

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. S. Maßberg

**Monozytenadhäsion an Endothelzellen unter Einfluss von Flavonoiden  
und Stressfaktoren**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Verena Weimann  
geb. Hauser  
aus Augsburg

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatlerin: Priv. Doz. Dr. med. Ute Wilbert-Lampen

Mitberichterstatler: Prof. Dr. med. Federico Tatò  
Priv. Doz. Dr. med. Rolf Weidenhagen

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Korbinian Lackermair

Dekan: **Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel**

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2020

für Alexander

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Pathogenese der Atherosklerose</i>	1
1.1.1	Verletzungsreaktionshypothese	1
1.1.2	Hypothese der Lipoprotein-induzierten-Atherosklerose	2
1.1.3	Adhäsionsmoleküle bei der Atherosklerose	3
1.1.4	ITGAM/ICAM-1	4
1.2	<i>Risikofaktoren</i>	6
1.3	<i>Stress</i>	6
1.4	<i>Stressreaktion</i>	7
1.4.1	Chronische Hyperaktivität der HPA-Achse	8
1.4.2	Veränderungen der SA-Achse bei chronischem Stress	9
1.5	<i>CRH-Rezeptoren</i>	9
1.6	<i>Endothelin-1</i>	10
1.7	<i>Neurohumorale Aktivierung</i>	11
1.8	<i>Flavonoide</i>	12
	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	14
<b>2</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>17</b>
3.1	<i>Laborgeräte</i>	17
3.2	<i>Behältnisse</i>	18
3.3	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	18
3.4	<i>Experimentell untersuchte Zellen</i>	21
3.4.1	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen CDC/EU.HMEC-1 (HMEC-1)	21
3.4.2	Humane monozytäre Zelllinie (THP-1)	21
3.5	<i>Experimentell untersuchte Peptide und Stimulantien</i>	22
3.5.1	Corticotropin-Releasing-Hormon	22
3.5.2	Noradrenalin	22
3.5.3	Flavonoidkonzentrationen	22
	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
3.6	<i>Zellkultur</i>	24
3.6.1	Zellkultur HMEC-1	24
3.6.2	Zellkultur THP-1	25
3.6.3	Durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur (CD 4/CD 40)	25
3.6.4	Überprüfung der Viabilität der Zellkultur	26

3.7	<i>Fluoreszenzphotometrisches Adhäsionsassay</i>	26
3.7.1	Fluoreszenzfärbung der Monozyten	26
3.7.2	Beschreibung der Methode	27
3.7.3	Berechnung der adhärenierten THP-1-Monozyten	28
3.8	<i>Endothelin-1 Messung</i>	29
3.8.1	Versuchsvorbereitung	29
3.8.2	Endothelin-1 Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
3.8.3	Proteinmessung	31
3.9	<i>Reverse-Transkriptase-Polymerase-chain-reaktion (rtPCR)</i>	32
3.9.1	Primer	32
3.9.2	RNA-Isolation	33
3.9.3	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	33
3.9.4	rtPCR	34
3.9.5	Auswertung	36
3.10	<i>Western-Blot</i>	36
3.10.1	Durchführung der Methode	36
3.10.2	Auswertung der Methode	37
3.11	<i>Statistik</i>	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	<i>Zellviabilität</i>	39
4.2	<i>Adhäsionsassay</i>	39
4.3	<i>Endothelin-1-ELISA</i>	44
4.4	<i>rt-PCR</i>	47
4.5	<i>Western-Blot</i>	50
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
5.1	<i>Stress als atherogener Faktor</i>	51
5.2	<i>Flavonoide als Stressinhibitoren</i>	51
5.3	<i>Adhäsionsversuche</i>	53
5.4	<i>ET-1-ELISA-Versuche</i>	54
5.5	<i>rt-PCR-Versuche</i>	55
5.6	<i>Western-Blot-Versuche</i>	56
5.7	<i>Limitationen</i>	56
5.8	<i>Ausblick</i>	57
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>Danksagung</b>	<b>67</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>68</b>

## Verwendete Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ak	Antikörper
AUC	Area under the curve
BCA	Bicinchoninsäure
CAM	cell adhesion molecules
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CDC	Center of Disease Control and Prevention
CMFDA	Chloromethyl Derivat of Fluorescein diacetat
CR-3	Komplement-Rezeptor 3
CRH	Corticotropin-releasing-Hormon
CT	cycle threshold
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET	Endothelin
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein
HMEC-1	human microvascular endothelial cells
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HRP	horse radish peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and related Health problems

ITGAM	Integrin-Alpha-M-Beta-2
LDL	low density lipoprotein
MAC-1	Macrophagen-1-Antigen
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MHC	major histocompatibility complex
MINaAC	minimale Antiaggregatorische Konzentration
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	„natural-killer“ Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOR	Noradrenalin
oxLDL	oxidized low density lipoprotein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RLU	relative Lumineszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rtPCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SA-Achse	sympatho-adrenerge Achse
SR-A	Scavenger receptor A
THP-1	Tohoku-Hospital-Pediatrics-1
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1



# **1 Einleitung**

In der aktuellen Liste der Todesursachen in Deutschland entfallen nach dem statistischen Bundesamt 41% aller Todesfälle auf Erkrankungen des kardiovaskulären Systems nach ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems). 17,8% aller Todesfälle sind direkt auf die Folgen der Atherosklerose und den resultierenden Ischämien zurückzuführen (Myokardinfarkt, Schlaganfall etc.)<sup>1</sup>. Eine für den Patienten schonende langjährige Präventionsmaßnahme zu entwickeln ist deshalb ein zentrales Anliegen der Atheroskleroseforschung um den Verlust gesunder Lebensjahre zu minimieren. Dabei wird seit Mitte der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts neben synthetischen Wirkstoffen auch die große Gruppe der pflanzlichen Flavonoide mit Blick auf deren antiinflammatorische Wirkung zunehmend beforscht.

## **1.1 Pathogenese der Atherosklerose**

### **1.1.1 Verletzungsreaktionshypothese**

Die Mechanismen bei der Entstehung der Atherosklerose sind komplex. Dabei haben sich die molekularbiologischen Hypothesen über die Entstehung in den letzten Jahren stark verändert. Zunächst wurde in der „Response-to-injury-hypothese“ (Verletzungsreaktionshypothese)<sup>2</sup> ein Endothelschaden als Ursprung der Intimaverdickung vermutet. Mechanische, chemische oder immunologische Einflüsse legen die subendothelialen Zellen der Arterien frei. Bei gesunden Patienten heilen diese Läsionen in den meisten Fällen folgenfrei ab. Entstehen diese Schäden häufiger oder fehlt eine suffiziente Wundheilung initiiert dies die Atherogenese. Thrombozyten werden durch diverse, freigesetzte

Mediatoren dieser Endothelläsionen zur Degranulation des Wachstumsfaktors PDGF (platelet-derived growth factor) stimuliert. Dieser führt als bedeutendster Wachstumsfaktor des Blutplasmas zur Proliferation glatter Muskelzellen und Fibroblasten.<sup>3</sup> Über einen längeren Zeitraum verengt so das Gefäßlumen. Die Deckschicht über den neu gebildeten Zellen wird als fibröse Kappe bezeichnet. Je nach Stadium und Zusammensetzung unterscheiden sich diese Kappen in ihrer Stabilität. Die Engstellen, die durch die Zellproliferation der Gefäßwand entstanden sind, führen zu einer Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit und so zu einer größeren Scherkraftbelastung an den fibrösen Kappen. Wird dadurch eine Kappe abgeschert kann sie eine nachfolgende Arterie verlegen und so zur Ischämie führen.

### **1.1.2 Hypothese der Lipoprotein-induzierten-Atherosklerose**

Aus diesem Grund werden in aktuelleren Studien die Zusammensetzung und die Veränderung dieser Kappen untersucht. In der „Lipoprotein-induzierten-Atherosklerose-Hypothese“ ist die Verletzungsreaktionshypothese nur noch ein Teilschritt dazu.<sup>4</sup> Die oxidative Modifizierung von LDL und dessen Aufnahme durch Makrophagen wird demnach dem Entstehungsprozess ebenso vorausgesetzt. Hierbei wird besonders dem „scavenger-pathway“ (deutsch: Abfallbeseitigungsweg) große Bedeutung beigemessen. Der größte Teil des Plasma-LDL wird hauptsächlich von den Hepatozyten und den Endothelzellen aufgenommen. Diese Zellen verfügen jedoch über eine begrenzte Kapazität. Der „scavenger-pathway“ beschreibt die Aufnahme des oxLDLs in Monozyten, die am Ort der Endothelverletzung emigriert und zu Makrophagen differenziert sind. Da diese Zellen über keinerlei Regulationsmechanismen verfügen nehmen sie zuviel

oxLDL aus dem Plasma auf und werden so zu Schaumzellen die dann den „fatty streak“ (deutsch: Fettstreifen) bilden, die erste Stufe der Atherosklerose.<sup>5</sup>

Beiden Hypothesen gemein ist der weitere inflammatorische Prozess an den funktionsgestörten Endothelstellen.

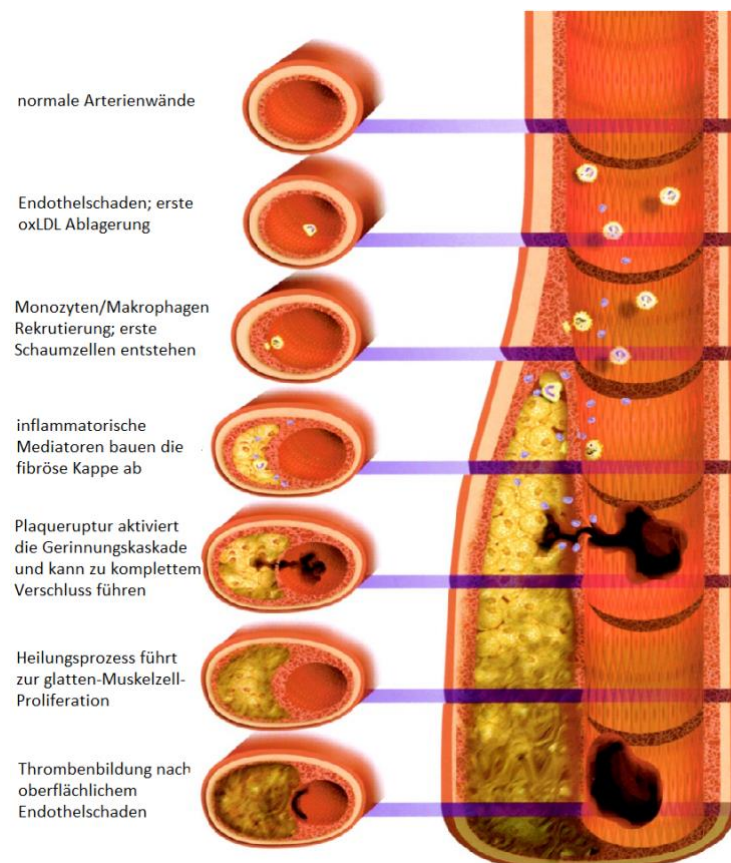


Abbildung 1 modifiziert nach Libby et al.<sup>4</sup> : Initiation, Progression und Komplikation koronaratherosklerotischer Plaques

### 1.1.3 Adhäsionsmoleküle bei der Atherosklerose

Von wesentlicher Bedeutung bei der Zell-Zell-Interaktion zwischen Monozyten und Endothelzellen sind in der Gruppe der Membranproteine die Zell-Adhäsions-

Moleküle (CAM). Dazu gehören die Calcium-abhängigen-CAMs der Immunglobulin-Superfamilie und zu den Calcium-unabhängigen die Selektine, Integrine und Cadherine. Sie stellen Zell-Zell-Kontakte oder von Zelle zu extrazellulärer Matrix her. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Organ- und Gewebebildung als Adhäsionskontakte, beim Erfassen von Antigenen im Körper durch T-Zellen und in der Atherogenese bei der Migration der Monozyten durch das Endothelgewebe.<sup>6</sup> An diesem Prozess sind diverse Adhäsionsmoleküle beteiligt. Zunächst wird der Monozyt aus dem Blutfluss abgebremst. Dies geschieht mittels den P- und E-Selektinen die auf der aktivierten Endothelzelloberfläche exprimiert werden und an Carbohydrat-Liganden auf der Monozytenoberfläche binden.<sup>7</sup> In wie weit oxLDL an diesem initialen Prozess beteiligt ist, ist noch nicht hinreichend geklärt, es wurde jedoch ein Zusammenhang zwischen erhöhten oxLDL-Plasmaspiegeln und vermehrten kardiovaskulären Erkrankungen gesichert.<sup>8</sup> Vermutlich werden durch oxLDL Endothelzellen zur P-Selektin Expression stimuliert. Diese Bindung allein wäre jedoch zu schwach, um den Monozyt an die Endotheloberfläche zu binden.

#### **1.1.4 ITGAM/ICAM-1**

Eine weitere Komponente zur festen Adhäsion stellt dabei das Alpha-M-Beta-2-Integrin (ITGAM) dar. Dieses Adhäsionsmolekül ist auch unter den Namen Macrophagen-1-Antigen (MAC-1), Komplement-Rezeptor 3 (CR3) oder „Cluster-of-Differentiation 11b“ (CD11b) bekannt.<sup>6,9</sup>

Es wird im menschlichen Organismus auf neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert und bindet unter anderem an

Lipopolysaccharide, Beta-Glucan, Fibrinogen, Faktor X und L-Selektin.<sup>10,11</sup> Somit spielt ITGAM auch eine Rolle in der Thrombogenese und der Hämostase.

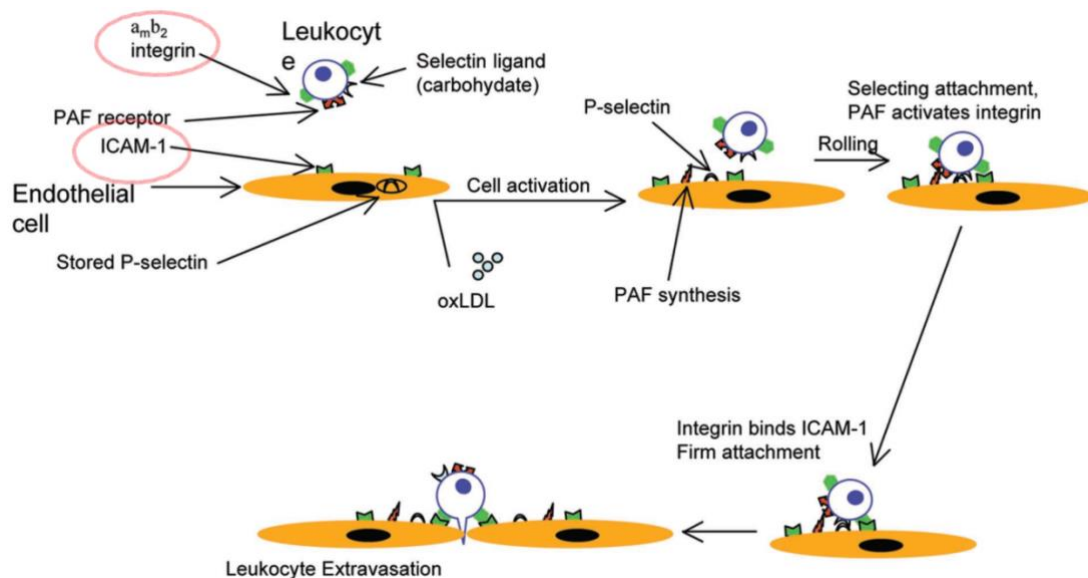


Abbildung 2 modifiziert nach Chi et al.<sup>12</sup>: Initialer Schritt der Diapedese der Monozyten in das Endothelgewebe

Wie sich die Rezeptoraffinität je nach Stimulation ändert ist nicht vollständig entschlüsselt, fest steht nur das eine CD11b Aktivierung über diverse Proteinkinase-gekoppelte-Signalwege in die Zelle geleitet wird. Als Membranrezeptor ist es mit CD11a und c bei inaktivierten Leukozyten etwa  $6-7 \times 10^3$  auf der Zelloberfläche vorhanden.<sup>13</sup> Die Bindung ans Endothel bei der Diapedese erfolgt mit hoher Affinität an das ICAM-1 der Endothelzellen. Dieses Molekül zählt zu den CAMs der Immunglobulin Superfamilie. ICAM-1 hat 7 Transmembrandomänen und ist an den G-Protein-Signalweg gekoppelt.<sup>9</sup> Diese Adhäsionsmoleküle konzentrieren sich bei aktivierten Endothelzellen mit anderen CAMs wie dem VCAM-1 als Andockstrukturen auf der Zelloberfläche.<sup>14</sup> Anschließend formt der Monozyt innerhalb von etwa 1-2 Minuten ein

Pseudopodium an der apikalen Oberfläche aus und gelangt so ins subendotheliale Gewebe.<sup>15</sup> Von hier aus beginnt die Plaquebildung und Verengung des Gefäßlumens.

## **1.2 Risikofaktoren**

In der Stratifikation des Risikos für einen Patienten bezüglich einer koronaren Herzerkrankung stehen vor allem die Faktoren Hypertonie, Diabetes Mellitus, Hypercholesterinämie, Adipositas, Bewegungsmangel und Nikotinabusus im Vordergrund.<sup>16-18</sup> Diese Faktoren wurden durch Aufklärungskampagnen in den letzten Jahrzehnten immer mehr ins Bewusstsein der Patienten gerückt und in Studien untersucht. Mittels skalierbarer Kriterien lassen sich diese Parameter mehr oder minder einfach messen und bewerten.

## **1.3 Stress**

In jüngeren Forschungsergebnissen wurde zudem der Faktor Stress als mögliche Ursache für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko identifiziert. Hierbei muss man laut H. Selye (1907-1982) zwischen zwei Stresskategorien unterscheiden.<sup>19</sup> Nur der negative Stress, auch als Distress<sup>20</sup> bezeichnet, zieht dauerhafte Veränderungen im menschlichen Organismus nach sich und ist somit vom Eustress, den der Patient als positiv und motivierend empfindet abzugrenzen. Umgangssprachlich wird mit Stress folglich der schädigende Distress bezeichnet, so auch im Weiteren dieser Arbeit. Er tritt in vielen Formen auf (psychisch, physisch, sozial) und lässt sich nur schwer objektiv erfassen. Das subjektive Empfinden des Patienten ist dabei ein wichtiger Anzeiger für sein jeweiliges Stresslevel.

## 1.4 Stressreaktion

In welcher Form auch immer der Patient diesen negativen Stress erfährt, kompensiert er diese Überbelastung in zwei Stufen. In einer akuten Stresssituation reagiert zunächst der Hypothalamus mit einer erhöhten Hormonsekretion, die den Körper kurzzeitig zu erhöhter Leistungsbereitschaft befähigt. Die Hypothalamus-Nebennierenmark-Achse (SA-Achse) steuert dabei die Sekretion der Katecholamine Adrenalin und in geringerem Maße Noradrenalin. Der Hypothalamus und andere höhergeschaltete Hirnareale lösen das Stresssignal am Sympathikus aus, dessen modifizierte zweite Neurone stellen die Markzellen der Nebenniere dar. So kommt es innerhalb kürzester Zeit zum Katecholaminausstoß in das Blut. Sie haben dort eine Wirkdauer von wenigen Minuten.<sup>21</sup> Die Katecholamine wirken über Adrenozeptoren an verschiedenen Organen. Unter anderem kontrahieren sie die arteriellen Gefäße von Haut und Nieren, sie erweitern die muskelversorgenden Arterien und erhöhen den Blutzuckerspiegel durch Glykogenolyse der Leber.<sup>22</sup> Das sympathische Nervensystem versucht dadurch kurzzeitig, zusätzliche Energie für eine Kampf- oder Fluchtreaktion bereitzustellen, erstmals 1915 beschrieben von W. Cannon (1872-1945).

Stellt sich eine längerfristige Stresssituation ein, adaptiert der Organismus mittels der HPA-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse), wie z.B. bei systemischen Infektionskrankheiten oder auch bei langanhaltenden psychischen Stresssituationen. Der Hypothalamus stimuliert mittels CRH (Corticotropin-releasing-Hormon) die Hypophyse zur ACTH-Sekretion (Adrenocorticotropes Hormon), ebenfalls wird  $\beta$ -Endorphin freigesetzt.<sup>23</sup> Das

ACTH führt in der Zona fasciculata der Nebennieren-Rinde zur Glucocorticoid-Sekretion, darunter vor allem Cortisol. Über die negative Rückkopplung hemmt dies sowohl die CRH als auch die ACTH Sekretion. So wird das empfindliche Gleichgewicht des Hormons reguliert und eine überschießende Stressreaktion verhindert. Cortisol ist an verschiedenen Stoffwechselprozessen, dem Mineralhaushalt und anderen Vorgängen beteiligt. Außerdem wirkt es immunsuppressiv und antiinflammatorisch. Cortisol wird in einer zirkadianen Rhythmik mit sekretorischen Episoden über den Tag sezerniert.<sup>22</sup> Neuere Forschungsergebnisse zeigen außerdem auch eine extrahypothalame CRH-Sekretion in verschiedenen Organen wie z.B. aus humanen peripheren mononuklearen Zellen.<sup>24</sup>

#### **1.4.1 Chronische Hyperaktivität der HPA-Achse**

Bei einer anhaltenden Überforderung kommt es zu keiner ausreichenden negativen Rückkopplung mehr, dies führt zum Anstieg der CRH-Expression und des Plasmacortisolspiegels. Im Tierexperiment wurden junge Mäuse chronisch gestresst, dabei wurde später bei den dann erwachsenen Mäusen im Ruhezustand eine signifikante Zunahme der CRH-mRNA-Expression im Gegensatz zur Kontrollgruppe beobachtet.<sup>25</sup> Eine weitere Tierstudie untersuchte die proinflammatorischen Effekte von CRH. Es wurde belegt, dass eine intradermale CRH-Injektion bei Mäusen und Ratten zu signifikant vermehrter Mastzelldegranulation und erhöhter Gefäßpermeabilität an der Injektionsstelle führt, im Gegensatz zur als Kontrolle injizierten Kochsalzlösung.<sup>26</sup> CRH wirkt somit nicht nur über die HPA-Achse sondern auch unmittelbar über eigenständige CRH-Rezeptoren.



#### **1.4.2 Veränderungen der SA-Achse bei chronischem Stress**

Die unterschiedliche Wirkung von Noradrenalin bei Patienten mit verschiedenen Stressprofilen wurde 1997 von Pike et al untersucht.<sup>27</sup> Zunächst wurden die Probanden über ihre Alltagssituation befragt und so in Gruppen mit und ohne chronischen Stress im Alltag unterteilt. In ihrem Experiment wurde durch einen kurzzeitigen Stressor (kurze schwierige Mathematikaufgaben) ein Katecholaminausstoß bei den Probanden provoziert. Dabei waren die gemessenen Katecholamine (Adrenalin/Noradrenalin) im Serum direkt nach dem Test bei der chronisch gestressten Gruppe signifikant erhöht. Als Auswirkung auf das Immunsystem wurde dabei die Anzahl und Aktivität der Natural-Killer-Cells (NK-Cells) untersucht und festgestellt das die Kontrollgruppe ohne alltäglichen Dauerstress über signifikant weniger dafür aktivere NK-Cells verfügte. Chronischer Stress kann folglich die akute und die langzeitige Stress- und Immunantwort verändern.

#### **1.5 CRH-Rezeptoren**

Die beiden CRH-Rezeptortypen R1 und R2 werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Sie gehören zu den heptahelikalen Transmembranproteinen und sind an den G-Protein-Signalweg gekoppelt. Während CRH-R1 nur in einer Form hauptsächlich im zentralen Nervensystem vorkommt und dort überwiegend eine Rolle in der HPA-Achse spielt, sind vom CRH-R2 drei verschiedene Isotypen bekannt ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ),<sup>28</sup> die vorwiegend peripher und im Gehirn von Ratten subkortikal lokalisiert sind.<sup>29</sup> CRH-R2  $\alpha$  stellt dabei den größten Anteil zentral subkortikal lokalisierter CRHR2-Rezeptoren. CRH-R2  $\beta$

und  $\gamma$  sind überwiegend an Reaktionen des autonomen Nervensystems beteiligt und befinden sich beispielsweise in Arterien des Gehirns, in der Lunge oder in der Skelettmuskulatur.<sup>30</sup> Neben CRH binden auch Urocortin I, II und III an die CRH-Rezeptoren.<sup>31</sup> Urocortin zählt ebenfalls zu den Neurohormonen und ist zu 45% sequenzzhomolog zu CRH,<sup>32</sup> die genauen Effekte dieses Hormons sind noch nicht ausreichend erforscht. Für die Entstehung der Atherosklerose sind vor allem die CRH-R2 Isotyp  $\beta$  und  $\gamma$  von Bedeutung. Bei CRH-R2-Knock-out-Mäusen wurde eine verringerte Stresstoleranz beobachtet, außerdem wurde eine reduzierte Antwort auf eine induzierte Colitis beobachtet.<sup>31</sup> Ein antiinflammatorischer Effekt bei einer induzierten Colitis wurde ebenfalls an wild-Type-Mäusen nachgewiesen, die zunächst mit Astressin2B, dem potentesten CRH-R2-Rezeptorantagonisten, behandelt wurden. Somit zeigt sich das CRH eigenständig über die peripheren CRH-Rezeptoren maßgeblich an einer suffizienten Stressantwort beteiligt ist und nicht ausschließlich über die Glucocorticoide wirkt.<sup>31</sup>

Die untersuchte monozytäre Zelllinie THP-1 exprimiert sowohl R1 als auch R2 auf der Oberfläche und zeigt somit dasselbe Verhalten wie originäre PMBCs aus Patientenblut.<sup>33</sup>

## **1.6 Endothelin-1**

Seit der Entdeckung des Endothelin-1 1988 von Yanagisawa et al. besteht ein starkes Interesse die Wirkungen und Zusammenhänge in Verbindung mit Herzkreislauferkrankungen herzustellen. Es stellt zurzeit neben Urotensin II den stärksten und langanhaltendsten bekannten Vasokonstriktor dar, etwa 100-mal so stark wie Noradrenalin.<sup>34</sup> Es wird vorwiegend in Endothelzellen und glatter

Gefäßmuskulatur zunächst als Präproendothelin produziert. Davon wird das Proendothelin (Big-Endothelin) durch die Furin-Like-Protease abgespalten. Vom Proendothelin wird anschließend von einer Zink-Metalloprotease, dem Endothelin-konvertierenden-Enzym, das Endothelin-1 abgespalten. Es wirkt parakrin an den G-Protein-gekoppelten ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> Rezeptoren anderer Endothelzellen. Da die ET<sub>B</sub> Rezeptoren ihre wichtigste Bedeutung in der Inhibition der alveolären Lungenclearance haben sind sie in der Atheroskleroseforschung durch zu geringes Vorkommen im Endothelgewebe unerheblich. Außer in der Vasokonstriktion greift Endothelin-1 über die ET<sub>A</sub>-Rezeptoren auch in andere Abläufe ein, wie z.B. der Herzhypertrophie und der daraus resultierenden Herzinsuffizienz und auch in die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur.<sup>35</sup> Auch ein direkter Zusammenhang von Plasmaendothelin und Atherogenese wurde in den letzten Jahren intensiv beforscht. Eine signifikant verringerte Progression der Atherosklerose bei Mäusen mit cholesterinreicher Diät konnte von Iwasa et. al durch eine Blockade der Endothelinrezeptoren Typ A und B nachgewiesen werden.<sup>36</sup> Durch diese Blockade wurden die Plasma-ET1-Spiegel der Tiere gesenkt und die NO-Spiegel gleichzeitig erhöht. Die führte zu einer signifikanten Verringerung der Atherosklerose und des fibroproliferativen Prozesses.

## **1.7 Neurohumorale Aktivierung**

Eine entscheidende Rolle in der Entstehung der chronischen linksventrikulären Herzinsuffizienz sind die neurohumoralen Aktivierungswege.<sup>37</sup> Hierzu zählt auch die gesteigerte Ausschüttung von Vasokonstriktoren wie Endothelin oder dem antidiuretischen Hormon. Vor allem der direkte Zusammenhang gesteigerter

Endothelin-Ausschüttung und einer ungünstigen Prognose der Herzinsuffizienz wurde in der Vergangenheit wiederholt belegt.<sup>38</sup>

## 1.8 Flavonoide

Flavonoide stellen in den letzten Jahren vielfältige Möglichkeiten als Therapeutika in diversen in vivo und klinischen Studien unter Beweis. Hieraus erwuchs zunehmend Interesse an den Pflanzenwirkstoffen, auch zu Therapieansätzen in der kardiovaskulären Forschung.

Die große Gruppe der Polyphenole zählt zu den sekundären Pflanzenstoffen. Sie sind in sehr unterschiedlichen Konzentrationen ubiquitär in Pflanzen vertreten. Darunter fallen unter anderem aromatische Verbindungen wie Zimtsäurederivate, Procyanidine, Benzoesäurederivate und die große Gruppe der Flavonoide. Mit der Nahrung nimmt ein Mensch etwa 23 mg pro Tag an Flavonoiden zu sich. Der größte Teil davon ist Quercetin.<sup>39</sup> Einige Beispiele für Pflanzen mit einem hohen Flavonoidgehalt sind Granatäpfel, Zwiebeln, grüner Tee und Weintrauben. Allen Flavonoiden gemein ist die Flavan-Grundstruktur.

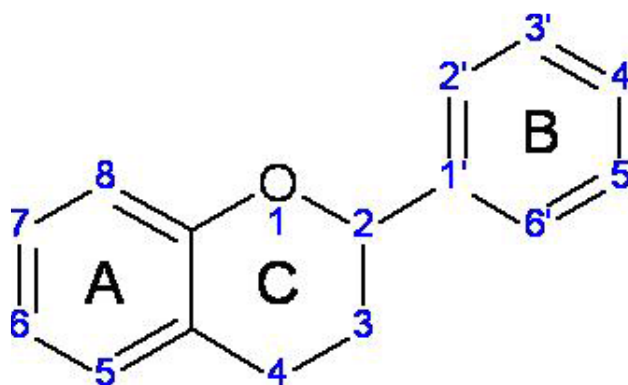


Abbildung 3 nach Bojić et al.<sup>40</sup>: Flavan-Basis

Modifikationen vor allem am C-Ring unterteilen die Flavonoide in ihre Untergruppen und verleihen ihnen so unterschiedliche chemische Eigenschaften. Etwa 6000 Flavonoide sind derzeit bekannt. So groß diese Stoffgruppe ist, so unterschiedlich sind die Wirkungen der einzelnen Stoffe auf den menschlichen Organismus.

Bereits 1936 wurde von Rusznyak et al. ein positiver Effekt von Zitrusfrüchten auf Gefäßstabilität und –permeabilität beschrieben.<sup>41</sup>

Immer häufiger wird in der Forschung auf natürliche, nebenwirkungsärmere Wirkstoffe zurückgegriffen und chemisch neu synthetisierten Stoffen vorgezogen. Einzelne Flavonoide wurden 2011 von Bojić et al.<sup>40</sup> auf ihre antiaggregatorische Wirkung im Vergleich zu einer Clopidogrel-induzierten Thrombozyten-Aggregationshemmung untersucht. Hierbei wurde Vollblut von gesunden Probanden für 6 Minuten mit einer Flavonoidlösung inkubiert. Bojić et al. gelang es dabei Aktivitätsunterschiede verschiedener Flavonoidstrukturen zu isolieren. Ein Beispiel dafür sind die besseren antiaggregatorischen Eigenschaften methylierter Flavanone im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden hydroxylierten Flavonen.

## **Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den Einfluss ausgewählter Flavonoide auf den initialen Schritt der Atherosklerose am Zellmodell in vitro zu untersuchen. Als einzig reversibler Schritt im dargestellten Prozess werden die ersten oxLDL-Ablagerungen angesehen, die initial zur vermehrten Monozytenrekrutierung und Migration durch das Endothelgewebe in die Gefäßwände führen. Bei den aktuellen Therapieansätzen wird durch Absenken des LDL-Cholesterinspiegels im Blutplasma versucht ein Fortschreiten der Atherosklerose zu verhindern. Die Wirksamkeit der Statine als Lipidsenker wurde in vergangenen Studien ausführlich untersucht und belegt.<sup>42-44</sup> Sie reduzieren signifikant das Risiko eines akuten Koronarsyndroms.<sup>42</sup> Jedoch nicht nur, wie zunächst vermutet wurde, indem sie den stenosierenden Vorgang durch die Entstehung von weiteren Schaumzellen aufhalten, sondern auch durch ihre antiinflammatorische Wirkung auf die Monozyten und die Inhibition der Proliferation der glatten Muskelzellen. Im Tiermodell wurde bei einer induzierten Atherosklerose durch Statintherapie sowohl die Monozytenmigration als auch die Plasmaspiegel der Entzündungsmediatoren MCP-1 (Monozyten-Lockstoff-Protein-1) und Nekrosefaktor- $\kappa\beta$  im Gegensatz zur Kontrollgruppe signifikant verringert.<sup>45</sup>

Da Flavonoide auch über antiinflammatorische Eigenschaften verfügen ergibt sich somit die These, dass der Wirkung von Stresshormonen durch eine Koinkubation mit Flavonoiden entgegengewirkt werden kann. Das Eindämmen der Entzündungsreaktion ist vor allem deshalb von grundlegender Bedeutung, da dies die fibröse Kappe stabilisieren kann.

Eine Destabilisierung passiert durch vermehrte Aktivierung von Metalloproteinasen, die bei starken Entzündungsreaktionen vermehrt auftreten. Sie werden vermutlich sowohl von Leukozyten als auch von den Endothelzellen selbst exprimiert.<sup>46</sup>

Neuere Studien versuchten diesen Statin-induzierten Effekt durch Flavonoide nachzustellen. Ludwig et al. wiesen anhand der Monozytenadhäsion an HUVEC-Zellen (humanes Endothel aus der V. umbilicalis) eine antiinflammatorische Wirkung des Epigallocatechin-3-gallate nach, ein Flavonoid, extrahiert aus grünem Tee. Die mit dem Flavonoid vorbehandelten und mit TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen adhärten über 40% weniger am Endothel im Vergleich zur TNF- $\alpha$ -Kontrolle.<sup>47</sup>

## 2 Fragestellung der Arbeit

Wie dargestellt spielt die Atherosklerose eine bedeutende Rolle in einer immer älter werdenden Gesellschaft. Auf der Suche nach nebenwirkungsarmen Dauermedikationen, die die Entstehung und Progression aufhalten können, werden seit einiger Zeit die Flavonoide in vitro und in vivo in der Grundlagenforschung immer stärker auf ihre Atherosklerose inhibierenden Eigenschaften hin untersucht.

So sind die Fragen dieser Arbeit:

- Lässt sich die gesteigerte Monozytenadhäsion, initiiert durch CRH bzw. Noradrenalin, mittels Koinkubation mit Flavonoiden verringern?
- Wird weniger ET-1 von CRH bzw. Noradrenalin stimulierten HMEC-1 und THP-1-Zellen sezerniert, wenn sie mit Flavonoiden kostimuliert werden?
- Wird weniger CRHR2-mRNA von HMEC-1 und THP-1-Zellen exprimiert, wenn sie außer mit CRH bzw. Noradrenalin auch mit Flavonoiden kostimuliert werden?
- Werden weniger CRHR2 -Rezeptoren von CRH bzw. Noradrenalin stimulierten HMEC-1 und THP-1-Zellen exprimiert, wenn sie mit Flavonoiden kostimuliert werden?



### **3 Materialien**

#### **3.1 Laborgeräte**

Inkubator CB 150 : Fa. Binder, Deutschland

iQ5-Cycler: Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

NanoDrop2000: Fa. NanoDrop Products, USA, PeqLab Biotechnologie,  
Deutschland

Bio-Rad iQ5 Version 2.0: Fa. Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

Durchflusszytometer: FACScan™ Fa. Becton, Dickinson and Company, USA

GENios Multiplate-Reader, XFlour4-Software: Fa. TECAN, Deutschland

Microsoft Office Home and Student 2010 Word/Exel: Fa. Microsoft Corp., USA

IBM SPSS Statistics 20, Version 2012, IBM Corp., USA

Multipette/Pipetten: Eppendorf AG, Deutschland

Sterilbank: Steril GARD III Advance – Baker Company

Vortexer: Reat top, Fa. Heidolph, Deutschland

Zentrifugen: 5417R und 5804 von Eppendorf AG, Deutschland

Horizontalschüttler: MiniRocker MR-1 Fa. Kisker Biotech, Deutschland;

Promax1020 Fa. Heidolph, Deutschland

Blockthermostat: 3T100 Fa. Kleinfeld Labortechnik, Deutschland

Taumelmischer: RT20 Fa. CAT M. Zipperer GmbH, Deutschland

Thermostat: Thermoboy, Fa. Lauda, Deutschland

Mikroskop: Fa. Zeiss AG, Deutschland

Western-Blot Netzteil: XCell II™ Blot Module, Fa. Invitrogen, USA

Western-Blot Kammer: XCell Sure Lock™, Fa. Invitrogen, USA

Western-Blot Entwickler: X-Omat, Fa. Kodak, USA

### **3.2 Behältnisse**

15 ml/50 ml und Durchflusszytometer Röhren, Zellkulturplatten klar (12-Well):

BD Falcon, USA

1,5-ml-Caps, 2-ml-Caps: Eppendorf AG, Deutschland

Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten klar (24-Well): Fa. Sarstedt AG&Co.,  
Deutschland

Assayplatten Weiss (96-Well), Zellkulturplatten klar (6-Well): Costar®, Fa.  
Corning Inc., USA

Zellkulturplatten klar (96-Well): Fa. TPP AG, Schweiz;

### **3.3 Verbrauchsmaterialien**

#### **Zellkultur**

PBS: Biochrom AG, Deutschland

FCS clone low Endotoxin tested: Fa. c.c.pro GmbH, Deutschland

RPMI 1640-VLE-Medium: Biochrom AG, Deutschland

Ciprofloxacin: Fa. Fresenius Kabi GmbH, Österreich

MCDB 131 ohne Phenolrot/ohne L-Glutamin: Fa. c.c.pro GmbH, Deutschland

RPMI 1640-Medium Modified: Biochrom AG, Deutschland

Trypsin, EGF, Hydrocortison, BSA, L-Glutamin: Fa. Sigma-Aldrich, USA

#### **Stimulantien**

Norepinephrine bitartrate salt: Fa. Sigma-Aldrich, USA

Humanes CRH: Fa. Sigma-Aldrich, USA

## **Flavonoide**

Quercetin dihydrate: Fa. Sigma-Aldrich, USA

Isosakuranetin, Pinocebrim-7-Methylether, 3,6-Dihydroxyflavone, Syringetin,

Rhamnetin, (-)-Epicatechin, Tectochrysin, 6-Hydroxyflavone: Fa. Extrasynthese, Frankreich

## **Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Fa. MACS Miltenyi Biotec, Deutschland

- mAb CD 14 – FITC

- Isotypkontrolle - IgG2a-FITC

Fa. BioLegend, USA

- Isotypkontrolle FITC – IgG1

- Isotypkontrolle PE - IgG1

Fa. eBioscience, USA

- 7-AAD Viability staining solution

Fa. BD Biosciences, USA

- mAb CD 4 – FITC

Fa. Immunotech, Frankreich

- mAb CD 40 – PE

PBS (für Durchflusszytometer): hauseigene Herstellung

## **PCR**

RNase-Free DNase Set: Katalognr. 79254; Fa. Qiagen, Deutschland

Primersynthese – Fa. Eurofins Medigenomix, Deutschland

Biocoll-Separating-Solution: Fa. Biochrom AG, Deutschland

MACS Monozytenisolation Kit II: Fa. Miltenyi Biotech, Deutschland

CMFDA Celltracker C-7025: Fa. Invitrogen Molecular Probes, Deutschland

Endothelin Elisa Kit: QuantiGlo® Chemiluminescent Sandwich Elisa (Katalognr: QET00B); Fa. R&D Systems Inc., USA

Protein Quantifizierung: Pierce® BCA Protein Assay Kit (Katalognr: 23227); Fa. Thermo Fisher Scientific, USA

### **FACS-Puffer:**

5 g BSA wurde auf 1000 ml mit PBS aufgegossen und unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurden 0,4 g Natriumazidpulver zugegeben und wieder unter ständigem Rühren gelöst und dann sterilfiltriert.

### **Western Blot:**

NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels 4-12% 8x8cm, Fa. Life Technologies, USA

Nitrocellulosemembran: Novex® 0,45 µm Pore Size, Fa. Life Technologies, USA

Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Fa. Thermo Fisher Scientific, USA

Ponceau S Solution, Fa. Sigma-Aldrich, USA

NuPAGE™ Transfer Buffer (20x), Fa. Life Technologies, USA

NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20x), Fa. Life Technologies, USA

Michpulver Blotting Grade, Fa. Carl Roth GmbH, Deutschland

Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Fa. Thermo Fisher Scientific, USA

Antikörper: CRHR2 Rabbit anti-Human Polyclonal IgG Antibody, Fa. LifeSpan Biosciences Inc., USA

Coomassie-Brillant-Blau: Coomassie® Stain Solution, Bio-Rad Laboratories,  
USA

Tween-Puffer: Pierce™ 20X PBS Tween™-20, Fa. Thermo Fisher Scientific,  
USA

### **3.4 Experimentell untersuchte Zellen**

#### **3.4.1 Humane mikrovaskuläre Endothelzellen CDC/EU.HMEC-1 (HMEC-1)**

Die HMEC-1 Zelllinie wurde über das “Center of Disease Control and Prevention/National Center for Infectious Disease”, Atlanta, Georgia, USA bezogen. Diese immortalisierte Zelllinie ist seit langem in in-vitro-Adhäsionsstudien mit Monozyten etabliert und weist alle wichtigen Eigenschaften einer humanen Endothelzelle auf. Die Zellen bewachsen den Flaschenboden in einem pflastersteinartigen Monolayer und exprimieren u. a. die Oberflächenmoleküle CD31/54 (ICAM-1) /58 (VCAM-1 und MHC I). Ebenso wurde die Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzelllinie bestätigt.<sup>48,49</sup>

#### **3.4.2 Humane monozytäre Zelllinie (THP-1)**

THP-1 Zelllinie wurde über das Leibnitz-Institut DSMZ GmbH (Deutsche Sammlung von Organismen und Zellkulturen) erworben. Die humane monozytäre Zelllinie THP-1 wurde 1978 in Japan aus dem Blut eines einjährigen an einer akuten monozytären Leukämie erkrankten Jungen gewonnen, benannt wurde sie nach dem zugehörigen Kinderkrankenhaus (Tohoku Hospital Pediatrics-1).

Die immortalisierten Zellen zeigen mit ihrer Fc und C3b Rezeptorexpression ausgeprägte Monozyteneigenschaften. Die 12-14 µm im Durchmesser großen

Zellen befinden sich in Suspensionskultur. Im Gegensatz zu vorher etablierten Zelllinien sind bei den THP-1 die monozytären Eigenschaften auch nach 14 Monaten in Kultur unverändert, dadurch hat sich die THP-1 Zelllinie in vielen in-vitro-Studien der letzten Jahre bewährt.<sup>50</sup>

### **3.5 Experimentell untersuchte Peptide und Stimulantien**

#### **3.5.1 Corticotropin-Releasing-Hormon**

Die in vivo gemessenen Serumwerte für CRH variieren sehr stark, da dieses Hormon einer zirkadianen Rhythmik unterworfen ist und somit in seiner Konzentration über den Tag hin stark variiert. In Vorversuchen und in Anlehnung an Wilbert-Lampen et al.<sup>33</sup> wurde als Testkonzentration  $10^{-6}$  M (entspricht 1  $\mu$ M) festgelegt. Das entspricht einer absoluten CRH-Masse von 4,757  $\mu$ g/ml Zellsuspension.

#### **3.5.2 Noradrenalin**

Für Noradrenalin wurde ebenfalls in Vorversuchen die verwendete Testkonzentration von  $10^{-5}$  M (entspricht 10  $\mu$ M) ermittelt. Das entspricht einer absoluten Noradrenalin-Masse von 3,2  $\mu$ g/ml Zellsuspension.

#### **3.5.3 Flavonoidkonzentrationen**

Die Konzentrationen der untersuchten Flavonoide wurden in Vorversuchen ermittelt. Hierzu wurde als Ausgangsdosis die MINaAC (minimale antiaggregatorische Konzentration) aus der von Bojić et al.<sup>40</sup> untersuchten Thrombozyten-Aggregationshemmung verwendet. Zur Dosisfindung erwies sich die im Weiteren beschriebene Adhäsionsmessung mittels Fluoreszenzmessung

als effektivste Methode. Zunächst wurden die Einfachdosen getestet und auf ihre Signifikanz hin überprüft. Die Flavonoide die dabei noch keinen adhäsionshemmenden Effekt zur Kontrolle aufzeigten wurden in weiteren Versuchen in 10, 25, 50 und 100-facher Konzentration getestet. Daraus ergaben sich die in allen weiteren Versuchsansätzen verwendeten minimalen noch signifikanten Konzentrationen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Methoden untereinander sicherzustellen.

<b><i>Flavonoid</i></b>	<b><i>mit CRH- in <math>\mu</math>M</i></b>	<b><i>mit NOR-5 in <math>\mu</math>M</i></b>
Isosakuranetin	4,75	47,50
Pinocembrin-7-Methylether	47,50	47,50
6-Hydroxyflavon	47,50	47,50
Tectochrysin	0,95	47,50
3,6-Dihydroxyflavone	0,12	12,00
Rhamnetin	23,75	47,50
Quercetin	15,00	15,00
(-)-Epicatechin	1,90	95,00
Syringetin	6,00	1,20

**Tabelle 1: Verwendete Flavonoid-Konzentrationen**

## **Methoden**

### **3.6 Zellkultur**

Die Kultivierung der Zellkulturen fand im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft und 90 % Luftfeuchtigkeit statt. Zur Überprüfung der Viabilität der Zellkulturen wurde die Trypanblaufärbung durchgeführt, gezählt wurde in einer Neubauer Zählkammer. Der Anteil der lebenden Zellen in Kultur wurde mittels Zelltrennung immer über 90 % gehalten. Wenn bei der Trypanblaufärbung zu viele tote Zellen auftraten, wurden diese mittels der Ficoll-Trennmethode abzentrifugiert. Dazu wurden 5 ml Ficoll in einen 14 ml Falcon vorgelegt mit 5 ml Zellsuspension überschichtet und 20 min bei 2250g ohne Bremse abzentrifugiert. Die lebenden Zellen bildeten die Interphase zwischen Medium und Ficoll. Diese wurde vorsichtig abgenommen, mit PBS gewaschen und wieder in Kulturmedium aufgenommen.

#### **3.6.1 Zellkultur HMEC-1**

Die Humane-Mikrovaskuläre-Endothelzelllinie-1 wurde in Anlehnung an Ades et al.<sup>48</sup> und Xu et al.<sup>49</sup> im Nährmedium MCDB 131, ergänzt durch 10% FCS, 5 µl humanes EGF, 2% Hydrocortison und 1% L-Glutamin kultiviert.

Je nach Flasche/Well wurden 0,03 bis 1,0 x10<sup>6</sup> Zellen ausgesäht. Für die Platten des Adhäsionsassays wurde die optimale Zelldichte in Vorversuchen bestimmt und anhand von klaren 96-Well-Platten kontrolliert.

Ein erster Wechsel des Zellkulturmediums wurde nach 48 Stunden durchgeführt. Am zweiten Tag zeigte sich ein konfluentes Monolayer. Zum Splitten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und mit PBS einmal kurz gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.



Durch mehrmaliges Beklopfen des Flaschenrandes ließen sich die Zellen vollständig ablösen. Nach Zugabe von Zellkulturmedium und Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Vollmedium resuspendiert.

Die Versuche wurden stets nur mit jungen Zellpassagen durchgeführt.

### **3.6.2 Zellkultur THP-1**

Die monozytäre Zelllinie THP-1 wurde in RPMI-1640 mit 10 % FCS und 1% L-Glutamin kultiviert. Zu jeder 500 ml Flasche RPMI-Medium wurden 5 mg Ciprofloxacin beigemischt, diese Menge entspricht einer 30 µM Endkonzentration des Gyrasehemmers.

Die Zelldichte bei Aussaat in der 75 ccm Zellkulturflasche betrug 500.000 Zellen pro Milliliter Suspension, pro Flasche maximal 20 ml Zellsuspension. Am zweiten Tag hatte sich die Zellzahl verdoppelt. Zweimal pro Woche wurde ein Splitting der Zellen vorgenommen und mit frischem Medium aufgefüllt. Einmal in der Woche erfolgte eine Zentrifugation (1500 rpm, 10 Minuten), der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert.

### **3.6.3 Durchflusszytometrische Analyse der Zellkultur (CD 4/CD 40)**

Zur Überprüfung des Anteils der Monozyten in der Zellkultur wurden jeweils  $10^6$  Zellen zum einen CD 4 (FITC)/Isotypkontrolle-PE, zum anderen CD 40 (PE)/Isotypkontrolle-FITC gefärbt und eine CD 4/CD 40 Doppelfärbung durchgeführt. Somit können die Monozyten als CD 4 positive Zellen von den differenzierten Makrophagen als CD 40 positive Zellen abgegrenzt werden.<sup>51</sup> Es wurde darauf geachtet, dass nicht weniger als 80% der Zellpopulation als

Monozyten vorlagen. Zur Viabilitätskontrolle nach Färbung wurde in Vorversuchen eine 7-AAD-Färbung mit und ohne Stimulationen durchgeführt. In jedem Fall waren über 99% der Zellpopulation 7-AAD negativ und somit viabel.

### **3.6.4 Überprüfung der Viabilität der Zellkultur**

Um die Viabilität der Zellen in Kultur zu überprüfen, wurden jeweils 10 µl der resuspendierten Zellen auf 10 µl Trypanblau pipettiert und in der Neubauer-Zählkammer mikroskopiert. Das Trypanblau besitzt die Eigenschaft nur die Zellen dunkelblau zu färben deren Membran instabil ist. Die prozentuale Anzahl der lebenden Zellen wurde aus 100 gezählten Zellen ermittelt. Die Zählung erfolgte innerhalb der ersten 5 Minuten, in denen die Zelllösung mit Trypanblau suspendiert wurde, da das Trypanblau zu späteren Zeitpunkten zytotoxisch wirken kann und zu einer falsch niedrigen Viabilität führen würde.

## **3.7 Fluoreszenzphotometrisches Adhäsionsassay**

### **3.7.1 Fluoreszenzfärbung der Monozyten**

Die Monozyten wurden am Vortag des Versuchs mittels intrazellulärer Fluoreszenzfärbung markiert. Der CMFDA-Farbstoff (Chloromethyl Derivat of Fluorescein diacetat) ist frei membranpermeabel. Er wird intrazellulär durch eine Reaktion mit der ubiquitär in allen Zellen vorhandenen Glutathion-S-Transferase durch Addition einer Thiolgruppe membranimpermeabel gemacht. Diese Zellfärbung schränkt die Zellpopulation in ihrer Viabilität nicht ein und hält bis zu vier Zellpassagen an. Zur Färbung wurden 50 µg des CMFDA-Farbstoffs mit DMSO auf eine Stocklösung von 10 mM verdünnt. Es wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Monozyten in 1 ml serumfreiem Medium mit 2 µl des CMFDA-Farbstoffs für 30

min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf dem Rotor inkubiert. Das entspricht einer Endkonzentration des Farbstoffs von 20 µM. Anschließend wurden die Zellen bei 2000 g für 5 Minuten abzentrifugiert, erneut mit 1 ml serumfreiem Medium versetzt und für weitere 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dieser Schritt soll eine Sicherstellung der Thioladdition an den CMFDA-Farbstoff in den Zellen ermöglichen. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Zellen in 2 ml serumhaltigem Medium im Brutschrank gelagert.

### **3.7.2 Beschreibung der Methode**

Mit leichten Modifikationen wurde die 2006 von Wilbert-Lampen et al.<sup>33</sup> entwickelte Methode zur fluoreszenzphotometrischen Bestimmung der Zunahme der Adhäsion von Monozyten am Endothel angewendet.

Neben der Monozytenfärbung wurden die HMEC-1-Zellen am Vortag des Versuchs auf weiße 96-Well-Platten mit 30.000 Zellen pro Well in Vollmedium ausgesäht. Um die Konfluenz des Monolayers am nächsten Tag am Mikroskop kontrollieren zu können wurde ebenfalls eine klare Platte mit derselben Zelldichte ausgesäht. Über Nacht adhärten die Zellen vollständig am Plattenboden und zeigten am nächsten Morgen vollständige Konfluenz.

Zu Beginn des Adhäsionsversuchs wurde eine Leerwertmessung der Platte mit Endothelzellen im Vollmedium bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission vorgenommen. Die Monozyten wurden bei 1500 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert in serumfreiem Medium resuspendiert und mit den Stimulantien versetzt. In Vorversuchen wurde als optimale Stimulationszeit 6 Stunden ermittelt.

Nach abgelaufener Zeit wurde das Vollmedium vorsichtig von den Endothelzellen abgenommen und die stimulierten Monozyten im Verhältnis 2:1 ( $6 \times 10^5$  THP-1 zu

3x10<sup>5</sup> HMEC-1 pro Well) in 100 µl serumfreiem Medium dazu pipettiert. Während der Adhäsionsdauer von einer Stunde wurden die Platten im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zur gleichmäßigen Verteilung auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach dieser Kontaktzeit wurde in einer zweiten Messung die totale Fluoreszenz aller Monozyten bestimmt. Direkt im Anschluss wurden die nicht adhärenen Monozyten vorsichtig abpipettiert, jedes Well mit 100 µl angewärmtem PBS gewaschen, erneut mit 100 µl serumfreiem Medium bedeckt und eine dritte Messung vorgenommen. Dieser Wert entsprach der RFU der adhärenen Monozyten am Endothel.

Der Fluoreszenzreader gab die Ergebnisse über das Programm XFluor4 in einer MicrosoftExcel-Datei aus.

### **3.7.3 Berechnung der adhärenen THP-1-Monozyten**

Zum Ausgleich der Fluoreszenzabnahme während der Versuchsdauer wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle des CMFDA-Farbstoffs in 20 µM Konzentration gelöst in serumfreiem Medium mitgeführt. Aus den drei Messwerten wird die prozentuale Relation der adhärenen Monozyten an den gesamten Monozyten ermittelt. Jeweils abzüglich der Leerwert-Fluoreszenz.

$$\frac{\frac{\text{RFU (X)}}{\text{RFU (F}_x\text{)}}}{\frac{\text{RFU (T)}}{\text{RFU (F}_T\text{)}}} \cdot \frac{\text{RFU (L)}}{\text{RFU (F}_L\text{)}} \cdot 100 \left[ \% \right]$$

- RFU: relative Fluoreszenzeinheit  
 L: Leerwertfluoreszenz  
 T: totale Fluoreszenz aller zugegebenen THP-1-Zellen  
 X: Fluoreszenz der adhärenen THP-1-Zellen  
 F: CMFDA-Farbstoff Kontrollmessung

**Abbildung 4: Berechnung der prozentualen monozytären Adhäsion an HMEC-1-Zellen<sup>33</sup>**

### 3.8 Endothelin-1 Messung

#### 3.8.1 Versuchsvorbereitung

Für die Messung der Endothelin Exozytose der beiden Zelllinien wurden analog zum Adhäsionsassay die THP-1 Zellen für 6 Stunden stimuliert. Nach abgelaufener Zeit wurde das Vollmedium vorsichtig von den Endothelzellen abgenommen und die stimulierten Monozyten wie beim Adhäsionsassay im Verhältnis 2:1 ( $6 \times 10^5$  THP-1 zu  $3 \times 10^5$  HMEC-1 pro Well) in 100 µl serumfreiem Medium dazu pipettiert. Die einstündige Inkubationszeit erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Verteilung wurden die Platten auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach der Adhäsionsphase wurden die Überstände abpipettiert, bei 2000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Die Zellen am Wellboden wurden mit 100 µl PBS gewaschen und jeweils mit 50 µl NaOH (2M-Lösung) versetzt. Ebenso wurden die Monozyten

im Überstandsgefäß jeweils mit 50 µl NaOH zur Proteolyse versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

### **3.8.2 Endothelin-1 Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Der durchgeführte ET1-Sandwich-ELISA stellt eine immunologische Messmethode dar. Diese macht den Analyten durch Chemilumineszenz im Multiplaterreader anhand der emittierten Lichtintensität messbar. Hierzu werden im ersten Schritt die Zellkulturüberstände in eine pre-coated (vorbeschichtete) 96-Well-Platte für 1,5 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Die vorbeschichteten Antikörper am Plattenboden binden die Endothelinproteine. Nach Abnahme des Überstandes wird die Platte viermal gewaschen, um alle Rückstände zu entfernen. Im zweiten Schritt wird ein mit dem Markerenzym HRP (Horseradishperoxidase) gelabelter Detektionsantikörper auf den Antikörper-Antigen-Komplex für 3 Stunden zugegeben. Dieser bindet ebenfalls an das Zielantigen Endothelin-1. Um dabei nicht mit dem ersten Antikörper in Konkurrenz zu stehen bindet der HRP-Detektionsantikörper an einem anderen Epitop des Antigens. So entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Vor dem dritten Schritt wird die Platte wieder viermal gewaschen, um ungebundene Antikörper restlos zu entfernen. Im letzten Schritt werden die Wells mit jeweils 100 µl einer Luminol-Substrat-Lösung bedeckt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wird am Multiplaterreader die RLU (relative Lumineszenzeinheit) jedes Wells mittels Luminometerfunktion bestimmt. Die HRP katalysiert die Chemolumineszenzreaktion des Luminols und steht so direkt proportional zu den gebundenen Endothelinproteinen. Um die RLU-Ergebnisse kalibrieren zu können

wurde bei jeder 96-Well-Platte eine Standardverdünnungsreihe mit sieben definierten Standardwerten und ein Leerwert jeweils in Doppelbestimmung mitgeführt. Anhand dieser Werte wird eine Standardkurve erstellt werden, anhand deren Interpolationspolynoms der ET-1 Wert für jedes Well errechnet werden kann.

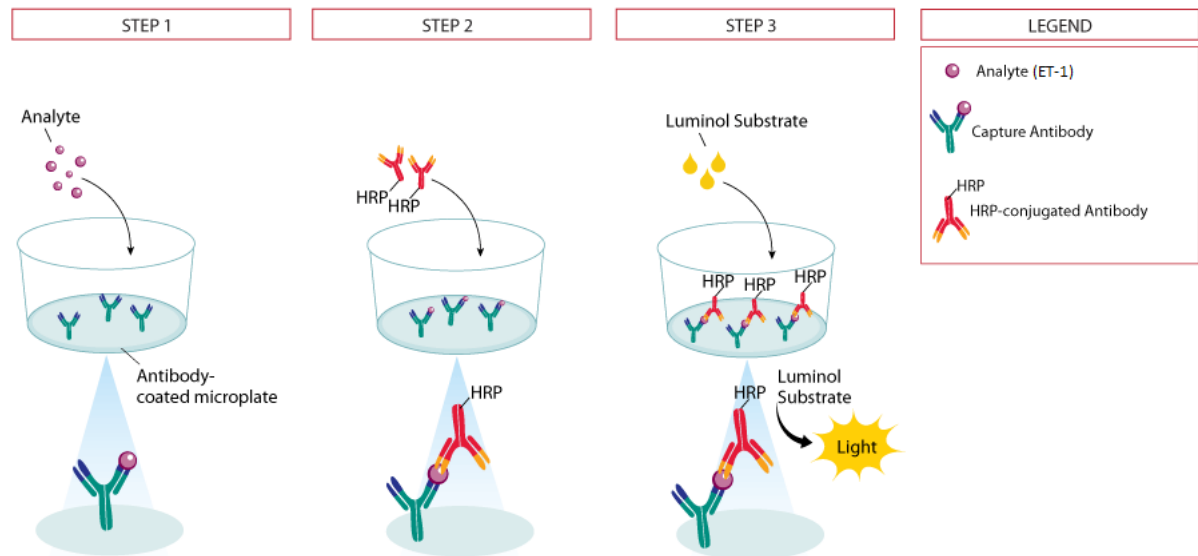


Abbildung 5 modifiziert nach R&D Systems: QuantiGlo® ELISA Prinzip<sup>52</sup>

### 3.8.3 Proteinmessung

Die Proteinmessung wurde nach der BCA (Bicinchoninsäure) Methode durchgeführt. Diese Methode kombiniert die Reduktion zweiwertiger Kupferionen in alkalinem Medium (Biuret Methode) mit der BCA die durch Reaktion mit den Kupferionen einen kolorimetrisch messbaren Farbumschlag erzeugt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 560 nm im Multiplaterader mittels der Spektrophotometerfunktion bestimmt. Zunächst wurde eine Albumin-Standardkurve erstellt, hierfür wurde die Absorption einer Verdünnungsreihe mit

Rinderserumalbumin-Konzentrationen von 25 bis 2000 µg/ml und eine Leerprobe bestimmt. Analog zur ET-1-ELISA-Methode wurde ein Interpolationspolynom erstellt dessen Steigungsgerade zur Probenberechnung herangezogen wurde. Zur Messung der Proben wurden 25 µl der über Nacht bei 4°C inkubierten NaOH-Protein-Lösung in eine klare 96-Well-Platte pipettiert. Pro Well wurden 200 µl eines nach Angaben des Herstellers berechnetes Arbeitsreagenz dazu pipettiert auf dem Rüttler durchmischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 560 nm Wellenlänge gemessen.

### **3.9 Reverse-Transkriptase-Polymerase-chain-reaktion (rtPCR)**

#### **3.9.1 Primer**

Das Primerpaar zur Detektion der CRH-R2-cDNA wurde analog vorangegangener Arbeiten von Wilbert-Lampen et al.<sup>33</sup> hergestellt. Die Primer für CRH-R2 sind sense 5' – GCT GCT CTT GGA CGG CTG GG – 3' und antisense 5' – CCA GGG CTG CCA CAG ATA CGC – 3'. Entworfen wurden diese Primer mit Hilfe der beim National Center for Biotechnology Information (NCBI) hinterlegten DNA-Sequenzen. Die zugehörige Genbank Accession Nummer für CRH-R2 ist die NM\_001883.2.

Der Primer zur Detektion der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen ist sense 5'- CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT – 3' und antisense 5'- AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC – 3' mit der Genbank Accession Nummer NC\_000012.12.



### **3.9.2 RNA-Isolation**

Zur RNA-Isolation wurde die Zelladhäsion in einem neuen Ansatz erneut im Zellverhältnis 2:1 durchgeführt. Nach sechsstündiger Stimulation wurden  $10^6$  THP-1-Zellen für eine Stunde zur Adhäsion auf  $5 \times 10^5$  HMEC-Zellen gegeben. Im Anschluss an die einstündige Adhäsionsphase wurden alle Zellen abtrypsinisiert, gewaschen und als Trockenpallett bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur RNA-Isolation gelagert.

Die RNA-Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels des RNeasy® Minikits der Fa. Qiagen. Der DNA-Verdau erfolgte dabei mit dem darin enthaltenen RNase-Free DNase Set.

Das resuspendierte Zelllysat wird durch eine für Nukleinsäuren undurchlässige Membran zentrifugiert. Die so isolierte RNA/DNA wird in mehreren Schritten gereinigt und in einem weiteren Schritt wird die DNA durch eine DNase verdaut. Im letzten Schritt wird die gesamte RNA in 30  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser aus der Membran ausgewaschen und sofort bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Bestimmung des RNA-Gehalts wurde 1  $\mu\text{l}$  der in Wasser gelösten RNA zur Extinktionsmessung entnommen und bei 260 nm im Spektrophotometer gemessen.

### **3.9.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription**

Zur Verwendung in der PCR wurde die isolierte RNA zunächst in komplementäre DNS (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde der RNA-Gehalt zur Berechnung von 1  $\mu\text{g}$  absoluter RNA-Masse verwendet, die in insgesamt 30  $\mu\text{l}$  RNA-freiem Wasser gelöst ist. Das probenindividuelle Flüssigkeitsvolumen wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12  $\mu\text{l}$  gebracht. Hierzu wurden 8  $\mu\text{l}$  des Mastermix dazupipettiert:

Mastermix:

10xBuffer RT	2 µl
dNTP Mix	2 µl
Oligo dT Primer	2 µl
RNAse H	1 µl
Omniscript	1 µl

Anschließend wurden die Proben bei 37°C für eine Stunde im Heizblock inkubiert und hinterher bei -20°C bis zur PCR gelagert.

#### **3.9.4 rtPCR**

Die PCR dient zur Amplifizierung genau definierter Abschnitte auf DNA- oder RNA-Strängen. Im Gegensatz zur DNA-PCR muss bei der Verwendung von RNA diese zunächst in cDNA umgewandelt werden, wie oben beschrieben. Nach diesem Schritt liegt die cDNA denaturiert, d. h. als Einzelstrang vor, so können die oben genannten Primer als Sense- und Antisense-Primer die Ziel-Region flankieren. Sie fungieren als Startermoleküle für die iTaq-DNA-Polymerase, die bei den Primern mit der Synthese des Gegenstrangs beginnt. Zu Beginn der rtPCR wird 1 µg der cDNA zu 19 µl Mastermix pipettiert.

Mastermix:

iQ™ Sybr®Green Supermix	10 µl
Primermix	2 µl
Aqua dest.	7 µl

Hierbei wurden die Primer nach Angaben des Herstellers mit der angegebenen Lösungsmenge Aqua dest. gelöst und schließlich jeweils 20 µl des Forward- und Reverse-Primers mit 60 µl H<sub>2</sub>O in die Endkonzentration gebracht. Bis zum Start

des rtPCR-Laufs wurde auf eine stete Kühlung der Proben und des Mastermix geachtet.

Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95°C für 3 Minuten. Es folgten 40 Reaktionszyklen unter folgenden Bedingungen:

<i>Vorgang</i>	<i>Zeit in Sek.</i>	<i>Temperatur in °C</i>
<i>Denaturierung</i>	30	95
<i>Annealing</i>	30	60
<i>Extension</i>	30	72

**Tabelle 2: rtPCR-Reaktionszyklus**

Die finale Extension erfolgte zunächst durch eine Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden und anschließendem Erwärmen von 55°C auf 95°C über eine Dauer von 30 Sekunden.

Das im Mastermix enthaltene SYBR®Green I Dye bindet ausschließlich an doppelsträngige DNA und entfaltet erst dort seine komplette Fluoreszenz. Nach jedem Annealing-Schritt misst der Cyclex bei 494 nm Exzitation und 521 nm Emission die Fluoreszenz der gebundenen SYBR®Green-Moleküle. Als „Cycle-Threshold“ (zu Deutsch: Zyklus-Schwelle) wird dabei die Anzahl der Amplifizierungsdurchgänge bestimmt, ab der ein exponentielles Wachstum der Fluoreszenzkurve beobachtet werden kann. Jede Probe wurde als Doppelwert bestimmt und für jedes Primerpaar wurden zur Kontrolle zwei Wells ohne Probe auf jeder 96-Well-Platte mitgeführt.

### **3.9.5 Auswertung**

Die Datenanalyse erfolgte nach der Livak-Methode, auch als  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  – Methode bezeichnet. Hierbei wird zunächst vom  $C_T$ -Wert jeder Probe des Zielgens der  $C_T$ -Wert ihrer jeweiligen Probe des Referenzgens subtrahiert, daraus resultiert das  $\Delta C_T$ . Diese Werte werden nun verglichen indem die  $\Delta C_T$  Werte der stimulierten Proben von denen der unstimulierten Kontrolle subtrahiert werden. Um die Ergebnisse der Kostimulation mit Stressor und Flavonoid auszuwerten wurden die  $\Delta C_T$  Werte der mit beiden Stimulantien inkubierten Proben von denen der nur mit dem Stressor inkubierten Probe subtrahiert. Das so errechnete  $\Delta\Delta C_T$  wird zur normalisierten Expressionsrate umgerechnet:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Der hieraus resultierende Wert stellt von 0 – 1 eine verhältnismäßige Abnahme der Expression dar und  $>1$  eine vermehrte Expression des Zielgens.

### **3.10 Western-Blot**

#### **3.10.1 Durchführung der Methode**

Zur Analyse mittels Western-Blot wurden  $5 \times 10^5$  HMEC-Zellen und  $10^6$  THP-1 Zellen pro Probe eingesetzt. Wie in den vorangegangenen Methoden wurden in den Versuchsansätzen ausschließlich die THP-1-Zellen mit den Stressoren und Flavonoiden für 6 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die THP-Zellen auf die gewaschenen HMEC-Zellen pipettiert und für eine Stunde im Inkubator auf dem Horizontalrüttler zur Adhäsion belassen. Hiernach wurden alle Zellen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und mit RIPA-Puffer lysiert. In die Lamellen der vorgefertigten Polyacrylamid-Gele wurden  $50 \mu\text{g}$  der in RIPA-Puffer gelösten Proteine gefüllt und bei 200V für eine Stunde angeschlossen, jedem Gel wurde ein Standard zur Größenbestimmung

beigefügt. Der Blotting-Schritt wurde auf eine Nitrozellulose-Membran bei 30V über 90 Minuten durchgeführt. Die Membranen wurden mit einer Ponceau-S-Lösung angefärbt, um die Qualität des Übertrags anhand der sichtbaren Proteinbanden zu kontrollieren. Anschließend wurde die Membran mit einer Lösung aus Wasser und 5% Milchpulver für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt.

Der polyklonale CRH-R2-Antikörper detektiert ein spezifisches Epitop des humanen CRH-Rezeptors (Subtyp 2). Hierfür liegt der Primärantikörper in einer Verdünnung 1:1000 vor. Die Membran wurde darin bei 4°C über Nacht inkubiert. Vor der Antikörperadhäsion wurde das Gel dreimal mit einer Lösung aus PBS und 0,05% Tween-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran im HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Antigen-Ak-Ak Komplexe sichtbar zu machen wurde die Membran mit einem Luminol-Substrat bedeckt. Die HRP setzt nun das Luminol um, bei diesem Vorgang entsteht die Chemolumineszenz. Sie wird durch direktes Auflegen auf einen Röntgenfilm übertragen und im X-Omat entwickelt.

### **3.10.2 Auswertung der Methode**

Zum Vergleich der Proteinmenge der CRH-R2-Rezeptoren wurde als ubiquitäres Vergleichsprotein das „Haushaltsprotein“  $\beta$ -Actin herangezogen.<sup>53</sup> Um dieselbe Nitrozellulosemembran erneut anfärben zu können wurde die lösliche Ponceau-S-Färbung mit Wasser vorsichtig abgelöst. Anschließend wurde erneut ein Western-Blot mit einem  $\beta$ -Actin-Antikörper gemäß der oben beschriebenen

Methode durchgeführt. Hierdurch lässt sich die detektierte CRHR2-Proteinmenge in Relation zur ubiquitär gleich verteilten  $\beta$ -Actin-Menge setzen.

Um die Western-Blot Banden zu quantifizieren wurde mit der Histogramm-Funktion des Programms ImageJ eine densitometrische Messung durchgeführt und die AUC jeder Probe berechnet.

### **3.11 Statistik**

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel und IBM SPSS Statistics 20. Die durchgehend nicht normalverteilten Daten wurden nichtparametrisch getestet. Die Testung erfolgte aufgrund der unverbundenen Situation mittels Mann-Whitney-U Test. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert kleiner 0,05 angenommen. Ein hochsignifikantes Ergebnis mit einem P-Wert kleiner 0,01 wird ebenfalls als signifikant bezeichnet. In den nachfolgenden Grafiken werden signifikante Ergebnisse mit einem Stern über dem Boxplot dargestellt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Zellviabilität**

Zum Nachweis der Viabilität der Zellen nach der 6-stündigen Inkubationszeit wurden Trypanblaufärbungen jeweils vor und nach der Stimulation der Zellkulturen vorgenommen. Bei einer Probe jeder Stimulationsart wurden die viablen und die toten Zellen von fünf Gesichtsfeldern gezählt und mit der Zählung nach der Inkubation verglichen. Somit wurde eine zytotoxische Wirkung der verwendeten Flavonoidkonzentrationen und Stresshormone für diesen Zeitraum ausgeschlossen. Der prozentuale Anteil der viablen Zellen hat sich durch die Inkubation mit Stresshormonen und Flavonoiden nicht signifikant verändert. Der Anteil der lebenden Zellen veränderte sich auch nicht zu dem der in Kultur befindlichen Zellen. Somit ist eine zytotoxische Dosis der Flavonoide und Stressoren ausgeschlossen.

### **4.2 Adhäsionsassay**

Im Adhäsionsassay wurde bei jedem Versuchsansatz eine unstimulierte Kontrolle und eine CRH bzw. Noradrenalin Kontrolle zu den Proben mit Stressor und Flavonoid mitgeführt. Jeder Versuchsansatz wurde mit n=8 Ansätzen durchgeführt. Die CRH und Noradrenalin-Stimulation wurde in Relation zur unstimulierten Kontrolle gesetzt. Alle Ko-Stimulationen mit Flavonoid und Stressor wurden in Relation zur jeweiligen Adhäsion der CRH- bzw. Noradrenalin-Kontrolle gesetzt. So wurde die Signifikanz des Unterschieds zwischen Ko-Stimulation und der CRH- bzw. der Noradrenalin-Kontrolle geprüft.

Zunächst wurde eine Adhäsionszunahme der THP-Zellen durch CRH-Stimulation gemessen. Im Median stieg die Adhäsion signifikant im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle auf 246,5% an.

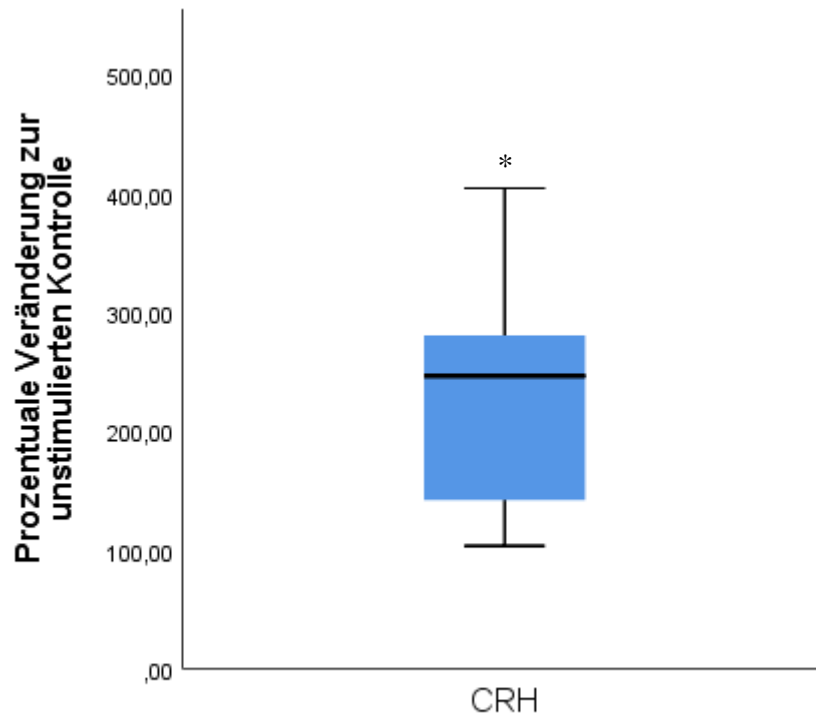


Abbildung 6: Adhäsionsassay CRH



Bei der Stimulation mit Noradrenalin stieg die Adhäsion signifikant im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle im Median auf 167,1% an.

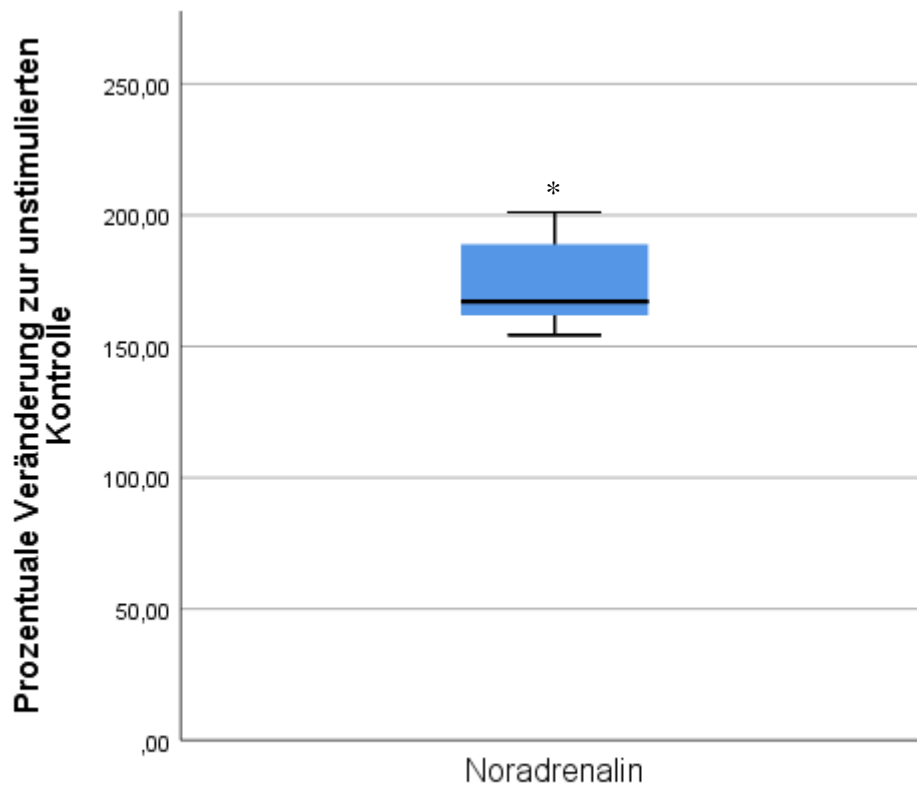


Abbildung 7: Adhäsionsassay Noradrenalin

Die nachfolgende Grafik zeigt die Kostimulationen der Zellen mit dem Stressor CRH und einem Flavonoid. Bei allen Flavonoiden konnte eine statistisch signifikante Inhibition der Adhäsion im Mittelwert unter das Adhäsionsniveau der alleinigen CRH-Stimulation nachgewiesen werden. Prozentual lag der Median der Adhäsion im Gegensatz zur CRH-Kontrolle für Isosakuranetin bei 52,43%, für Pinocembrin bei 40,14%, für 6-Hydroxyflavon bei 48,76%, für Tectochrysin

bei 55,41%, für 3,6-Dihydroxyflavone bei 56,10%, für Rhamnetin bei 50,43%, für Quercetin 58,25% für Epicatechin bei 50,35% und für Syringetin bei 47,50%.

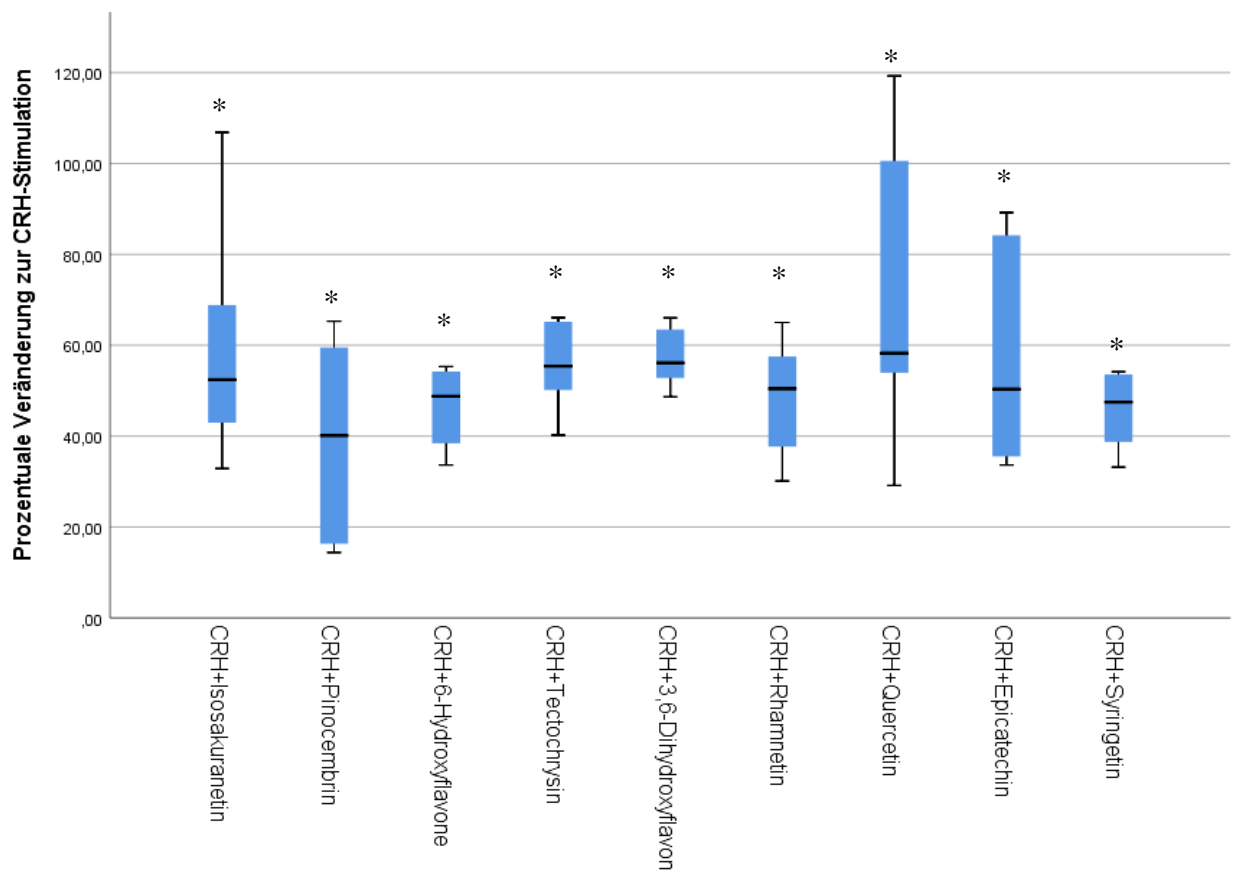


Abbildung 8: Adhäsionsassay CRH/CRH+Flavonoid

Die Kostimulation von Noradrenalin mit Flavonoiden erbrachte die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse. Alle neun Flavonoide inhibierten die Noradrenalin getriggerte Adhäsion signifikant unter die der alleinigen Noradrenalin-Stimulation. Die Kostimulation mit Isosakuranetin zeigte im Median eine Adhäsion von 71,37% im Gegensatz zur Noradrenalin-Kontrolle, Pinocembrin 58,50%, 6-Hydroxyflavon 45,27%, Tectochrysin 48,61%, 3,6-Dihydroxyflavone 72,81%, Rhamnetin 50,99%. Quercetin inhibierte die Adhäsion auf 78,25% und Epicatechin auf 71,40% und Syringetin mit 64,91% ebenfalls signifikant.

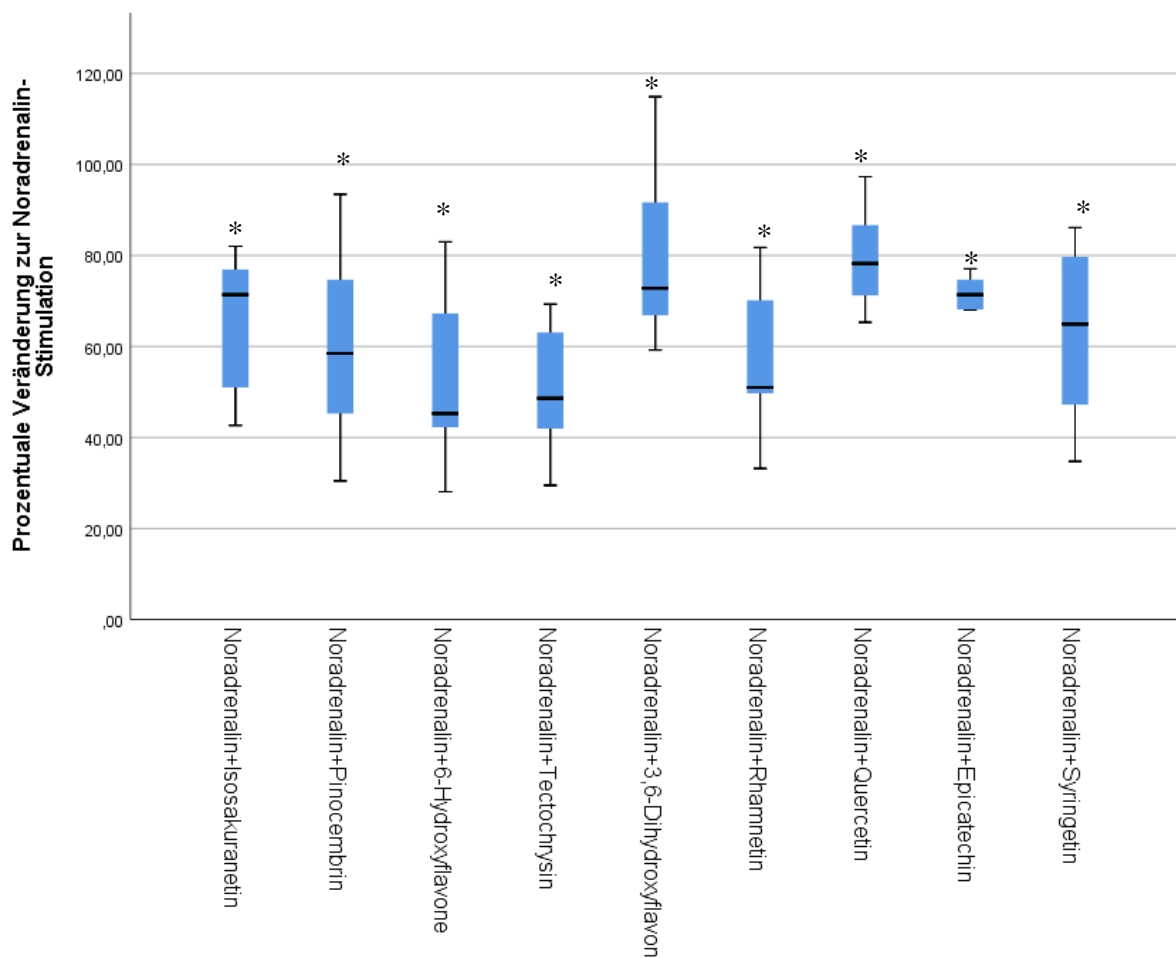


Abbildung 9: Adhäsionsassay NOR/NOR+Flavonoid

### 4.3 Endothelin-1-ELISA

Jeder Versuchsansatz wurde mit n=8 Ansätzen, durchgeführt. Die Endothelin Produktion der Zellen bezieht sich prozentual im Ergebnis auf die jeweils in jeder Probe gemessene Proteinmenge in ng/μg. Sie erhöhte sich bei der alleinigen Stimulation mit CRH<sup>6</sup> im Median auf 110,50%, jedoch nicht signifikant zur unstimulierten Kontrolle. Bei der Stimulation mit Noradrenalin erhöhte sich die Endothelin-1-Proteinmenge im Median signifikant um etwa das Vierfache auf 0,222 ng/μg, dies entspricht im Median 383,75% der unstimulierten Kontrolle.

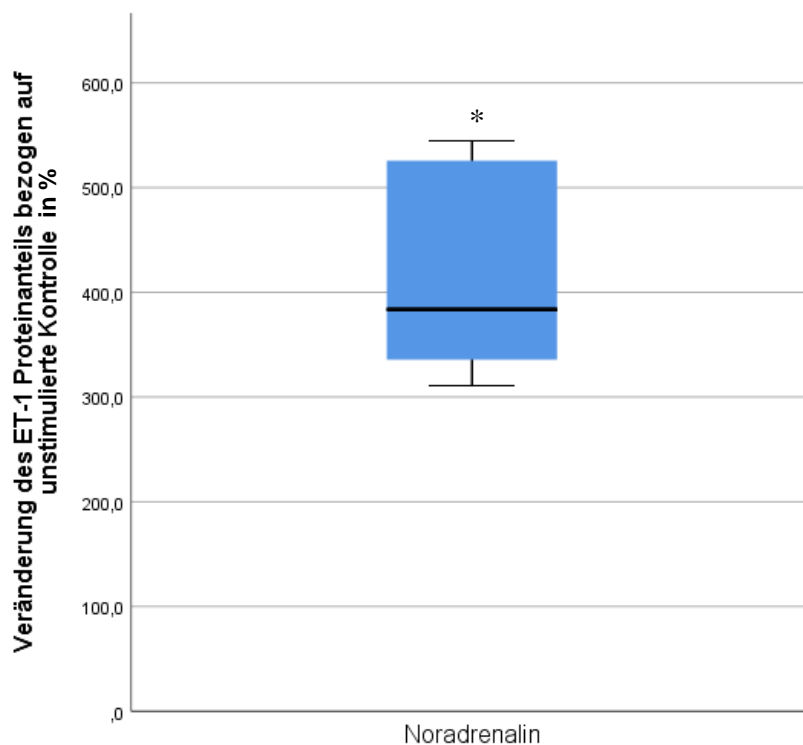


Abbildung 10: ET-1 ELISA NOR-Stimulation

Die Kostimulation von Flavonoiden und Noradrenalin erbrachte bei allen Flavonoiden eine statistisch signifikante Abnahme der Endothelin-1-Menge unter die der alleinigen Noradrenalin-Stimulation. Die Messungen der Kostimulation mit Isosakuranetin ergaben im Median eine Endothelin-1-Menge von 0,011 ng/μg, die entspricht im Median 5,00% der Menge an ET-1 bei alleiniger Noradrenalin-Stimulation, für Pinocembrin ebenfalls 0,011 ng/μg (5,00%), für 6-Hydroxyflavon 0,013 ng/μg (5,65%), Techtochrysin ergab 0,020 ng/μg (9,00%), 3,6-Dihydroxyflavone 0,018 ng/μg (7,90%), Rhamnetin 0,042 ng/μg (18,90%), Quercetin 0,025 ng/μg (11,30%), Epicatechin 0,032 ng/μg (14,40%) und Syringetin 0,026 ng/μg (11,50%).

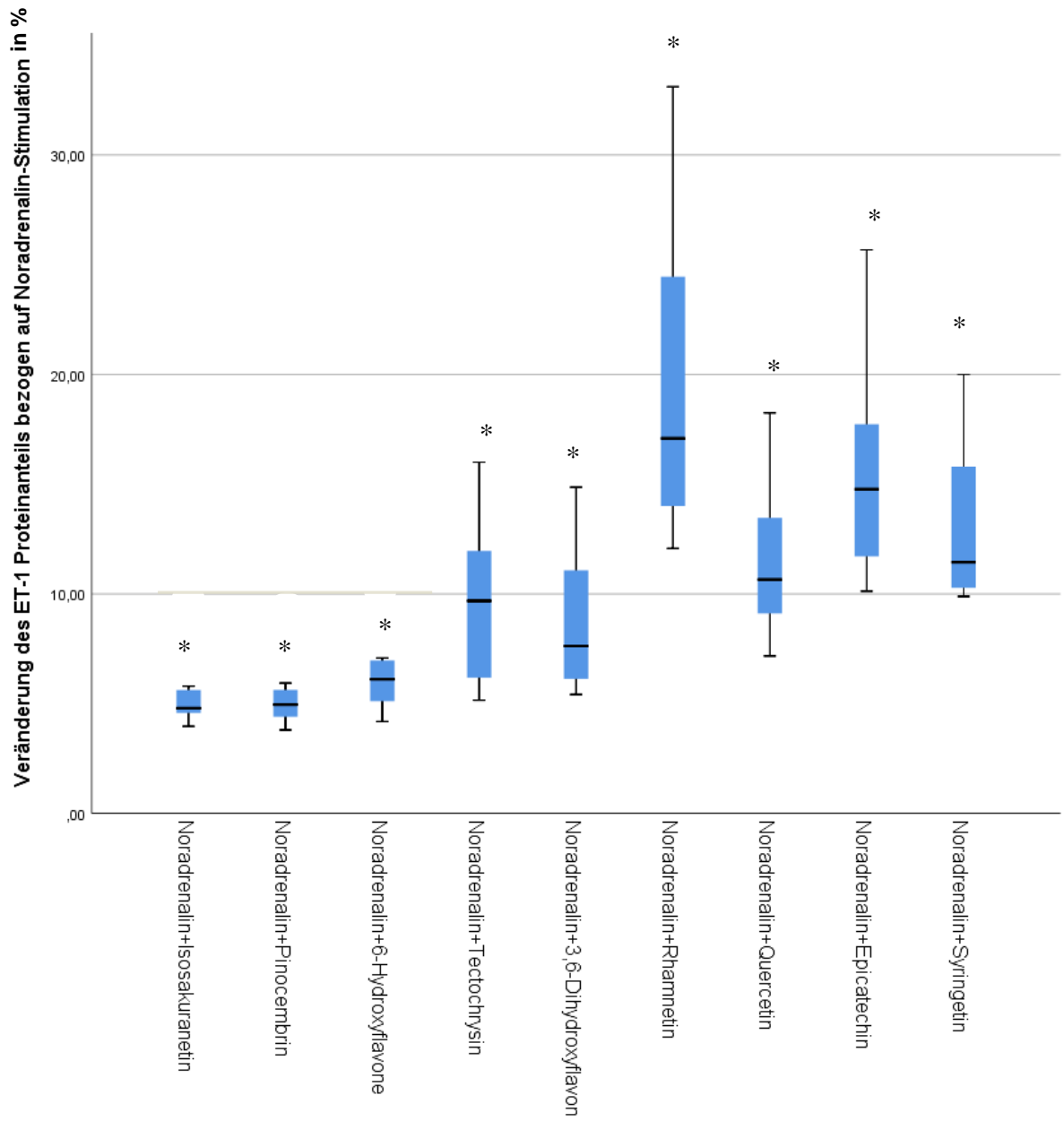


Abbildung 11: ET-1 ELISA Kostimulation NOR+Flavonoid

#### 4.4 rt-PCR

Die Ergebnisse der rt-PCR sind auf das Verhältnis zur unstimulierten oder Stressor stimulierten Kontrolle als 1,0-faches des Verhältnisses der gemessenen CRHR2-mRNA zur mRNA des „Haushaltsgens“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bezogen. Die Versuche sind mit n=8 durchgeführt worden. Die angegebenen Werte stellen die Mediane der Ergebnisse dar.

Für die Stimulation mit dem Stressor CRH konnte in der rt-PCR keine signifikante Zunahme der CRHR2-mRNA gemessen werden. Somit kann für die Ergebnisse der Kostimulationen mit CRH und Flavonoid keine Aussage getroffen werden.

Die Stimulation der Zellen mit Noradrenalin ergab im Median eine signifikante 7,9-fache Erhöhung im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle.

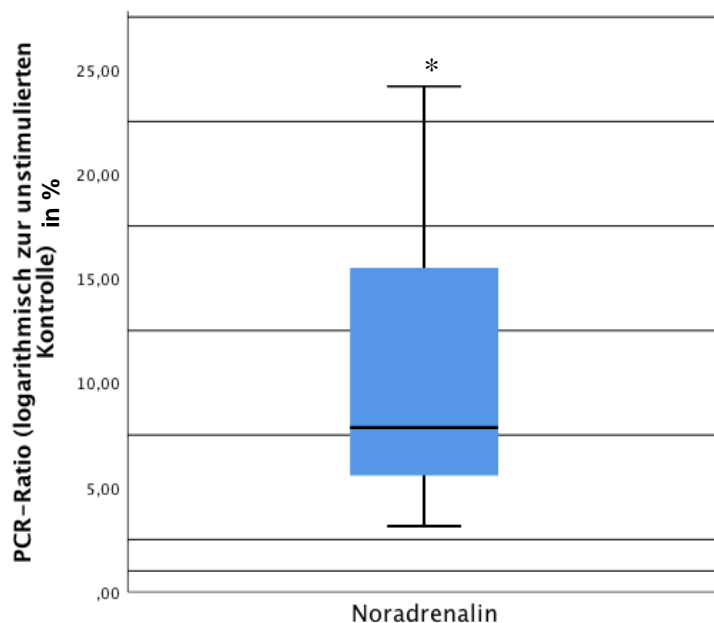


Abbildung 12: rt-PCR Darstellung der Noradrenalin-Stimulation

Die Ergebnisse der Kostimulationen sind im Verhältnis zur mRNA-Expression der Noradrenalin-Kontrolle. Für sechs der neun Flavonoide wurde eine signifikante Reduktion der CRHR2-mRNA ermittelt. Die PCR-Ratio lag bei Tectochrysin im Median bei 0,62, dies entspricht 7,44% der Noradrenalin-Stimulation, für 3,6-Dihydroxyflavone bei 0,41 (4,95%), für Rhamnetin bei 0,74 (11,90%), für Quercetin bei 0,71 (8,35%), für Epicatechin bei 0,67 (11,96%) und für Syringetin bei 0,72 (9,02%). Signifikante Erhöhungen der CRHR2-mRNA-Expression wurden für Isosakuranetin im Median ein Anstieg der Ratio auf 9,42 (130,18%), für Pinozembrin auf 6,23 (81,18%) und für 6-Hydroxyflavon auf 9,78 (91,42%) gemessen.



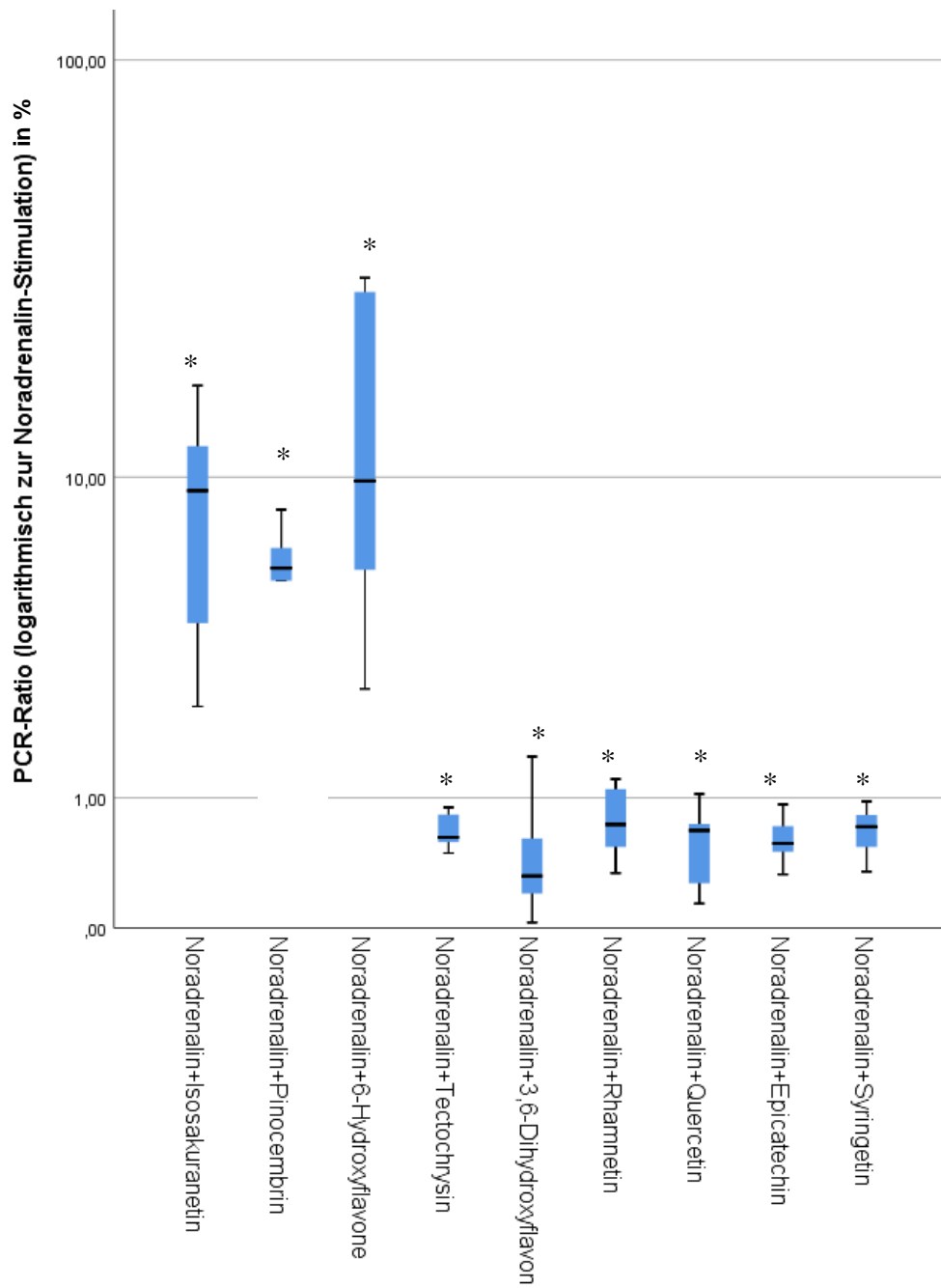


Abbildung 13: rt-PCR Darstellung der Noradrenalin/Flavonoid-Kostimulationen

#### **4.5 Western-Blot**

Die Ansätze für den Western Blot wurden genau wie in den zuvor beschriebenen Methoden in zwei Ansätzen mit jeweiliger Kontrolle angesetzt. Die beschriebenen Medianwerte stellen das Verhältnis der gemessenen AUC der densitometrisch vermessenen Blotbanden der CRHR2-Rezeptoren zu denen der  $\beta$ -Actin-Banden dar. Alle Versuche wurden n=4 durchgeführt. Leider wurden keine signifikanten Ergebnisse in den Versuchsansätzen erzielt.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Stress als atherogener Faktor**

Die durchgeführten Versuche zeigen sowohl auf Adhäsionsebene als auch auf Peptidhormonebene mittels Endothelin-1 zunehmende Stressaktivität bei alleiniger Stressorstimulation beider Zelllinien. Durch die jeweilige Stimulation mit CRH bzw. Noradrenalin wurde jeweils ein Hauptweg der chronischen und der akuten Stressreaktion getestet.

Die jeweiligen Stressachsen wurden in der Vergangenheit intensiv untersucht. Eine chronische Überbelastung psychischer oder physischer Art kann die Rückkopplungsmechanismen und somit die Regulation der entsprechenden Hormone beider Achsen dauerhaft verändern.<sup>54</sup> Hierbei reagiert das zentrale Nervensystem mit einer verstärkten Aktivierung der HPA-Achse über zentrale und periphere Anteile, dies wird als ungünstiger Prognosefaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen.<sup>55,56,57</sup> Ein großer Teil der Grundlagenforschung des chronischen Stresses stellen Tierversuchsexperimente dar. Da aus ethischen und zeitlichen Gründen Interventionsstudien am Menschen kaum durchgeführt werden können.

### **5.2 Flavonoide als Stressinhibitoren**

Eine übergreifende Studie von Arts et al.<sup>58</sup> zeigt, dass in 7 von 12 Kohortenstudien eine signifikante Reduktion von kardialen Ereignissen durch Flavonoidsubstitution nachgewiesen werden konnte. Ebenso zeigten Fernandes et al.<sup>59</sup> in einer zusammenfassenden Arbeit, dass sich speziell in Untersuchungen mit Rotweinkonsum diverse positive Effekte auf die Gesundheit der Probanden ergaben, im Rotwein stehen speziell die Gruppe der Flavanole, mit dem

bekanntesten Vertreter Epicatechin und die Gruppe der Flavonole mit Quercetin im Vordergrund.

Zur Senkung des kardiovaskulären Erkrankungsrisikos wird vor allem die Reduktion des oxidativen Stresses auf die Endothelzellen unter Flavonoideinfluss in Betracht gezogen.<sup>60,61</sup> Speziell in Endothelzellen konnte eine Anreicherung von Flavonoid-Metaboliten beobachtet werden.

Die gezielte Wirkung auf Monozyten wurde durch Kawai et al. mittels einer neu entwickelten Detektionsmethode untersucht.<sup>62</sup> Über Anti-Polyphenol-Antikörper wurde immunhistochemisch die Verteilung von Flavonoiden *in vivo* gemessen. Es resultierte ein gehäuftes Auftreten von Epicatechin- und Quercetin-Antikörpern in atherosklerotischen Läsionen, dort speziell in aus Makrophagen entstandenen Schaumzellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine gesteigerte inflammatorische Reaktion eine Akkumulation von Flavonoiden begünstigt.

Ebenfalls von Kawai et al.<sup>63</sup> wurde an einer monozytären Zelllinie die antiatherosklerotische Wirkung von Quercetin nachgewiesen. Hierbei exprimierten die Zellen signifikant weniger SR-A-mRNA (Scavenger-Rezeptor A). Eine verringerte SR-A-Expression verminderte die oxLDL-Aufnahme der Makrophagen und so den initialen Schritt der Atherogenese. Außerdem konnte eine Dekonjugation und Methylierung der Flavonoide durch die aktivierten Monozyten nach deren Aufnahme nachgewiesen werden. Diese Schritte sind vor allem deshalb von Bedeutung, da bei der Aufnahme im Darm die Flavonoide durch Konjugation in eine inaktivere Form überführt werden.<sup>63</sup>

### 5.3 Adhäsionsversuche

Zunächst wurden die Inkubationszeiten der Adhäsionsversuche ermittelt, gemäß Vorarbeiten von Wilbert-Lampen et al. und Chrisholm<sup>33,64</sup>. Hierbei fand sich der Zeitpunkt der maximalen Adhäsion nach 6 Stunden Stimulationszeit der Monozyten und anschließender einstündiger Ko-Inkubation beider Zelllinien mit den Stressoren und Flavonoiden.

Die Zunahme der Adhäsion bei Stimulation mit CRH fiel mit 246,5 % im Median höher aus als in der Literatur vorbeschrieben. Bei Wilbert-Lampen et al.<sup>33</sup> zeigten sich signifikante Zunahmen von etwa 19,87% bei Kostimulation beider Zelllinien mit CRH<sup>6</sup> über denselben Zeitraum von 6 Stunden gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

Für die Stimulation der Adhäsion von monozytären Zellen mit Noradrenalin konnte in der Literatur kein direkt vergleichbares Äquivalent ermittelt werden. Jedoch konnten Dhabhar et al.<sup>65</sup> eine Zunahme von Adhäsionsmarkern (CD62L) an Monozyten beobachten, bei der Stimulation mit Noradrenalin. Außerdem eine Zunahme peripherer Monozyten bei in vivo Tierversuchen, was auf eine Mobilisierung hindeuten könnte.

Die antiinflammatorischen und antiadhesiven Effekte diverser Flavonoide sowohl auf Monozyten als auch auf endotheliale Zellen sind in der Literatur weitreichend belegt.<sup>66-68</sup> Hu et al. zeigte die antiadhäsive Wirkung von Icarin anhand der ICAM-1/VCAM-1 Abnahme und Huang et al zeigten dies für Phloretin. Eine mit Statinen vergleichbare Wirkung der flavonoidhaltigen Maobeere auf die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und MCP-1 zeigten Udomkasemsab et. al.<sup>69</sup>

Speziell Quercetin steht besonders im Fokus aktueller Forschungen, aufgrund seines hohen Anteils am Gesamtflavonoidgehalt vieler Pflanzen. Für Quercetin wurde ein antiadhäsiver Effekt belegt.<sup>70,71</sup>

Alle ausgewählten Flavonoide zeigten sowohl in der Stimulation mit CRH als auch mit Noradrenalin signifikant weniger Adhäsion als in der alleinigen Stimulation mit dem jeweiligen Stressor. Die Mittelwerte der Adhäsionen bewegten sich hierbei grob zwischen 40-80% der Ausgangswerte, also der alleinigen Stressorstimulation. Hierbei hebt sich keine Flavonoidgruppe besonders stark oder schwach hervor.

#### **5.4 ET-1-ELISA-Versuche**

Die Endothelin-1-Konzentration beider Zelllinien konnte durch Flavonoidgabe in allen Fällen signifikant zur alleinigen Noradrenalinstimulation supprimiert werden.

Die Mediane rangierten von etwa 5 bis 11% des Ausgangswerts.

Der Einfluss des von den Endothelzellen produzierten Endothelin-1 auf periphere Monozyten in Bezug auf deren Adhäsionsverhalten ist bereits weitreichend belegt. McGregor et al.<sup>72</sup> stellten neben ET-1 auch für Neurokinin-A und Substanz P ein erhöhtes Adhäsionsverhalten bei Monozyten fest. Ebenso wiesen Chisholm et al.<sup>64</sup> den proadhäsiven Effekt von ET-1 auf Monozyten nach.

Eine mögliche Erklärung ist der Eingriff in die Tyrosinkinase-Kaskade. Chisholm et. al haben diesen Signalweg erfolgreich mit dem Isoflavon Genistein, das in der Sojabohne vorkommt, signifikant unterdrückt<sup>64,73</sup> und somit einen antiadhäsiven Effekt des Flavonoids auf Monozyten unter Stimulation mit ET-1 nachgewiesen.

## 5.5 rt-PCR-Versuche

Bei der Quantifizierung der CRH-R2-Rezeptor mRNA konnte für Noradrenalin ein signifikanter Anstieg der Transkription verzeichnet werden, nicht jedoch für CRH. Die Noradrenalin-Stimulation hat einen signifikanten Anstieg der CRHR2-mRNA im Median um das 7,9-fache zur Folge gehabt. Die Auswirkungen von Noradrenalin auf CRHR2-Rezeptoren sind in der Literatur bisher noch nicht hinreichend belegt. Bekannt ist bisher die stimulierende Wirkung von Noradrenalin auf die CRH-Ausschüttung von Neuronen.<sup>74</sup> Außerdem ist bekannt, dass die Stimulation im umgekehrten Fall, durch in vivo Gabe von CRH an Ratten deren Plasma-Noradrenalin bzw. Adrenalin signifikant erhöht wurden.<sup>75</sup> So könnte man sich einen positiven Feedbackmechanismus erklären bei der über die CRHR2-Rezeptoren eine verstärkte Expression der CRHR2-Rezeptoren erfolgt.

Die Ergebnisse der Kostimulation mit Noradrenalin und Flavonoid führten allesamt zu signifikanten Veränderungen der CRHR2-mRNA. Drei Flavonoide führten zu signifikant erhöhten Werten (Isosakuranetin, Pinocembrin, 6-Hydroxyflavon). Die anderen sechs Flavonoide führten wie erwartet zu einer signifikanten Reduktion der CRHR2-mRNA zwischen 50-80% des Werts der alleinigen Stimulation mit Noradrenalin.

Hier könnte ein gruppenspezifischer Effekt vorliegen. Isosakuranetin und Pinocembrin sind die einzigen Vertreter der Flavanone.

## **5.6 Western-Blot-Versuche**

Die Kontrolle der rt-PCR-Ergebnisse erfolgte auf Proteinebene mittels Durchführung eines Western-Blots. Hierfür wurden eigene Zellansätze verwendet und isoliert.

Es zeigten sich keine signifikanten Bestätigungen der vorangegangenen rt-PCR-Ergebnisse. Für die Kostimulationen mit Noradrenalin und Flavonoid zeigte sich bei allen Kostimulationen ein Rückgang der CRH-R2-Proteinmenge, jedoch sind diese Ergebnisse nicht signifikant.

## **5.7 Limitationen**

Die durchgeführten Versuche basieren allesamt auf Flavonoidkonzentrationen vorangegangener in-vitro-Versuche. Die orale aufgenommene Menge und Metabolisierung der Flavonoide ist oft maßgebend für deren Wirksamkeit im menschlichen Körper. Dies stellt in in-vivo-Untersuchungen oftmals vorher potentiell wirksame Flavonoide als unwirksam heraus, oder sie benötigen vor Aufnahme eine zusätzliche Stoffwechselreaktion, um wirksam zu sein.

Atherosklerose durch Stress stellt einen komplexen, langwierigen Prozess dar, in dieser Arbeit wird jedoch nur ein Teilaspekt zu einem Zeitpunkt der Atherogenese untersucht, so können Rückschlüsse auch nur hierfür gezogen werden. Die Stresshormone CRH und Noradrenalin lösen im Körper unterschiedlichste Reaktionen aus, die hier nicht alle miteinfließen können, die hier erzielten Ergebnisse jedoch theoretisch beeinflussen können. Die in dieser Arbeit verwendeten CRH und Noradrenalin Konzentrationen wurden nach Vorversuchen festgelegt und entsprechen nicht physiologischen Plasmakonzentrationen.



Die geringe Fallzahl (n=4) im Western-Blot lässt, trotz Hinweis auf eine Bestätigung der rt-PCR-Ergebnisse, keine signifikante Aussage über die Umsetzung der CRHR2-mRNA in Rezeptoren zu.

## **5.8 Ausblick**

Aktuelle Studien befassen sich mit Flavonoiden in Nanopartikelstruktur um eine Anreicherung konkret in Endothelzellen zu erreichen, erste Erfolge mit Zitrusflavonoiden wurden von Fuior et al.<sup>76</sup> publiziert.

Ebenso werden auch verstärkt die zugrundeliegenden Signalwege ermittelt, auf die die Flavonoide Einfluss nehmen. Die Arbeit von Deng et al.<sup>77</sup> zeigte auf, dass Puerarin, ein in mehreren Pflanzen und Kräutern vorkommendes Isoflavon, einen direkten Einfluss auf den ERK5/KLF2-Pfad nimmt, der die Protein-aktivierte-Kinase-1 reguliert und somit einen maßgeblichen Einfluss auf die Monozytenmigration nimmt. Hierbei wurde ein antiadhäsiver Effekt auf THP-1-Zellen an Endothelzellen in vitro nachgewiesen. Puerarin ist ein Glykosid des Daidzein, einem relevanten Isoflavon der Sojabohne. Für einen Metaboliten des Daidzein, das 7,8,4'-Trihydroxyisoflavone, wurde ebenso ein antiadhäsiver Effekt zwischen THP-1 und Endothelzellen nachgewiesen.<sup>78</sup>

## 6 Zusammenfassung

Die Atherosklerose stellt uns in einer alternden Gesellschaft vor zunehmende Herausforderungen. Diese wird zum einen durch den Faktor Zeit begünstigt, jedoch wurde in den letzten Jahrzehnten der Forschung auch immer mehr der psychosoziale und physische Stress als Risikofaktor beforscht und bestätigt. In diversen Studien wurden die verschiedenen Aspekte des initialen Schritts der Atherogenese in verschiedenen Stressmodellen untersucht. Gerade die Faktoren der Monozytenadhäsion an das Gefäßendothel wurden hierbei besonders in den Fokus gestellt. Um diese zur dauerhaften Prophylaxe der Atherogenese zu reduzieren, wurden in der Vergangenheit zunehmend langzeitgeeignete, nebenwirkungsarme Therapieformen erforscht. Hierbei stellt die große Gruppe der Flavonoide eine große Quelle neuer Wirkstoffe dar.

Ziel dieser Arbeit war es den initialen Schritt der Atherogenese unter Flavonoideinfluss zu untersuchen.

In den Adhäsionsversuchen konnte der hemmende Effekt aller getesteten Flavonoide auf die beiden Zellreihen in signifikantem Ausmaß beobachtet werden. Diese Beobachtung legt einen gezielten Eingriff der Flavonoide in grundlegende Stresssignalwege nahe.

Als ein weiterer proadhäsiver Faktor wurde in der Vergangenheit Endothelin-1 nachgewiesen. In dieser Arbeit konnten für die Kostimulation der Zellen mit Noradrenalin und Flavonoid ein hemmender Effekt aller Flavonoide auf die Produktion von Endothelin-1 signifikant aufgezeigt werden.

Auf Genexpressionsebene wurden weniger konsistente Ergebnisse beobachtet. Die CRH-Stimulation erbrachte keinen signifikanten Anstieg der CRHR2-Rezeptor-mRNA.

Die alleinige Stimulation mit Noradrenalin führte zu einer signifikanten Steigerung der CRHR2-Rezeptor-mRNA. Der Effekt der Flavonoide bei Kostimulation mit Noradrenalin und Flavonoid war bei der Gruppe der Flavanone (Isokuranetin, Pinocembrin) nicht wie erwartet, ebenso bei 6-Hydroxyflavon.

Der Nachweis der CRHR2-Rezeptoren auf Proteinebene durch die Western-Blotting-Methode lieferte keine signifikante Nachweise.

Somit können wir für die getesteten Flavonoide eine antiadhäsive Wirkung sowohl für die Kostimulationen mit CRH als auch mit Noradrenalin auf die beiden Zellreihen darstellen. Ebenso deren Beteiligung an einer suffizienten Stressantwort über das Endothelin-1-Hormon und die CRHR2-Rezeptoren bei Kostimulation mit Noradrenalin. In zukünftigen Studien werden noch die genauen Signalwege und Rezeptoren zu erörtern sein, die für diese Prozesse verantwortlich sind.

## **Literaturverzeichnis**

1. S. H-R. Statistisches Bundesamt Wiesbaden. *Statistisches Jahrbuch*. Oktober 2012 2012;2012:130-131.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *Mechanisms of ageing and development*. Mar 1979;9(5-6):435-440.
3. Kohler N, Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental cell research*. Aug 1974;87(2):297-301.
4. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. Jul 17 2001;104(3):365-372.
5. Lipton BA, Parthasarathy S, Ord VA, Clinton SK, Libby P, Rosenfeld ME. Components of the protein fraction of oxidized low density lipoprotein stimulate interleukin-1 alpha production by rabbit arterial macrophage-derived foam cells. *Journal of lipid research*. Oct 1995;36(10):2232-2242.
6. Z. S. Cellular Adhesion and Adhesion Molecules. *Turk J Biol*. 1998;25:1-15.
7. Varki A. Selectin ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 2 1994;91(16):7390-7397.
8. Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biological & pharmaceutical bulletin*. Jan 2003;26(1):1-9.
9. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine*. Oct 5 2000;343(14):1020-1034.
10. Ross GD, Vetvicka V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clinical and experimental immunology*. May 1993;92(2):181-184.
11. Todd RF, 3rd. The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3). *The Journal of clinical investigation*. Jul 1 1996;98(1):1-2.
12. Chi Z, Melendez AJ. Role of cell adhesion molecules and immune-cell migration in the initiation, onset and development of atherosclerosis. *Cell adhesion & migration*. Oct-Dec 2007;1(4):171-175.
13. Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica*. Mar-Apr 1995;80(2):161-175.
14. Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *The Journal of cell biology*. Jun 24 2002;157(7):1233-1245.
15. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology*. Jun 2003;24(6):327-334.
16. Buechley RW, Drake RM, Breslow L. Relationship of amount of cigarette smoking to coronary heart disease mortality rates in men. *Circulation*. Dec 1958;18(6):1085-1090.
17. Ginsberg HN, MacCallum PR. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Journal of the cardiometabolic syndrome*. Spring 2009;4(2):113-119.

18. Kokubo Y, Kamide K. High-normal blood pressure and the risk of cardiovascular disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. Aug 2009;73(8):1381-1385.
19. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. Spring 1998;10(2):230-231.
20. Selye H. Stress and distress. *Comprehensive therapy*. Dec 1975;1(8):9-13.
21. Lüllmann-Rauch R. Histologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*. 2009;3. Auflage:431-432.
22. Klinker RP, H.C.; Silbernagl, S. Physiologie. *Thieme Verlag, Stuttgart*. 2010;6. Auflage:537-547.
23. Dunn AJ, Swiergiel AH. The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *European journal of pharmacology*. Apr 7 2008;583(2-3):186-193.
24. Baker C, Richards LJ, Dayan CM, Jessop DS. Corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in human T and B cells and macrophages: colocalization with arginine vasopressin. *Journal of neuroendocrinology*. Nov 2003;15(11):1070-1074.
25. Veenema AH, Reber SO, Selch S, Obermeier F, Neumann ID. Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice. *Endocrinology*. Jun 2008;149(6):2727-2736.
26. Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, et al. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology*. Jan 1998;139(1):403-413.
27. Pike JL, Smith TL, Hauger RL, et al. Chronic life stress alters sympathetic, neuroendocrine, and immune responsivity to an acute psychological stressor in humans. *Psychosomatic medicine*. Jul-Aug 1997;59(4):447-457.
28. Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Molecular endocrinology*. Aug 1998;12(8):1077-1085.
29. Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Oct 1995;15(10):6340-6350.
30. Lovenberg TW, Chalmers DT, Liu C, De Souza EB. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology*. Sep 1995;136(9):4139-4142.
31. Kokkotou E, Torres D, Moss AC, et al. Corticotropin-releasing hormone receptor 2-deficient mice have reduced intestinal inflammatory responses. *Journal of immunology*. Sep 1 2006;177(5):3355-3361.
32. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. Nov 16 1995;378(6554):287-292.

- 33.** Wilbert-Lampen U, Straube F, Trapp A, Deutschmann A, Plasse A, Steinbeck G. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on monocyte function, mediated by CRH-receptor subtype R1 and R2: a potential link between mood disorders and endothelial dysfunction? *Journal of cardiovascular pharmacology*. Jan 2006;47(1):110-116.
- 34.** Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. Dec 1988;6(4):S188-191.
- 35.** Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. Aug 2008;86(8):485-498.
- 36.** Iwasa S, Fan J, Miyauchi T, Watanabe T. Blockade of endothelin receptors reduces diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2001;69(1):1-10.
- 37.** Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *Am J Cardiol*. May 2 2005;95(9A):8B-13B.
- 38.** McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*. Apr 1992;85(4):1374-1379.
- 39.** Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutrition and cancer*. 1993;20(1):21-29.
- 40.** Bojic M, Debeljak Z, Tomicic M, Medic-Saric M, Tomic S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition journal*. 2011;10:73.
- 41.** Rusznyak SS-G. Vitamin P: Flavonols as Vitamins. *Nature*. 1936;128(27).
- 42.** Cholesterol Treatment Trialists C, Mihaylova B, Emberson J, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. Aug 11 2012;380(9841):581-590.
- 43.** Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. *Lancet*. Sep 30 2006;368(9542):1155-1163.
- 44.** Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, et al. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet*. Nov 23 2002;360(9346):1623-1630.
- 45.** Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. Dec 1998;32(7):2057-2064.
- 46.** Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation*. Dec 1994;94(6):2493-2503.
- 47.** Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, et al. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. Apr 9 2004;316(3):659-665.

- 48.** Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of investigative dermatology*. Dec 1992;99(6):683-690.
- 49.** Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, Bosse D, Ades EW, Lawley TJ. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *The Journal of investigative dermatology*. Jun 1994;102(6):833-837.
- 50.** Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer. Journal international du cancer*. Aug 1980;26(2):171-176.
- 51.** Mittar D. PR, McIntyre C. Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation. *BD Biosciences*. 2011:23-13500-13500.
- 52.** Systems RD. QuantiGlo Elisa Assay Principle. *rndsystems.com*. 2013;2013.
- 53.** Nickel T, Deutschmann A, Hanssen H, Summo C, Wilbert-Lampen U. Modification of endothelial biology by acute and chronic stress hormones. *Microvascular research*. Dec 2009;78(3):364-369.
- 54.** Thomas JA, Marks BH. Plasma norepinephrine in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. Feb 1978;41(2):233-243.
- 55.** Wood SK, Valentino RJ. The brain norepinephrine system, stress and cardiovascular vulnerability. *Neurosci Biobehav Rev*. Mar 2017;74(Pt B):393-400.
- 56.** Slotkin TA, Stadler A, Skavicus S, Seidler FJ. Adolescents and adults differ in the immediate and long-term impact of nicotine administration and withdrawal on cardiac norepinephrine. *Brain Res Bull*. Apr 2016;122:71-75.
- 57.** Atsumi W, Tani S, Tachibana E, Hirayama A. Combined Evaluation of the Plasma Arginine Vasopressin and Noradrenaline Levels May be a Useful Predictor of the Prognosis of Patients with Acute Decompensated Heart Failure. *Int Heart J*. Jul 31 2018;59(4):791-801.
- 58.** Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*. Jan 2005;81(1 Suppl):317S-325S.
- 59.** Fernandes I, Perez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules*. Feb 14 2017;22(2).
- 60.** Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. Jul 1 2000;29(1):51-60.
- 61.** Tousoulis D, Psaltopoulou T, Androulakis E, et al. Oxidative stress and early atherosclerosis: novel antioxidant treatment. *Cardiovasc Drugs Ther*. Feb 2015;29(1):75-88.
- 62.** Kawai Y. Immunochemical detection of food-derived polyphenols in the aorta: macrophages as a major target underlying the anti-atherosclerotic activity of polyphenols. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2011;75(4):609-617.
- 63.** Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, et al. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-

atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *The Journal of biological chemistry*. Apr 4 2008;283(14):9424-9434.

**64.** Chisholm LJ, Dovgan PS, Agrawal DK, McGregor PE, Edwards JD. Modulation of monocyte adherence to endothelial cells by endothelin-1 involvement of Src (p60src) and JAK1-like kinases. *Journal of vascular surgery*. Feb 1996;23(2):288-300.

**65.** Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology*. Sep 2012;37(9):1345-1368.

**66.** Hu Y, Liu K, Yan M, Zhang Y, Wang Y, Ren L. Effects and mechanisms of icariin on atherosclerosis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(3):3585-3589.

**67.** Huang WC, Wu SJ, Tu RS, Lai YR, Liou CJ. Phloretin inhibits interleukin-1beta-induced COX-2 and ICAM-1 expression through inhibition of MAPK, Akt, and NF-kappaB signaling in human lung epithelial cells. *Food & function*. Jun 10 2015;6(6):1960-1967.

**68.** Huang WY, Liu YM, Wang J, Wang XN, Li CY. Anti-inflammatory effect of the blueberry anthocyanins malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside in endothelial cells. *Molecules*. 2014;19(8):12827-12841.

**69.** Udomkasemsab A, Ngamlert C, Adisakwattana P, Aroonual A, Tungtrongchitr R, Prangthip P. Maoberry (*Antidesma bunius*) ameliorates oxidative stress and inflammation in cardiac tissues of rats fed a high-fat diet. *BMC Complement Altern Med*. Dec 27 2018;18(1):344.

**70.** Chao PY, Lin KH, Chiu CC, Yang YY, Huang MY, Yang CM. Inhibitive effects of mulberry leaf-related extracts on cell adhesion and inflammatory response in human aortic endothelial cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2013;2013:267217.

**71.** Lim S, Yoon JW, Kang SM, et al. EGb761, a Ginkgo biloba extract, is effective against atherosclerosis in vitro, and in a rat model of type 2 diabetes. *PloS one*. 2011;6(6):e20301.

**72.** McGregor PE, Agrawal DK, Edwards JD. Technique for assessment of leukocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. Oct 1994;32(2):73-77.

**73.** Chisholm LJ, Agrawal DK, Pearson TJ, Edwards JD. Endothelin-1 induces tyrosine phosphorylation in human blood monocytes. *Molecular and cellular biochemistry*. Jun 7 1996;159(1):33-38.

**74.** Feuvrier E, Aubert M, Mausset AL, et al. Glucocorticoids provoke a shift from alpha2- to alpha1-adrenoreceptor activities in cultured hypothalamic slices leading to opposite noradrenaline effect on corticotropin-releasing hormone release. *Journal of neurochemistry*. Mar 1998;70(3):1199-1209.

**75.** Yokotani K, Murakami Y, Okada S, Hirata M. Role of brain arachidonic acid cascade on central CRF1 receptor-mediated activation of sympatho-adrenomedullary outflow in rats. *European journal of pharmacology*. May 11 2001;419(2-3):183-189.

**76.** Fuior EV, Deleanu M, Constantinescu CA, et al. Functional Role of VCAM-1 Targeted Flavonoid-Loaded Lipid Nanoemulsions in Reducing Endothelium Inflammation. *Pharmaceutics*. Aug 3 2019;11(8).



- 77.** Deng Y, Lei T, Li H, Mo X, Wang Z, Ou H. ERK5/KLF2 activation is involved in the reducing effects of puerarin on monocyte adhesion to endothelial cells and atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* Aug 2018;1864(8):2590-2599.
- 78.** Lee CC, Dudonne S, Kim JH, et al. A major daidzin metabolite 7,8,4'-trihydroxyisoflavone found in the plasma of soybean extract-fed rats attenuates monocyte-endothelial cell adhesion. *Food Chem.* Feb 1 2018;240:607-614.

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 modifiziert nach Libby et al. <sup>4</sup> : Initiation, Progression und Komplikation koronaratherosklerotischer Plaques .....	3
Abbildung 2 modifiziert nach Chi et al. <sup>12</sup> : Initialer Schritt der Diapedese der Monozyten in das Endothelgewebe .....	5
Abbildung 3 nach Bojić et al. <sup>40</sup> : Flavan-Basis.....	12
Abbildung 4: Berechnung der prozentualen monozytären Adhäsion an HMEC-1-Zellen <sup>33</sup> .....	29
Abbildung 5 modifiziert nach R&D Systems: QuantiGlo® ELISA Prinzip <sup>52</sup> .....	31
Abbildung 6: Adhäsionsassay CRH .....	40
Abbildung 7: Adhäsionsassay Noradrenalin .....	41
Abbildung 8: Adhäsionsassay CRH/CRH+Flavonoid.....	42
Abbildung 9: Adhäsionsassay NOR/NOR+Flavonoid .....	43
Abbildung 10: ET-1 ELISA NOR-Stimulation.....	44
Abbildung 11: ET-1 ELISA Kostimulation NOR+Flavonoid.....	46
Abbildung 12: rt-PCR Darstellung der Noradrenalin-Stimulation.....	47
Abbildung 13: rt-PCR Darstellung der Noradrenalin/Flavonoid-Kostimulationen .....	49

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Flavonoid-Konzentrationen .....	23
Tabelle 2: rtPCR-Reaktionszyklus .....	35

## ***Danksagung***

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt an erster Stelle Fr. Priv.-Doz. Dr. med. Ute Wilbert-Lampen als Leiterin der Arbeitsgruppe, für meine Übernahme als Doktorandin in der Ersten Medizinischen Klinik, des Weiteren für die formelle Betreuung meiner Arbeit und für die Bereitstellung des hervorragend ausgestatteten Forschungslabors. Sie bot mir die Möglichkeit der Teilnahme an einem äußerst interessanten Projekt.

Mein großer Dank gilt an dieser Stelle Dr. med. Korbinian Lackermair als dem Betreuer meiner Arbeit. Er schlug mir zu Beginn meines zweiten Studienabschnitts die Teilnahme an der Arbeitsgruppe vor. Mit seiner grundsätzlich optimistischen Haltung stand er jederzeit, auch bei Rückschlägen stets motivierend an meiner Seite. Ich danke ihm für diese sowohl fachliche als auch menschliche Unterstützung, seine wertvollen Ratschläge waren unverzichtbar für den Erfolg dieser Arbeit. Auch über die Promotion hinaus ist er als Arzt Vorbild für mich.

Zu großem Dank bin ich Frau Zeljka Sisic verpflichtet. Mit viel Geduld, einer stets unerschöpflich positiven Energie und immer guter Laune führte sie mich durch die Grundzüge des experimentellen Arbeitens im Forschungslabor. Es gab kein Problem, das mit ihrer Erfahrung und Hartnäckigkeit nicht gelöst werden konnte.

Vielen Dank auch an Frau Bianca Hildebrand und Julia Arcifa für das zur Verfügung stellen von technischen Hilfsmitteln und wertvollen Ratschlägen.

Insbesondere möchte ich meinem Mann Alexander, meinen Eltern und Schwiegereltern danken, die mich mit ihrer Liebe, ihrem Verständnis und ihrer Kraft stets unterstützt haben.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation **„Monozytenadhäsion an Endothelzellen unter Einfluss von Flavonoiden und Stressfaktoren“** selbstständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Dinkelscherben, den 28.11.2020

Verena Weimann