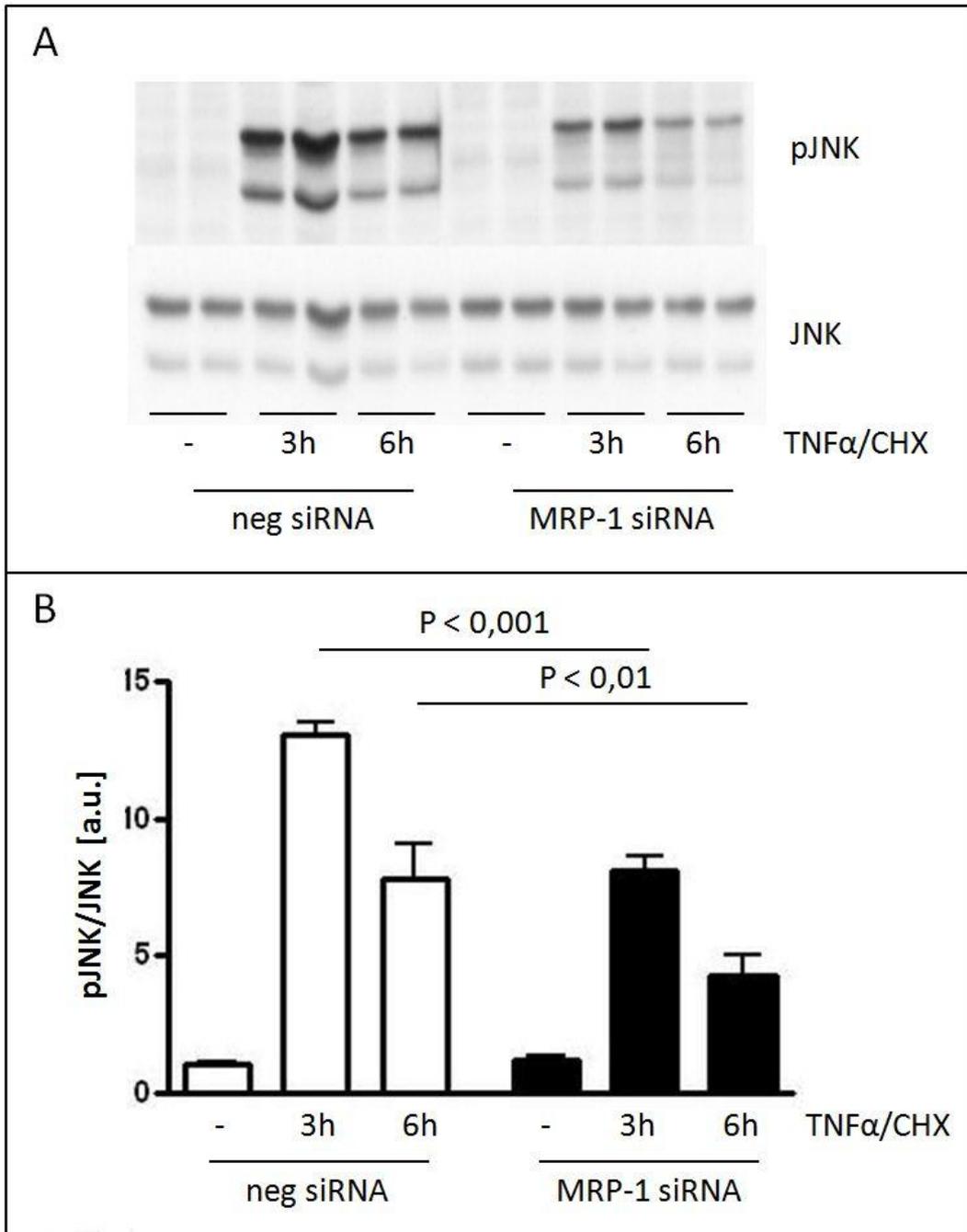
Über seine Wirkung am TNF-R1 kann TNF- $\alpha$  auch bestimmte stressaktivierte Proteinkinasen aktivieren, welche dann ebenfalls zur Einleitung der Apoptose beitragen können. Die Kinase p38 MAPK gehört zu diesen proapoptischen Proteinkinasen und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Es sollte ein Einfluss einer MRP-1 Defizienz in HAEC auf die Phosphorylierungsrate von p38 MAPK unter TNF- $\alpha$ /CHX nachgewiesen werden. Allerdings war bereits optisch in den durchgeführten Western-Blot Versuchen deutlich zu erkennen, dass eine MRP-1 Defizienz keinerlei Auswirkungen auf den Phosphorylierungsgrad von p38 MAPK im Vergleich zu den Kontrollzellen hat (siehe Abb.17). Man konnte allerdings in den einzelnen Western-Blots sehen, dass es unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  sowohl nach dreistündiger als auch nach sechsstündiger Inkubation der Zellen in TNF- $\alpha$ /CHX zu einer Aktivierung der p38 MAPK im Vergleich zu den basalen Raten kommt. TNF- $\alpha$  aktiviert also wie erwartet die p38 MAPK, jedoch hat MRP-1 keinen Einfluss auf diese Aktivierung.



**Abbildung 17: Western-Blot Analyse der p38MAPK Phosphorylierungsrate;**  
**Western-Blot Banden phospho-p38MAPK und p38MAPK (repräsentativ für alle Versuche; n=4)**

### **5.5 Western-Blot Analyse der SAPK/JNK Phosphorylierungsrate**

Eine weitere stressaktivierte Proteinkinase mit proapoptotischer Wirkung ist die SAPK/JNK. Der Einfluss einer MRP-1 Herunterregulation in den HAEC auf die JNK Phosphorylierungsrate unter TNF- $\alpha$ /CHX wurde daher ebenfalls untersucht. Hierfür wurden wieder MRP-1 defiziente Zellen mit Kontrollzellen, welche mit Negative-Silencer siRNA transfiziert wurden, verglichen. Die JNK Phosphorylierungsrate wurde mittels Western-Blot Analyse basal, nach drei und nach sechs Stunden TNF- $\alpha$ /CHX ermittelt (siehe Abb.18/A). Die erzielten Werte wurden durch die jeweilige Gesamtfraction von JNK normalisiert. Die einzelnen Gruppen wurden daraufhin untereinander mittels einer ANOVA verglichen und danach mit dem Newman-Keuls Post-Hoc Test auf signifikante Unterschiede getestet (siehe Abb.18/B). Basal war noch kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der JNK Phosphorylierungsrate zwischen den Kontrollzellen und den mit MRP-1 siRNA transfizierten Zellen festzustellen. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen in TNF- $\alpha$ /CHX war dann aber eine höchst signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduzierung der JNK Phosphorylierungsrate in den MRP-1 defizienten Zellen gegenüber den Kontrollzellen auszumachen. Nach sechsstündiger Inkubation der Zellen in TNF- $\alpha$ /CHX zeigte sich eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Reduzierung der JNK Phosphorylierungsrate in den MRP-1 defizienten Zellen gegenüber den Kontrollzellen. Es konnte also der statistische Nachweis erbracht werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in den HAEC den Grad der JNK Phosphorylierung nach drei- und sechsstündiger Applikation von TNF- $\alpha$ /CHX reduziert. Zudem fällt auf, dass die JNK Phosphorylierungsrate nach sechs Stunden TNF- $\alpha$ /CHX im Vergleich zu jenem Wert nach drei Stunden bereits rückläufig ist und ihr Maximum schon zuvor erreicht haben muss.



**Abbildung 18: Western-Blot Analyse der SAPK/JNK Phosphorylierungsrate**

**A:** Western-Blot Banden pJNK und JNK (repräsentativ für alle Versuche)

**B:** Säulendiagramm der statistischen Auswertung

(Mittelwerte ± SEM; ANOVA, Newman-Keuls Test; n=4)

## V. Diskussion

Die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland waren im Jahr 2010, wie auch in den Jahren zuvor, mit knapp 41% die kardiovaskulären Erkrankungen (Statistisches Bundesamt Deutschland 2011). Die Grundlage und Hauptursache für das Entstehen kardiovaskulärer Erkrankungen stellt oftmals das Vorhandensein von Atherosklerose an den Gefäßwänden der Patienten dar. Endotheliale Dysfunktion, „oxidativer Stress“, oszillierende Schubspannung am Endothel, Entzündungszellen und Zytokine wie TNF- $\alpha$  sind Schlagworte, die immer wieder fallen, wenn man sich über die Entstehung von Atherosklerose informieren will. Das Transportprotein MRP-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Modulation von oxidativen Prozessen in Endothelzellen und wurde erstmals im Jahr 2005 als potentieller zukünftiger Ansatzpunkt für Therapeutika bei vaskulären Erkrankungen ins Spiel gebracht (Mueller, Widder et al. 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte herausgefunden werden, dass MRP-1 eine entscheidende Rolle innerhalb des TNF- $\alpha$ /CHX induzierten Apoptosevorganges bei HAEC spielt. Eine Synthesehemmung von MRP-1 mittels RNA-Interferenz hatte eine signifikante Reduzierung der Apoptoserate nach Stimulierung der Zellen mit TNF- $\alpha$ /CHX zur Folge. Im Vergleich zu den Kontrollzellen (neg. siRNA) war in den MRP-1 defizienten HAEC nach drei- und sechstündiger Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX die Phosphatidylserin-Exposition (Annexin V Fluorescein Färbung) auf der Außenseite der Zellmembran signifikant reduziert. Ohne TNF- $\alpha$ /CHX Stimulation zeigten sich zwischen beiden Zellreihen keine signifikanten Unterschiede. Die vermehrte Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran ist ein Merkmal beim Ablauf des zellulären Apoptosevorganges (Vermes, Haanen et al. 1995). Eine Reduzierung der Phosphatidylserin-Exposition auf der äußeren Zellmembran der MRP-1 defizienten HAEC ist also mit einer Reduzierung der Apoptoserate gleichzusetzen. Da aber in nekrotischen Zellen die Membran durchlässig für Annexin V Fluorescein wird, wird in diesem Fall auch das Phosphatidylserin auf der

Innenseite der Zellmembran angefärbt und bei der FACS-Analyse detektiert. Es gelingt mit der durchgeführten Methode also nur der gemeinsame Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen. Dies stellt auch den Schwachpunkt dieser Methode dar. Somit konnte nach Durchführung der Versuche nur die Aussage getroffen werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in HAEC nach Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX zu einer signifikant verminderten Rate an apoptotischen und/oder nekrotischen Zellen führt.

Um auch eine gesonderte Aussage über die Apoptoserate zu treffen, wurde zusätzlich noch die Spaltungsrate der Caspase-3 mittels Western-Blot Analyse quantifiziert. Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in HAEC nach drei- und sechsständiger Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX eine höchst signifikante Reduzierung der Caspase-3 Spaltungsrate im Vergleich mit den Kontrollzellen zur Folge hat. Ohne eine Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Caspase-3 Spaltungsrate zwischen den beiden Zellreihen. Es wurde bereits gezeigt, dass eine MRP1-Herunterregulation in HAEC die Caspase-3 Aktivität und die Phosphatidylserin-Exposition an der äußeren Zellmembran unter mechanischen Stimuli (oszillierender Schubspannung) reduzieren kann (Mueller, Widder et al. 2005). Diese Beobachtung, kann nun auch für den TNF- $\alpha$  induzierten Apoptosevorgang bestätigt werden. Mueller, Widder et al. machten für ihre Beobachtung den verminderten Export von GSSG aus der Zelle durch MRP-1 verantwortlich. Sie fanden heraus, dass der Thiol-Transport durch MRP-1 als Antwort auf oxidativen Stress zur Endothelzellapoptose prädisponiert und die Inhibition von MRP-1 den Endothelzellen ermöglicht, ihr intrazelluläres Redox-Potential aufrecht zu erhalten. Die intrazelluläre Vermehrung von ROS, wie sie z.B. auch nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  auftritt, verringert innerhalb kurzer Zeit die GSH/GSSG Ratio (Spector, Huang et al. 1985; Mueller, Widder et al. 2005). Dies veranlasst die Zellen dazu drei Hauptabwehrmechanismen zu verfolgen, um die GSH/GSSG Ratio wieder auf Normalzustand zu heben. Der erste Mechanismus ist die vermehrte enzymatische Bildung von GSH durch die GSH-Synthase, welche unter diesen Umständen auch vermehrt exprimiert wird (Moellering, Mc Andrew et al. 1999). Außerdem kommt es unter oxidativem Stress zu einer erhöhten Aktivität der GSH-Reduktase, welche unter

Verbrauch von NADPH GSSG in GSH konvertiert (Dickinson and Forman 2002). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass diese in den MRP-1 defizienten HAEC im Vergleich zu den Kontrollen unter oszillierender Schubspannung vermehrt aktiv ist (Mueller, Widder et al. 2005). Der dritte Mechanismus bezieht sich auf den vermehrten zellulären GSSG Export unter oxidativem Stress, um das Verhältnis von GSH zu GSSG wieder nach oben zu korrigieren (Ballatori, Krance et al. 2009). Paradoxerweise könnte genau dieser Mechanismus nach zu langer Stimulation zur Apoptose führen, da sich der totale intrazelluläre Glutathiongehalt reduziert. Die Kombination von inhibierten GSSG-Export und erhöhter Aktivität der GSH-Reduktase unter MRP-1 Herunterregulation könnte letztendlich der Zelle helfen ihren intrazellulären Redoxstatus unter Einfluss von oxidativem Stress zu erhalten (Mueller, Widder et al. 2005).

Schon früher konnte an diversen anderen Zellarten gezeigt werden, dass ein höherer intrazellulärer GSH-Level mit geringerer Apoptoserate einhergeht und umgekehrt Zellen mit geringerem intrazellulärem GSH-Level, also geringerer antioxidativer Kapazität, empfindlicher gegenüber apoptotischen Stimuli sind (Beaver and Waring 1995; Chiba, Takahashi et al. 1996; Anderson, Tsai et al. 1999; Devadas, Hinshaw et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb auch die Rolle von intrazellulärem Glutathion bei der TNF- $\alpha$ /CHX-vermittelten Apoptose in HAEC abgeschätzt werden, indem man dem Zellmedium eine Stunde vor Apoptoseinduktion N-Acetylcystein (NAC), ein Vorläuferstoff von Glutathion, hinzufügte. Diese Zellen, welche vorher mit NAC behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Kontrollzellen unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX nach drei Stunden noch keinen signifikanten Unterschied der Caspase-3 Spaltungsrate. Jedoch konnte nach sechsständiger Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX eine signifikante Reduktion der Caspase-3 Spaltungsrate in den mit NAC vorbehandelten Zellen nachgewiesen werden. N-Acetylcystein verringert also die Apoptoserate in HAEC nach sechsständiger Inkubation der Zellen mit TNF- $\alpha$ /CHX signifikant. Dies wird vermutlich über zwei Mechanismen vermittelt. Zum einen hat NAC selbst eine direkte antioxidative Wirkung, indem es mittels einer SH-Gruppe ähnlich wie GSH bevorzugt Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) unter Bildung einer Disulfidbrücke (NAC-S-S-NAC) zu  $H_2O$

reduziert (Moldeus, Cotgreave et al. 1986; Gillissen, Jaworska et al. 1997; Atkuri, Mantovani et al. 2007). Außerdem konnte auch speziell an Endothelzellen (HUVEC) gezeigt werden, dass NAC die intrazelluläre Glutathion Produktion in vitro stimuliert, indem in den Endothelzellen durch N-Deacetylierung von NAC die Aminosäure Cystein vermehrt für die Bildung von Glutathion bereitgestellt wird (Cotgreave, Moldeus et al. 1991; Atkuri, Mantovani et al. 2007). Des Weiteren wurde beobachtet, dass NAC in der Lage ist Disulfidbrücken in Proteinen zu reduzieren (Harada, Anraku et al. 2004; Atkuri, Mantovani et al. 2007). Die erzielten Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass eine erhöhte antioxidative Kapazität der HAEC einen gewissen Schutz gegenüber der vermehrten ROS Bildung und der rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion unter Einfluss von TNF- $\alpha$ /CHX bietet. Hieraus lässt sich schließen, dass MRP-1 seine protektive Wirkung gegenüber den TNF- $\alpha$ /CHX-vermittelten Mechanismen durchaus durch eine Verbesserung des Redoxstatus der Zellen mittels Erhöhung des intrazellulären GSH/GSSG-Pools erlangt. Jedoch weist die gewählte Methodik auch einige Schwächen auf. Zum einen ist NAC ein relativ schwacher Vorläuferstoff für die GSH Biosynthese und es konnte gezeigt werden, dass in Endothelzellen das Maximum der GSH Synthese relativ unabhängig von der gewählten Konzentration an NAC, erst nach 6-12 Stunden erreicht wird (Cotgreave, Moldeus et al. 1991). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, weshalb nach einstündiger Inkubation mit NAC der protektive Effekt auf die HAEC erst nach sechsständiger und nicht nach dreistündiger Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX nachweisbar war. Weiterhin wurde bei Moldeus et al. für die Versuche an HUVEC ein cysteinfreies Zellkulturmedium verwendet, um den Effekt von NAC auf die GSH-Synthese zu untersuchen. In dem für die Versuche in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedium (Clonetics® EBM®-2 Endothelial Cell Basal Medium-2) war allerdings unter anderem Cystein (im FBS - fetal bovine serum) enthalten. Dies könnte den Effekt von NAC auf die GSH-Synthese schmälern. Mittlerweile wird hauptsächlich die direkte antioxidative Wirkung der SH-Gruppe von NAC als antioxidativer Hauptmechanismus von NAC in vitro genannt (Cotgreave, Moldeus et al. 1991). Die direkte Reaktion von NAC mit ROS läuft allerdings einige Größenordnungen schwächer ab als die Reaktion von ROS mit antioxidativen Enzymen,

wie z.B. SOD, Katalase oder Glutathion-Peroxidase (Jones, Lawrence et al. 2003; Atkuri, Mantovani et al. 2007). Letztendlich wird man die genauen intrazellulären Konzentrationen von GSH und GSSG in den HAEC messen müssen, um eine exakte Aussage über den Einfluss einer MRP-1 Defizienz auf den Redoxstatus oder das GSH/GSSG Verhältnis der Zelle unter TNF- $\alpha$ /CHX treffen zu können.

Unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  kommt es in Endothelzellen zu einer rapiden Produktion von ROS und in besonderem Maße von Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) durch die NAD(P)H-Oxidase, die mitochondriale Atmungskette, die Xanthin-Oxidase, die eNOS und weitere Mechanismen (Cai and Harrison 2000; Sorescu and Griendling 2002; Zhang, Park et al. 2009). Diese ROS sind an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und beim Ablauf der TNF- $\alpha$ -vermittelten Apoptose entscheidend mitbeteiligt. Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit den Einfluss einer MRP-1 Herunterregulation auf die Produktion von Superoxidanionen unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX in HAEC zu erfassen. Gemessen wurden die Superoxidanionen mittels DHE-HPLC. Bei dieser Methode macht man sich zunutze, dass Superoxidanionen mit DHE zu 2-OH-E<sup>+</sup> reagieren, welches dann mittels HPLC quantifiziert werden kann (Fink, Laude et al. 2004; Fernandes, Wosniak et al. 2007). Hierbei ist es wichtig, dass die einzelnen, zu messenden Substanzen im HPLC-System ausreichend deutlich aufgetrennt werden. Die Vor- und Nachteile des in dieser Arbeit verwendeten isokraten Trennsystems, mit nur einer Chromatographiesäule und einer sich nicht wechselnden mobilen Phase gegenüber dem von Fink et al. sowie Fernandes et al. verwendeten Gradientensystem mit zwei Säulen und sich wechselnden mobilen Phasen, wurden unter III./4.1 bereits ausführlich erörtert. Zusätzlich wurde zur genaueren Messung von 2-OH-E<sup>+</sup> ein interner Standard (3,4-Dihydroxymizsäure) eingeführt. Dies hat den Vorteil, dass veränderte Volumina der Proben, welche aufgrund des sehr flüchtigen Lösungsmittels Methanol entstehen können, durch eine Normalisierung auf den internen Standard ausgeglichen und somit fehlerhafte Messungen vermieden werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass Schwankungen, welche bei langen Messreihen durch Auswaschungseffekte oder Verunreinigungen auftreten, ebenfalls durch den internen Standard erfasst und ausgeglichen werden können. Ebenso können durch Verwendung

eines internen Standards auch Ungenauigkeiten bei der Herstellung der Proben, wie etwa Pipettierfehler, erfasst werden. Daher erhöht die Verwendung eines internen Standards innerhalb der HPLC-Methodik die Validität der Messungen. Bei der Auswahl des Standards war es wichtig, eine Substanz zu wählen, welche nicht bereits in den zu messenden Proben vorhanden ist. Weiterhin muss sich die Substanz hinsichtlich der Retentionszeit von den zu untersuchenden Substanzen unterscheiden, um eine ausreichende Auftrennung zu ermöglichen. Diese Retentionszeit sollte aber auch nicht extrem abweichen, da sonst die einzelnen Messvorgänge unnötig verlängert würden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen erwies sich 3,4-Dihydroxymzimtsäure als sehr gut geeigneter Standard, da sie nicht nur die genannten Voraussetzungen erfüllt, sondern auch sehr gut mit dem verwendeten elektrochemischen Detektor nachweisbar ist. Bei den Messungen konnte dann gezeigt werden, dass eine MRP-1 Defizienz in den HAEC die intrazelluläre Superoxidanionen-Konzentration sowohl nach dreistündiger, als auch nach sechsstündiger Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX signifikant senkt. Die Messung von Superoxidanionen sollte repräsentativ zur Abschätzung des Redoxstatus der HAEC erfolgen. Erkennbar ist in jedem Fall, dass eine Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX zu einer Produktion von Superoxidanionen oder im Allgemeinen zu einer intrazellulären Produktion von ROS führt, was in der Literatur schon mehrfach ausführlich beschrieben wurde (Goossens, De Vos et al. 1999; Morgan and Liu 2010). Zum einen können diese ROS selbst DNA-Schäden anrichten und somit den Apoptosevorgang induzieren, zum anderen nehmen sie aber auch als Signalmoleküle innerhalb der TNF-Signalkaskade eine Schlüsselrolle ein. Interessanterweise beeinflussen ROS sowohl die pro-, als auch die antiapoptotische Komponente der TNF-Signalkaskade. Der Redoxstatus der Zelle ist somit mitentscheidend dafür, wie die Reaktion der Zelle auf TNF- $\alpha$  ausfällt (Han, Ybanez et al. 2009). Innerhalb meiner Versuchsreihen sollte allerdings ausschließlich die apoptotische Komponente untersucht werden, weshalb die antiapoptotische TNF- $\alpha$  Wirkung (NF-kappaB-Signalweg) mittels CHX blockiert wurde. Welche Rolle MRP-1 bei diesen Abläufen spielt ist aber bisher unbekannt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen aber, dass es zu signifikant niedrigeren intrazellulären Superoxidanionen-Konzentrationen in den MRP-1

defizienten HAEC unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX kommt. Dies könnte daran liegen, dass eine Herunterregulation von MRP-1, wie bereits zuvor beschrieben, es den HAEC erleichtert ihr Redoxgleichgewicht aufrechtzuerhalten (Mueller, Widder et al. 2005). Der verminderte Transport von GSSG aus der Zelle und die vermehrte Aktivität der GSH-Reduktase in MRP-1 defizienten HAEC, welche bereits unter oszillierender Schubspannung beobachtet wurden, könnten somit auch unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX ursächlich dafür sein, dass vermehrt intrazelluläres GSH zur Verfügung steht, um die ROS-Konzentrationen zu senken. Für den Apoptoseablauf in lymphoiden Zellen unter Stimulierung mit FasL, einem weiteren Liganden für rezeptorvermittelte Apoptose, wurde dem Abfall der intrazellulären Glutathion-Konzentration bereits eine entscheidende Rolle zugesprochen (Franco, Panayiotidis et al. 2007). Demnach sei dieser intrazelluläre GSH-Abfall notwendig für den Ablauf des Apoptoseprogramms und dazu noch unabhängig von der ROS-Produktion. Franco et al. haben in ihren Arbeiten beschrieben, dass die GSH-Abnahme während der Apoptose in lymphoiden Zellen nicht nur unabhängig von einer vermehrten intrazellulären ROS-Produktion stattfindet, sondern zudem noch notwendig für diese vermehrte ROS-Produktion sei (Franco, Panayiotidis et al. 2007; Franco and Cidlowski 2009). MRP-1 wurde bereits mit dem intrazellulären GSH-Abfall während der Apoptose in Jurkat- und Raji-Zellreihen in Verbindung gebracht (Hammond, Marchan et al. 2007; Marchan, Hammond et al. 2008). Auch die Beobachtungen von Mueller, Widder et al., dass eine MRP-1 Defizienz in HAEC den intrazellulären GSH-Gehalt unter oszillierender Schubspannung erhalten können, sprechen dafür, dass dies ein entscheidender Mechanismus ist, durch den MRP-1 am Apoptoseablauf in Endothelzellen Anteil nimmt. Ob die intrazelluläre GSH Menge in den MRP-1 defizienten HAEC auch unter Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX erhalten bleibt und wie dies in Zusammenhang mit der intrazellulären ROS-/Superoxidanionenkonzentration steht, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Es konnte zumindest im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in HAEC die Superoxidanionenkonzentration unter TNF- $\alpha$ /CHX vermindert und dies ebenso einen der Mechanismen darstellt, durch den MRP-1 Einfluss auf den Apoptosevorgang unter TNF- $\alpha$ /CHX nimmt.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit sollte es sein, einzelne Mitglieder der TNF-R1 Signalkaskade näher zu untersuchen, um festzustellen, wie eine Herunterregulation von MRP-1 in HAEC die Aktivität bestimmter Kaskadenmitglieder unter Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX beeinflusst. In der Literatur sind mit TNF-R1 und TNF-R2 zwei verschiedene Rezeptoren am Gefäßendothel für TNF- $\alpha$  beschrieben. Es zeigte sich aber, dass für die Interaktion von TNF- $\alpha$  am vaskulären Endothel hauptsächlich der TNF-R1 verantwortlich ist (Madge and Pober 2001). Bindet TNF- $\alpha$  am TNF-R1, kommt es zu einer Rekrutierung von TRADD und FADD, was zur Bildung des DISC führt und über Spaltung der Caspase-8 die rezeptorvermittelte Apoptose initial einleitet. Daher sollte der Fokus zuerst auf der möglichen Interaktion von MRP-1 und dem TNF-R1-Adapterprotein FADD liegen. Hierbei sollte der Phosphorylierungsgrad von FADD Aufschluss über die Aktivität von FADD geben. Die Phosphorylierungsrate von FADD an Serin 194, was die bevorzugte Phosphorylierungsstelle von FADD darstellt, wurde durch eine Western-Blot Analyse quantifiziert, wobei es sich um ein etabliertes Verfahren handelt, um Phosphorylierungen an Proteinen nachzuweisen. Es zeigte sich jedoch in den Versuchen dieser Arbeit keine Veränderung des FADD-Phosphorylierungsgrades nach Stimulation der HAEC mit TNF- $\alpha$ /CHX im Vergleich zu den basalen Kontrollzellen. Weiterhin konnte auch unter Herunterregulation von MRP-1 in den HAEC keinerlei Veränderung der Proteinmenge oder des Phosphorylierungsgrades von FADD, sowohl basal als auch nach Stimulierung mit TNF- $\alpha$ /CHX festgestellt werden. Dies könnte entweder daran liegen, dass die Phosphorylierung von FADD an Serin 194 ein solch frühes Ereignis innerhalb der TNF-Kaskade darstellt, dass die Messzeitpunkte in den durchgeführten Versuchen nach drei bzw. sechs Stunden einfach zu spät gewählt waren oder, dass die Interaktion von TNF- $\alpha$ , TNF-R1, TRADD und FADD ohne eine Phosphorylierung von FADD an Serin 194 abläuft. Es wird z.B. auch beschrieben, dass sich Serin 194 außerhalb der Todesdomäne auf dem Protein FADD befindet und eine Phosphorylierung eher der anderen Rolle von FADD, nämlich der Regulation von Zellwachstum und Proliferation, zugeschrieben werden könnte (Zhang, Zhang et al. 2004). Dies könnte die fehlende Phosphorylierung von FADD nach Stimulation der HAEC mit TNF- $\alpha$ /CHX erklären. Eine mögliche

Interaktion von FADD mit MRP-1 beim Ablauf von TNF- $\alpha$ -vermittelter Apoptose war mittels der durchgeführten Versuche somit nicht nachzuweisen.

Das nächste Protein der TNF-R1 Signalkaskade, welches näher untersucht wurde, war die Caspase-8. Wie bereits beschrieben, führt eine Herunterregulation von MRP-1 in den HAEC zu einer Reduktion der Caspase-3 Spaltungsrate unter Apoptoseinduktion durch TNF- $\alpha$ /CHX. Bei der Caspase-3 handelt es sich um eine Effektorcaspase, welche am Ende der Signalkaskade steht und damit direkt die Apoptose einleitet durch Aktivierung von Endonukleasen und der damit verbundenen DNA-Fragmentierung bzw. der Kondensation von Chromatin (Porter and Janicke 1999; Yoshida, Pommier et al. 2006). Bei der Caspase-8 handelt es sich um eine Initiatorcaspase, welche innerhalb der TNF-R1 Signalkaskade bereits früher in Erscheinung tritt und durch den DISC initial aktiviert und zur Spaltung/Aktivierung der ihr nachgeschalteten Caspasen führt. Auch im Falle der Caspase-8 Spaltungsrate konnte im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche gezeigt werden, dass eine MRP-1 Defizienz in den HAEC zu einer Reduzierung eben dieser unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ /CHX (nach drei und sechs Stunden) führt. MRP-1 beeinflusst somit auch die Aktivierung der Caspase-8 unter TNF- $\alpha$ /CHX. Wie bereits bei der Caspase-3 wurde die Spaltungsrate der Caspase-8 mittels Western-Blot Analyse ermittelt. Außerdem konnte ebenfalls mittels Western-Blot Analyse gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in HAEC auch die Aktivität der Caspase-7 unter TNF- $\alpha$ /CHX (nach drei und sechs Stunden) reduziert. Die Caspase-7 stellt neben der Caspase-3 eine weitere Effektorcaspase am Ende der Caspase-Kaskade dar. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass MRP-1 an der Modulation des Ablaufs der Caspase-Kaskade unter TNF- $\alpha$  beteiligt ist. Beim Ablauf der rezeptorvermittelten Apoptose unter TNF- $\alpha$  triggert die Aktivität der gespaltenen Caspase-8 unter anderem durch proteolytische Spaltung nachgeschalteter Caspasen, wie Caspase-3 und -7, den Ablauf des Apoptoseprogrammes (Shi 2002). Der Einfluss einer MRP-1 Defizienz in den HAEC auf die Aktivität der Caspase-8 unter TNF- $\alpha$ /CHX könnte somit auch zu einer verminderten Aktivierung der nachgeschalteten Caspasen führen. Dennoch besteht auch die Möglichkeit, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in den HAEC die proteolytische Spaltung der einzelnen Caspasen gleichermaßen

reduziert. Eine genaue Differenzierung des Mechanismus, wie MRP-1 die proteolytische Spaltung von Caspasen beeinflusst, ist anhand der durchgeführten Versuche leider nicht möglich. Da es sich bei den Caspasen um cysteinhaltige Proteasen handelt, liegt die Vermutung nahe, dass ROS eine Rolle bei der Modulation der Aktivität von Caspasen spielen könnten. Eine Regulierung der Proteinfunktion durch S-Glutathionylierung an der Sulfhydryl-Gruppe der Aminosäure Cystein und der Zusammenhang mit ROS und erhöhten intrazellulären GSSG-Spiegeln wurde bereits in früheren Arbeiten diskutiert und nachgewiesen (Klatt and Lamas 2000). Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass eine vermehrte S-Glutathionylierung der Caspase-3 zu deren Inaktivierung führt und eine erhöhte intrazelluläre GSSG-Konzentration eben diese Inaktivierung herbeiführen kann (Huang, Pinto et al. 2008). Für die Regulation der Endothelzellapoptose unter TNF- $\alpha$  wurde dieser Mechanismus ebenfalls beschrieben, wobei die Deglutathionylierung der Caspase-3 durch das Protein Glutaredoxin einen entscheidenden Mechanismus zur Caspase-3 Aktivierung darstellt (Pan and Berk 2007). Da die Caspase-8 und die Caspase-7 ebenfalls cysteinhaltige Proteasen sind, ist ein ähnlicher Mechanismus zur Modulierung ihrer Aktivität denkbar. Dies wurde allerdings noch nicht näher untersucht. Da MRP-1 als Haupttransportmechanismus für GSSG in HAEC identifiziert wurde und es beim Apoptoseablauf zu einem vermehrten Export von GSSG aus der Zelle kommt, könnte eine Herunterregulation von MRP-1 zu einer erhöhten intrazellulären GSSG-Konzentration und somit zu einer Inaktivierung von Caspasen aufgrund vermehrter S-Glutathionylierung führen. Um eine exakte Aussage über diesen möglichen Vorgang treffen zu können, müsste man zum einen versuchen, den Einfluss einer MRP-1 Defizienz in den HAEC auf die S-Glutathionylierung der einzelnen Caspasen unter TNF- $\alpha$  zu untersuchen, und andererseits die jeweiligen intrazellulären GSSG-Spiegel messen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht realisiert werden und soll einen Ausblick auf den Gegenstand zukünftiger Untersuchungen geben. Fest steht, dass MRP-1 die Aktivität der Caspasen-3, -7 und -8 beeinflussen kann. Der Mechanismus ist allerdings noch unklar.

Eine weitere interessante Beobachtung, die im Rahmen der durchgeführten Versuche in Bezug auf die Caspase-7 Spaltungsvorgänge gemacht werden konnte, ist die Tatsache, dass bereits basal die Proteinmenge der gespaltenen Caspase-7 (30kDa) in den MRP-1 defizienten HAEC signifikant niedriger ist als in den Kontrollzellen. Bei der gespaltenen Caspase-7 (30 kDa) handelt es sich um eine aktive Vorstufe, bei der die „Stickstoffkappe“ bzw. das N-Peptid der Procaspase-7 abgespalten wurde (Yang, Stennicke et al. 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in vivo eine vorherige Spaltung der Procaspase-7 zur inaktiven Vorstufe der Caspase-7 bei 30 kDa sogar essentiell für eine spätere Spaltung durch Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8) zur aktiven Untereinheit (20 kDa) ist (Denault and Salvesen 2003). Für die Abspaltung des N-Peptids von der Procaspase-7 wird in der Literatur in erster Linie die aktive Caspase-3 verantwortlich gemacht. Da in den Versuchen dieser Arbeit aber bereits gezeigt werden konnte, dass basal kein Unterschied in der Caspase-3 Aktivität zwischen den MRP-1 defizienten Zellen und den Kontrollzellen besteht, muss nun auch in Erwägung gezogen werden, dass neben der Caspase-3 auch MRP-1 oder intrazelluläre Redoxprozesse beim Abspaltungsprozess der „Stickstoffkappe“ von der Procaspase-7 involviert sein könnten.

Beim Ablauf der TNF-R1 Signalkaskade kommt es auch zur Phosphorylierung einiger Proteine, die der Familie der stressaktivierten Proteinkinasen angehören. Die im Kontext dieser Arbeit interessantesten Vertreter dieser Proteine sind p38MAPK und JNK, da beide beim Ablauf der Apoptose unter dem Stimulus von TNF- $\alpha$  teilhaben (Matsuzawa and Ichijo 2005). Neben proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  und IL-1, gibt es noch diverse andere Stimuli, die eine Phosphorylierung von p38MAPK und JNK bewirken können. Hierzu gehören zelluläre Stressoren, wie UV-Bestrahlung, Röntgenstrahlung, ROS, Hitzeschock und osmotische Ungleichgewichte (Tibbles and Woodgett 1999). Eine zentrale Rolle sowohl bei der Aktivierung von JNK als auch bei p38MAPK spielt die MAPK-Kinase-Kinase ASK1 (Takeda, Matsuzawa et al. 2003). Die Aktivierung von ASK1 erfolgt zum einen im Rahmen der TNF-R1 Kaskade, dem TRADD und TRAF2 Komplex am Rezeptor nachgeschaltet. Andererseits vermag aber auch der Redoxstatus der Zelle unter dem vermehrten Einfluss von ROS die Aktivität von ASK1

zu erhöhen (Matsuzawa and Ichijo 2008). Somit scheint die Aktivität der ASK1 nachgeschalteten Proteinkinasen JNK und p38MAPK unter TNF- $\alpha$  ebenfalls abhängig vom Redoxstatus der Zelle zu sein und eine vermehrte Bildung von ROS unter TNF- $\alpha$  führt zur vermehrten Phosphorylierung von JNK und p38MAPK. In den Versuchen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in den HAEC unter dem Stimulus von TNF- $\alpha$  zu einer vermehrten Phosphorylierung von JNK und p38MAPK kommt. Interessanterweise konnte eine MRP-1 Herunterregulation in den HAEC die Phosphorylierungsrate von JNK nach drei- und sechsständiger Einwirkung TNF- $\alpha$ /CHX signifikant senken. Diese Beobachtung konnte im Falle von p38MAPK allerdings nicht geteilt werden. Es zeigte sich, dass eine Herunterregulation von MRP-1 keinen Einfluss auf die stattfindende Phosphorylierung der p38MAPK unter TNF- $\alpha$ /CHX hat. Da wir zuvor bereits nachweisen konnten, dass eine MRP-1 Defizienz in den HAEC zu einer verminderten Produktion von Superoxidanionen unter TNF- $\alpha$ /CHX führt, würde das einen Erklärungsansatz für die verminderte Aktivierung der JNK liefern, nicht jedoch für den fehlenden Einfluss auf die p38MAPK Aktivierung. Hieraus lässt sich nur schlussfolgern, dass entweder MRP-1 oder eines seiner Transportsubstrate an der Aktivierung von JNK beteiligt sind oder aber die intrazelluläre Konzentration an ROS bei der Aktivierung der p38MAPK eine geringere Rolle spielt als bisher angenommen und ihre Aktivierung auch unabhängig vom Redoxstatus der Zelle unter TNF- $\alpha$ /CHX stattfindet. Der genaue Mechanismus bleibt allerdings noch unklar. Die erzielten Ergebnisse zeigen also auf, dass ein MRP-1 „Knock-Down“ in HAEC die Apoptoserate unter TNF- $\alpha$ /CHX auch durch eine verminderte Phosphorylierung von JNK beeinflussen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MRP-1 eine entscheidende Rolle beim Ablauf der Endothelzellapoptose unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  spielt. Es beeinflusst den Ablauf der TNF-R1 Signalkaskade auf mehreren Ebenen und spielt auch bei der Modulation des zellulären Redoxgleichgewichts eine zentrale Rolle. Ob hierfür allein der Transport von GSSG aus der Zelle beim Ablauf der Apoptose verantwortlich ist, lässt sich mit den Versuchen dieser Arbeit nicht genau eruieren. An dieser Stelle werden noch weitere Untersuchungen, wie die genaue Messung von intra- und extrazellulärem GSH/GSSG

beim Ablauf der TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose, benötigt. Weiterhin könnten auch noch andere Transportsubstrate von MRP-1 den Ablauf der Apoptose beeinflussen und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Auch der mitochondriale Signalweg der Apoptose, welcher indirekt über TNF- $\alpha$  mitaktiviert wird und unabhängig der TNF-R1 Signalkaskade abläuft, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt und bietet aufgrund der Vielzahl von Redoxprozessen am Mitochondrium interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen im Zusammenhang mit MRP-1.

## VI. Zusammenfassung

Die endotheliale Dysfunktion stellt eine der Hauptursachen für die Entstehung von Atherosklerose an humanen Gefäßwänden dar und ist somit auch wesentlich an der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt. Das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gilt als einer der Hauptinduktoren der endothelialen Dysfunktion. Da bei der Endothelzellapoptose unter TNF- $\alpha$  diverse rezeptorvermittelte oxidative Prozesse innerhalb der Zelle ablaufen, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern das Multidrug Resistance Associated Protein-1 (MRP-1) bei eben diesen oxidativen Prozessen und bei der Modulation der TNF- $\alpha$ -Signalkaskade involviert ist.

Bei den durchgeführten Versuchen wurden ausschließlich kultivierte humane aortale Endothelzellen (HAEC) verwendet. Mittels RNA-Interferenz wurde in einem Teil der HAEC ein „Knock-Down“ von MRP-1 auf Proteinebene erzielt. Bei den einzelnen Versuchsreihen wurde die Apoptose mittels TNF- $\alpha$  für jeweils drei und sechs Stunden eingeleitet. TNF- $\alpha$  wurde kombiniert mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) appliziert, um die transkriptionsfaktorvermittelte antiapoptotische Komponente von TNF- $\alpha$  zu blockieren, da sich die Untersuchungen möglichst auf die apoptotische Komponente beziehen sollten.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von MRP-1 in den HAEC die Apoptoserate unter TNF- $\alpha$ /CHX signifikant zu senken vermag. Die Apoptoserate wurde mittels Annexin-V-Fluorescein-Färbung und nachfolgender durchflusszytometrischer Messung von Annexin-V an der Zelloberfläche der HAEC ermittelt. Eine weitere angewandte Methode war der Nachweis der Caspase-3 Spaltungsrate mittels Western-Blot Analyse.

Beim Ablauf von Apoptose kommt es zum Export von oxidiertem Glutathion (GSSG) über die Zellmembran, wobei in der Literatur MRP-1 bereits als Haupttransportmechanismus beschrieben wurde. Dies könnte bei einem „Knock-Down“ von MRP-1

dazu führen, dass vermehrt Glutathion in der Zelle verbleibt und somit auch unter Umständen die antioxidative Kapazität der Zelle erhalten bleibt. Um diesen Zustand abschätzen zu können, wurden die HAEC in einer Versuchsreihe für eine Stunde mit dem GSH-Vorläuferstoff N-Acetylcystein (NAC) vorbehandelt bevor TNF- $\alpha$ /CHX appliziert wurde. Nach sechsstündiger Einwirkung von TNF- $\alpha$ /CHX war die Caspase-3 Spaltungsrate in der NAC-Gruppe signifikant niedriger als bei den Kontrollzellen.

Weiterhin sollte der Redoxstatus der HAEC abgeschätzt werden, indem die intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration ( $O_2^{\cdot -}$ ) bestimmt wurde. Die Konzentrationen wurden mittels eines High Pressure Liquid Chromatographieverfahrens (DHE-HPLC) gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Superoxidanionenkonzentration in den MRP-1 defizienten HAEC nach Inkubation mit TNF- $\alpha$ /CHX signifikant niedriger war als in den Kontrollzellen.

In weiteren Untersuchungen wurden einzelne Komponenten der TNF-R1 Signalkaskade mittels Western-Blot Verfahren näher untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine MRP-1 Herunterregulation in den HAEC neben dem bereits untersuchten Einfluss auf die Caspase-3 Spaltungsrate auch die Spaltung der Caspase-7 und der Caspase-8 nach Inkubation der HAEC mit TNF- $\alpha$ /CHX signifikant reduziert. Auch die Phosphorylierungsrate der stressaktivierten Phosphokinase JNK war unter Einwirkung von TNF- $\alpha$ /CHX in den MRP-1 defizienten HAEC im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant vermindert. Eine Herunterregulation von MRP-1 in den HAEC hatte jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsraten von FADD und der stressaktivierten Phosphokinase p38MAPK unter TNF- $\alpha$ /CHX.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MRP-1 eine entscheidende Rolle beim Ablauf der Endothelzellapoptose unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  spielt. MRP-1 beeinflusst den Ablauf der TNF-R1 Signalkaskade auf mehreren Ebenen und spielt außerdem auch bei der Modulation des zellulären Redoxgleichgewichts eine zentrale Rolle.

## VII. Abbildungen, Tabellen, Abkürzungen, Literatur

### 1. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1: Der Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 2: Intrazellulärer Glutathionstoffwechsel und die Rolle von MRP-1 für den GSSG-Export**

*Quelle: Mueller, Widder et al. 2005*

**Abbildung 3: Hauptsignalwege der Apoptose**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 4: RNA-Interferenz Methodik**

*Quelle: modifiziert nach: [http://www.scbio.de/images/en/gene\\_silencers/sirna\\_gene\\_silencers.png](http://www.scbio.de/images/en/gene_silencers/sirna_gene_silencers.png)*

**Abbildung 5: Schematischer Ablauf der Immunofärbung beim Western-Blot**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 6: graphische Auswertung eines Western-Blots mittels ImageJ**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 7: HPLC-System**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 8: Beispielkurve einer HPLC-Analyse**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 9: MRP-1 Western-Blot Analyse**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 10: Annexin-V Fluorescein FACS-Analyse**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 11: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-3 (MRP-1 siRNA)**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 12: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-3 (NAC)**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 13: Intrazelluläre Superoxidanionenkonzentration (DHE-HPLC)**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 14: Western-Blot Analyse der FADD Phosphorylierungsrate**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 15: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-8**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 16: Western-Blot Analyse der cleaved Caspase-7**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 17: Western-Blot Analyse der p38MAPK Phosphorylierungsrate**

*Quelle: eigene Abbildung*

**Abbildung 18: Western-Blot Analyse der SAPK/JNK Phosphorylierungsrate**

*Quelle: eigene Abbildung*

## **2. Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1: Produktion und Abbau von ROS**

*Quelle: eigene Tabelle*

**Tabelle 2: Todesrezeptoren und ihre spezifischen Liganden**

*Quelle: modifiziert nach: Wajant 2003*

**Tabelle 3: ausgewählte Substrate des Zellmembrantransporters MRP-1**

*Quelle: Bakos und Homolya 2007*

**Tabelle 4: verwendete Chemikalien, Reagenzien, Standards und Zellkulturmedien**

*Quelle: eigene Tabelle*

**Tabelle 5: verwendete Puffer und Lösungen**

*Quelle: eigene Tabelle*

**Tabelle 6: verwendete Primärantikörper**

*Quelle: eigene Tabelle*

**Tabelle 7: verwendete Sekundärantikörper**

*Quelle: eigene Tabelle*

**Tabelle 8: verwendete siRNA**

*Quelle: eigene Tablle*

**Tabelle 9: verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien**

*Quelle: eigene Tabelle*

**Tabelle 10: verwendete Software**

*Quelle: eigene Tabelle*

### 3. Abkürzungsverzeichnis

2-OH-E <sup>+</sup>	2-Hydroxy-Ethidium
a.u.	arbitrary unit; willkürliche Einheit
ABC	ATP-binding-cassette
ABCC1	ATP-binding cassette C1 (= MRP-1)
AIF	Apoptosis-inducing factor
ANOVA	analysis of variance; Varianzanalyse
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
APO-1	Apoptosis antigen 1 (=CD95, Fas-R)
APS	Ammoniumpersulfat
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
Bcl-x <sub>L</sub>	B-cell lymphoma protein extra large
BH <sub>4</sub>	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
Bid	BH3 interacting domain death agonist
CAD	caspase-activated DNase
CD95	cluster of differentiation 95 (= Fas-R, APO-1)
c-FLIP	FLICE-like inhibitory protein
CHX	Cycloheximid
Da	Dalton

DED	Todeseffektordomäne
DHE	Dihydroethidium
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DR	Death Receptor; Todesrezeptor
E <sup>+</sup>	Ethidium
EBM-2	Endothelzell-Basal-Medium-2
ED	endotheliale Dysfunktion
EDA-A1	Ectodysplasin A1
EDAR	Ectodysplasin A Rezeptor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS Zellanalyse	fluorescence activated cell sorting; fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas-L	Fas Ligand
Fas-R	Fas Rezeptor (= CD95, APO-1)
FBS	fetal bovine serum; fetales Rinderserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAEC	human aortal endothelial cells; humane aortale Endothelzellen
HOCl	hypochlorische Säure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography

HRP	horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells; humane Umbilikalvenen Endothelzellen
IL-1	Interleukin 1
iNOS	induzierbare NO-Synthase
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1
mRNA	messenger RNA; Boten-RNA
MRP-1	Multidrug Resistance Protein-1
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAOH	Natronlauge
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF	nerve growth factor
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	nitric oxide; Stickoxid, Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
$O_2^{\cdot -}$	Superoxidanion
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl-Radikal
$ONOO^-$	Peroxynitrit
p38MAPK	p38-mitogen-activated-proteinkinase; p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
p53	tumor protein 53 (53kDa)
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RISC	RNA-induced-silencing-complex
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stressaktivierte Proteinkinase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SH	Sulfhydryl (-Gruppe)
siRNA	small interfering RNA
Smac/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases
SOD	Superoxiddismutase
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
V	Volt
XO	Xanthin-Oxidase
ZNS	Zentrales Nervensystem

#### 4. Literaturverzeichnis

- Adams, J. M. (2003).** "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." Genes Dev 17(20): 2481-2495.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001).** "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J 357(Pt 3): 593-615.
- Anderson, C. P., J. M. Tsai, et al. (1999).** "Depletion of glutathione by buthionine sulfoxine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis." Exp Cell Res 246(1): 183-192.
- Andreoli, S. P., C. P. Mallett, et al. (1986).** "Role of glutathione in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury." J Lab Clin Med 108(3): 190-198.
- Antonsson, B. (2004).** "Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways." Mol Cell Biochem 256-257(1-2): 141-155.
- Arnoult, D., P. Parone, et al. (2002).** "Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli." J Cell Biol 159(6): 923-929.
- Atkuri, K. R., J. J. Mantovani, et al. (2007).** "N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency." Curr Opin Pharmacol 7(4): 355-359.
- Azevedo, L. C., M. Janiszewski, et al. (2006).** "Redox mechanisms of vascular cell dysfunction in sepsis." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 6(2): 159-164.
- Babior, B. M. (2000).** "Phagocytes and oxidative stress." Am J Med 109(1): 33-44.
- Bakos, E. and L. Homolya (2007).** "Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1)." Pflugers Arch 453(5): 621-641.
- Ballatori, N., S. M. Krance, et al. (2009).** "Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology." Mol Aspects Med 30(1-2): 13-28.
- Bauersachs, J. and J. D. Widder (2008).** "Endothelial dysfunction in heart failure." Pharmacol Rep 60(1): 119-126.
- Beaver, J. P. and P. Waring (1995).** "A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes." Eur J Cell Biol 68(1): 47-54.

- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996).** "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol 271(5 Pt 1): C1424-1437.
- Berk, B. C., J. I. Abe, et al. (2001).** "Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms." Ann N Y Acad Sci 947: 93-109; discussion 109-111.
- Bilsborough, W., H. Keen, et al. (2006).** "Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy over conventional therapy improves endothelial function in adults with rheumatoid arthritis." Rheumatol Int 26(12): 1125-1131.
- Booth, A. D., D. R. Jayne, et al. (2004).** "Infliximab improves endothelial dysfunction in systemic vasculitis: a model of vascular inflammation." Circulation 109(14): 1718-1723.
- Borst, P., R. Evers, et al. (1999).** "The multidrug resistance protein family." Biochim Biophys Acta 1461(2): 347-357.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000).** "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res 87(10): 840-844.
- Cain, K. (2003).** "Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome." Drug Metab Rev 35(4): 337-363.
- Cain, K., S. B. Bratton, et al. (2002).** "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." Biochimie 84(2-3): 203-214.
- Cardillo, C., F. Schinzari, et al. (2006).** "Intravascular tumor necrosis factor alpha blockade reverses endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis." Clin Pharmacol Ther 80(3): 275-281.
- Chandel, N. S. and P. T. Schumacker (2000).** "Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight." J Appl Physiol 88(5): 1880-1889.
- Chen, Q., M. Crosby, et al. (2003).** "Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release." Korean J Biol Sci 7(1): 1-9.
- Chen, X., B. T. Andresen, et al. (2008).** "Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction." Curr Hypertens Rev 4(4): 245-255.
- Chiba, T., S. Takahashi, et al. (1996).** "Fas-mediated apoptosis is modulated by intracellular glutathione in human T cells." Eur J Immunol 26(5): 1164-1169.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, et al. (1992).** "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science 258(5088): 1650-1654.

- Cole, S. P. and R. G. Deeley (2006).** "Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1." Trends Pharmacol Sci 27(8): 438-446.
- Corda, S., C. Laplace, et al. (2001).** "Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide." Am J Respir Cell Mol Biol 24(6): 762-768.
- Cotgreave, I., P. Moldeus, et al. (1991).** "The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells." Biochem Pharmacol 42(1): 13-16.
- Cross, A. R. and O. T. Jones (1991).** "Enzymic mechanisms of superoxide production." Biochim Biophys Acta 1057(3): 281-298.
- Cross, C. E., B. Halliwell, et al. (1987).** "Oxygen radicals and human disease." Ann Intern Med 107(4): 526-545.
- De Keulenaer, G. W., R. W. Alexander, et al. (1998).** "Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle." Biochem J 329 ( Pt 3): 653-657.
- de Lange, E. C. (2004).** "Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier." Adv Drug Deliv Rev 56(12): 1793-1809.
- De Palma, C., E. Meacci, et al. (2006).** "Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol 26(1): 99-105.
- Deeley, R. G., C. Westlake, et al. (2006).** "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." Physiol Rev 86(3): 849-899.
- Denault, J. B. and G. S. Salvesen (2003).** "Human caspase-7 activity and regulation by its N-terminal peptide." J Biol Chem 278(36): 34042-34050.
- Desagher, S. and J. C. Martinou (2000).** "Mitochondria as the central control point of apoptosis." Trends Cell Biol 10(9): 369-377.
- Devadas, S., J. A. Hinshaw, et al. (2003).** "Fas-stimulated generation of reactive oxygen species or exogenous oxidative stress sensitize cells to Fas-mediated apoptosis." Free Radic Biol Med 35(6): 648-661.
- Dickinson, D. A. and H. J. Forman (2002).** "Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol." Ann N Y Acad Sci 973: 488-504.
- Droge, W. (2002).** "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev 82(1): 47-95.

- Droge, W. (2003).** "Oxidative stress and aging." Adv Exp Med Biol 543: 191-200.
- Endemann, D. H. and E. L. Schiffrin (2004).** "Endothelial dysfunction." J Am Soc Nephrol 15(8): 1983-1992.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992).** "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol 148(7): 2207-2216.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2006).** "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)." Am J Physiol Heart Circ Physiol 291(3): H985-1002.
- Fernandes, D. C., J. Wosniak, Jr., et al. (2007).** "Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems." Am J Physiol Cell Physiol 292(1): C413-422.
- Filomeni, G., G. Rotilio, et al. (2003).** "Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway." FASEB J 17(1): 64-66.
- Fink, B., K. Laude, et al. (2004).** "Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay." Am J Physiol Cell Physiol 287(4): C895-902.
- Finkel, T. (1998).** "Oxygen radicals and signaling." Curr Opin Cell Biol 10(2): 248-253.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000).** "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature 408(6809): 239-247.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998).** "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature 391(6669): 806-811.
- Franco, R. and J. A. Cidlowski (2009).** "Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant." Cell Death Differ 16(10): 1303-1314.
- Franco, R., M. I. Panayiotidis, et al. (2007).** "Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation." J Biol Chem 282(42): 30452-30465.
- Gillissen, A., M. Jaworska, et al. (1997).** "Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro." Respir Med 91(3): 159-168.
- Gonzalez-Juanatey, C., J. Llorca, et al. (2006).** "Short-term adalimumab therapy improves endo-thelial function in patients with rheumatoid arthritis refractory to infliximab." Clin Exp Rheumatol 24(3): 309-312.

- Goossens, V., K. De Vos, et al. (1999).** "Redox regulation of TNF signaling." Biofactors 10(2-3): 145-156.
- Hall, A. G. (1999).** "Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis." Eur J Clin Invest 29(3): 238-245.
- Hammond, C. L., R. Marchan, et al. (2007).** "Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins." J Biol Chem 282(19): 14337-14347.
- Han, D., M. D. Ybanez, et al. (2009).** "Redox regulation of tumor necrosis factor signaling." Antioxid Redox Signal 11(9): 2245-2263.
- Harada, D., M. Anraku, et al. (2004).** "Kinetic studies of covalent binding between N-acetyl-L-cysteine and human serum albumin through a mixed-disulfide using an N-methylpyridinium polymer-based column." Drug Metab Pharmacokinet 19(4): 297-302.
- Harrison, D. G., M. C. Gongora, et al. (2007).** "Oxidative stress and hypertension." J Am Soc Hypertens 1(1): 30-44.
- Hemnani, T. and M. S. Parihar (1998).** "Reactive oxygen species and oxidative DNA damage." Indian J Physiol Pharmacol 42(4): 440-452.
- Hengartner, M. O. (2000).** "The biochemistry of apoptosis." Nature 407(6805): 770-776.
- Hill, M. M., C. Adrain, et al. (2003).** "Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." Mol Interv 3(1): 19-26.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009).** "Cell death." N Engl J Med 361(16): 1570-1583.
- Huang, Z., J. T. Pinto, et al. (2008).** "Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation." Biochem Pharmacol 75(11): 2234-2244.
- Hurle, J. M., M. A. Ros, et al. (1996).** "Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo." Microsc Res Tech 34(3): 236-246.
- Hurlimann, D., A. Forster, et al. (2002).** "Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis." Circulation 106(17): 2184-2187.
- Jones, C. M., A. Lawrence, et al. (2003).** "Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide." Biochem Soc Trans 31(Pt 6): 1337-1339.

- Jones, S. A., V. B. O'Donnell, et al. (1996).** "Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells." Am J Physiol 271(4 Pt 2): H1626-1634.
- Jornot, L. and A. F. Junod (1989).** "Hypoxanthine-xanthine oxidase-related defect in polypeptide chain initiation by endothelium." J Appl Physiol 66(1): 450-457.
- Klatt, P. and S. Lamas (2000).** "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress." Eur J Biochem 267(16): 4928-4944.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzler, et al. (1997).** "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science 275(5303): 1132-1136.
- Konopleva, M., S. Zhao, et al. (1999).** "Apoptosis. Molecules and mechanisms." Adv Exp Med Biol 457: 217-236.
- Kumar, S. and S. L. Sitasawad (2009).** "N-acetylcysteine prevents glucose/glucose oxidase-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in H9c2 cells." Life Sci 84(11-12): 328-336.
- Lambeth, J. D. (2002).** "Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases." Curr Opin Hematol 9(1): 11-17.
- Lassegue, B. and R. E. Clempus (2003).** "Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285(2): R277-297.
- Laursen, J. B., S. Boesgaard, et al. (2001).** "Endothelium-dependent vasorelaxation is inhibited by in vivo depletion of vascular thiol levels: role of endothelial nitric oxide synthase." Free Radic Res 35(4): 387-394.
- Le Bras, M., M. V. Clement, et al. (2005).** "Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death." Histol Histopathol 20(1): 205-219.
- Lee, D. H., J. G. Rhee, et al. (2009).** "Reactive oxygen species up-regulate p53 and Puma; a possible mechanism for apoptosis during combined treatment with TRAIL and wogonin." Br J Pharmacol 157(7): 1189-1202.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley, et al. (2005).** "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." Toxicol Appl Pharmacol 204(3): 216-237.
- Lorenz, H. M., M. Herrmann, et al. (2000).** "Role of apoptosis in autoimmunity." Apoptosis 5(5): 443-449.

- MacNaul, K. L. and N. I. Hutchinson (1993).** "Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions." Biochem Biophys Res Commun 196(3): 1330-1334.
- Madge, L. A. and J. S. Pober (2001).** "TNF signaling in vascular endothelial cells." Exp Mol Pathol 70(3): 317-325.
- Malhi, H., G. J. Gores, et al. (2006).** "Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?" Hepatology 43(2 Suppl 1): S31-44.
- Marchan, R., C. L. Hammond, et al. (2008).** "Multidrug resistance-associated protein 1 as a major mediator of basal and apoptotic glutathione release." Biochim Biophys Acta 1778(10): 2413-2420.
- Matsuzawa, A. and H. Ichijo (2005).** "Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling." Antioxid Redox Signal 7(3-4): 472-481.
- Matsuzawa, A. and H. Ichijo (2008).** "Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling." Biochim Biophys Acta 1780(11): 1325-1336.
- Mello, C. C. and D. Conte, Jr. (2004).** "Revealing the world of RNA interference." Nature 431(7006): 338-342.
- Miura, Y. and Y. Koyanagi (2005).** "Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection." Rev Med Virol 15(3): 169-178.
- Moellering, D., J. Mc Andrew, et al. (1999).** "The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase." FEBS Lett 448(2-3): 292-296.
- Moldeus, P., I. A. Cotgreave, et al. (1986).** "Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine." Respiration 50 Suppl 1: 31-42.
- Morgan, M. J. and Z. G. Liu (2010).** "Reactive oxygen species in TNF $\alpha$ -induced signaling and cell death." Mol Cells 30(1): 1-12.
- Mueller, C. F., J. D. Widder, et al. (2005).** "The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress." Circ Res 97(7): 637-644.
- Munoz, M., M. Henderson, et al. (2007).** "Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer." IUBMB Life 59(12): 752-757.
- Natoli, G., A. Costanzo, et al. (1997).** "Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway." Science 275(5297): 200-203.

- Neumann, P., N. Gertzberg, et al. (2006).** "Peroxynitrite mediates TNF-alpha-induced endothelial barrier dysfunction and nitration of actin." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290(4): L674-L684.
- Nieminen, A. L. (2003).** "Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria." Int Rev Cytol 224: 29-55.
- Nies, A. T., G. Jedlitschky, et al. (2004).** "Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain." Neuroscience 129(2): 349-360.
- Oberhammer, F., J. W. Wilson, et al. (1993).** "Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation." EMBO J 12(9): 3679-3684.
- Ott, M., V. Gogvadze, et al. (2007).** "Mitochondria, oxidative stress and cell death." Apoptosis 12(5): 913-922.
- Pan, S. and B. C. Berk (2007).** "Glutathiolation regulates tumor necrosis factor-alpha-induced caspase-3 cleavage and apoptosis: key role for glutaredoxin in the death pathway." Circ Res 100(2): 213-219.
- Park, S. M., R. Schickel, et al. (2005).** "Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules." Curr Opin Cell Biol 17(6): 610-616.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003).** "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." Cell Death Differ 10(1): 26-35.
- Phelps, D. T., T. J. Ferro, et al. (1995).** "TNF-alpha induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C." Am J Physiol 269(4 Pt 1): L551-559.
- Pober, J. S. and W. Min (2006).** "Endothelial cell dysfunction, injury and death." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 2): 135-156.
- Porter, A. G. and R. U. Janicke (1999).** "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis." Cell Death Differ 6(2): 99-104.
- Rhee, S. G. (1999).** "Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger." Exp Mol Med 31(2): 53-59.
- Sarasin, A. (1999).** "The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis." Mutat Res 428(1-2): 5-10.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001).** "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med 30(11): 1191-1212.

- Schinzari, F., A. Armuzzi, et al. (2008).** "Tumor necrosis factor-alpha antagonism improves endothelial dysfunction in patients with Crohn's disease." Clin Pharmacol Ther 83(1): 70-76.
- Schulze-Osthoff, K., A. C. Bakker, et al. (1992).** "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation." J Biol Chem 267(8): 5317-5323.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, et al. (1998).** "Apoptosis signaling by death receptors." Eur J Biochem 254(3): 439-459.
- Sharp, R. E. and S. K. Chapman (1999).** "Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins." Biochim Biophys Acta 1432(2): 143-158.
- Shi, Y. (2002).** "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell 9(3): 459-470.
- Singh, A., K. J. Lee, et al. (1989).** "Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia- reperfusion injury." Circulation 80(6): 1795-1804.
- Smith, R. A., G. F. Kelso, et al. (2003).** "Using mitochondria-targeted molecules to study mitochondrial radical production and its consequences." Biochem Soc Trans 31(Pt 6): 1295-1299.
- Sorescu, D. and K. K. Griendling (2002).** "Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure." Congest Heart Fail 8(3): 132-140.
- Spector, A., R. R. Huang, et al. (1985).** "The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on lens epithelial cell glutathione." Curr Eye Res 4(12): 1289-1295.
- St-Pierre, J., J. A. Buckingham, et al. (2002).** "Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain." J Biol Chem 277(47): 44784-44790.
- Statistisches Bundesamt Deutschland. (2011).** "2010: Herz-/Kreislaufkrankungen verursachten rund 41 % aller Todesfälle." Pressemitteilung Nr. 354
- Szasz, T., K. Thakali, et al. (2007).** "A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease." Exp Biol Med (Maywood) 232(1): 27-37.
- Takeda, K., A. Matsuzawa, et al. (2003).** "Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death." Cell Struct Funct 28(1): 23-29.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000).** "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279(6): L1005-1028.

- Thorburn, A. (2004).** "Death receptor-induced cell killing." Cell Signal 16(2): 139-144.
- Tibbles, L. A. and J. R. Woodgett (1999).** "The stress-activated protein kinase pathways." Cell Mol Life Sci 55(10): 1230-1254.
- Titorenko, V. I. and R. A. Rachubinski (2004).** "The peroxisome: orchestrating important developmental decisions from inside the cell." J Cell Biol 164(5): 641-645.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004).** "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol 122(4): 339-352.
- Tribull, T. E., R. H. Bruner, et al. (2003).** "The multidrug resistance-associated protein 1 transports methoxychlor and protects the seminiferous epithelium from injury." Toxicol Lett 142(1-2): 61-70.
- Tsujimoto, Y., T. Nakagawa, et al. (2006).** "Mitochondrial membrane permeability transition and cell death." Biochim Biophys Acta 1757(9-10): 1297-1300.
- Ullrich, V. and M. Bachschmid (2000).** "Superoxide as a messenger of endothelial function." Biochem Biophys Res Commun 278(1): 1-8.
- Vaziri, N. D., X. Q. Wang, et al. (2000).** "Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats." Hypertension 36(1): 142-146.
- Vermes, I., C. Haanen, et al. (1995).** "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods 184(1): 39-51.
- Wajant, H. (2003).** "Death receptors." Essays Biochem 39: 53-71.
- Weiss, N., Y. Y. Zhang, et al. (2001).** "Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A 98(22): 12503-12508.
- Widder, J. D., T. J. Guzik, et al. (2007).** "Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(4): 762-768.
- Wijnholds, J., E. C. deLange, et al. (2000).** "Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier." J Clin Invest 105(3): 279-285.
- Winston, B. W., E. D. Chan, et al. (1997).** "Activation of p38mapk, MKK3, and MKK4 by TNF-alpha in mouse bone marrow-derived macrophages." J Immunol 159(9): 4491-4497.

- Xu, G. and Y. Shi (2007).** "Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis." Cell Res 17(9): 759-771.
- Yang, X., H. R. Stennicke, et al. (1998).** "Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7." J Biol Chem 273(51): 34278-34283.
- Yin, X. M. (2000).** "Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways." Cell Res 10(3): 161-167.
- Yoshida, A., Y. Pommier, et al. (2006).** "Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells." Int J Hematol 84(1): 31-37.
- Yoshida, T., M. Watanabe, et al. (1996).** "Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol 28(8): 1759-1767.
- Zhang, C., T. W. Hein, et al. (2006).** "Activation of JNK and xanthine oxidase by TNF- $\alpha$  impairs nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles." J Mol Cell Cardiol 40(2): 247-257.
- Zhang, H., Y. Park, et al. (2009).** "Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction." Clin Sci (Lond) 116(3): 219-230.
- Zhang, J., D. Zhang, et al. (2004).** "FADD and its phosphorylation." IUBMB Life 56(7): 395-401.
- Zhang, Y., J. D. Schuetz, et al. (2004).** "Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells." J Pharmacol Exp Ther 311(2): 449-455.
- Zhao, H., J. Joseph, et al. (2005).** "Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence." Proc Natl Acad Sci U S A 102(16): 5727-5732.
- Zielonka, J., J. Vasquez-Vivar, et al. (2006).** "The confounding effects of light, sonication, and Mn(III)TBAP on quantitation of superoxide using hydroethidine." Free Radic Biol Med 41(7): 1050-1057.
- Zulueta, J. J., F. S. Yu, et al. (1995).** "Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane." Am J Respir Cell Mol Biol 12(1): 41-49.
- Zuo, Y., B. Xiang, et al. (2009).** "Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1." Cell Res 19(4): 449-457.