

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Einfluss von Flavanolen auf die zelluläre Endothelregeneration

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martin Enge

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian Heiss

Zweitgutachter: Prof. Dr. Udo Boeken

Für meine Hasenschwestern

„Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.“

Franz Kafka

(1883 - 1924), deutschsprachiger Schriftsteller

Zusammenfassung

Epidemiologische Studien legen nahe, dass die Aufnahme von flavanolreicher Ernährung mit einem erniedrigten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist. Während klinische Interventionsstudien zeigen, dass die Einnahme von Flavanolen akut die endotheliale Funktion in Abhängigkeit zur Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) steigert, sind die Mechanismen insbesondere der chronischen Veränderungen noch nicht abschließend bekannt.

Die Hypothese dieser Arbeit geht davon aus, dass Flavanole die Endothelregeneration *in vitro* steigern.

Zuerst wurden Zellmigrations- und -proliferationsexperimente mit (-)-Epicatechin in Endothelzellen (HUVECs) und *circulating angiogenic cells* (CACs) durchgeführt. Vor und nach Einnahme von Flavanolen und deren Metabolisierung wurden Plasmaproben zu den Zeitpunkten 0 h (Basal- oder Kontrollplasma) und 2 h (Postexpositionsplasma) entnommen. Der Effekt von Basal- und Postexpositionsplasma wurde auf Effekte wie Viabilität, Proliferation, Migration, Wundverschluss und *Tube Formation* in HUVECs untersucht. Zum Schluss wurde in Endothelzellen die Expression von HIF-1 α und VEGF nach Inkubation mit Basal- und Postexpositionsplasma auf Protein- und mRNA-Level untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass (-)-Epicatechin in HUVECs und CACs die Chemokinese und Chemotaxis dosisabhängige und NOS-abhängig mit Maximum bei 100 ng/ml steigern kann ohne jedoch die Zellproliferation zu beeinflussen. Durch Postexpositionsplasma, jedoch nicht durch Kontrollplasma, konnte ein signifikanter NOS-abhängiger Anstieg des Wundverschlusses und der *Tube Formation* gezeigt werden. Parallel zeigten sich gesteigerte Expression von HIF-1 α und VEGF in den Endothelzellen.

Die Daten zeigen, dass zirkulierende Flavanole und deren zirkulierende Metabolite *in vitro* die Endothelregeneration auf zellulärer Ebene positiv beeinflussen können und legen eine Rolle von HIF-1 α in diesem Zusammenhang nahe.

Abstract

Epidemiological studies suggest that the intake of flavanol-rich foods is associated with longterm cardiovascular benefits. While clinical intervention studies show that the intake of flavanol-rich foods and isolated flavanols acutely and chronically enhance eNOS dependent endothelial function, the mechanisms are not well established.

The hypothesis of the thesis claims that flavanols may enhance endothelial regeneration in vitro.

First cell migration and proliferation experiments with (-)-epicatechin in endothelial cells (HUVEC) and circulating angiogenic cells (CACs) were performed. As flavanols are readily absorbed and metabolized, isolated fasting plasma samples from young healthy subjects before (CP=control plasma) and at 2h after ingestion of intervention drinks containing 900 mg of total flavanols (FP=flavanol plasma) were used. The effect of CP and FP on viability, proliferation, migration, wound closure, and tube formation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and circulating angiogenic cells (CACs) was investigated. Finally, the protein and mRNA expression of HIF-1a and its downstream target gene VEGF after incubation with CP and FP was measured.

The results show that (-)-epicatechin in HUVECs and CACs dose-dependently increased chemokinesis and chemotaxis with a maximum at 100 ng/ml but not cell proliferation in HUVECs and CACs via an eNOS-dependent mechanism. In endothelial cells, coincubation with FP, but not CP led to a significant enhancement in NOSdependent wound closure and of tube formation which was paralleled by increased HIF-1a protein and increased mRNA and protein expression of VEGF.

The data suggest that circulating cocoa flavanols and its metabolites can enhance endothelial regeneration in vitro involving HIF-1 α .

Abkürzungsverzeichnis

5-BrdU		5-Bromodeoxyuridin
CAC	circulating angiogenic cell	zirkulierende angiogenetische Zellen
cDNA	complementary desoxyribonuclein acid	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI		4',6-Diamidin-2-Phenylindol
Dil-ac-LDL		diluiertes acetyliertes LDL
DMSO		Dimethylsulfoxid
EBM	endothelial basal medium	Endothelzellenbasismedium
EDTA		Ethylendiamintetraacetat
EGM	endothelial growth medium	Endothelzellwachstumsmedium
FBS	fetal bovine serum	fötales Rinderserum
FCS	fetal calv serum	fötales Kälberserum
gDNA	genomic desoxyribonuclein acid	genomische Desoxyribonukleinsäure
HCl		Chlorwasserstoff
HIF1- α	hypoxia induced factor 1 subunit alpha	Hypoxieinduzierter Faktor 1 Untereinheit alpha
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	humane Nabelschnurvenenendothelzelle
ICC	immuncyto chemistry	Immuncytochemie
KCL		Kaliumchlorid
LDL	low density lipoprotein	Niederdichtes Lipoprotein
L-NMMA		N ^G -Monomethyl-L-arginine
mRNA	messenger ribonuclein acid	Boten-Ribonukleinsäure
MTT		3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl		Natriumchlorid
PBS	phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep		Penicillin/Streptomycin
PHD2	prolyl hydroxylase 2	Prolylhydroxylase 2
RT	reverse Transkription	reverse Transkription
SNAP		S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine
VEGF	vascular endothelial growth factor	Endothelgefäß-Wachstumsfaktor
w/o	without	ohne
WB	Western blot	Western Blot

Inhalt

1 Einleitung	1
1.2 Ziele der Arbeit	5
3 Material und Methoden	6
3.1 Materialien	6
3.1.1 Allgemeine Chemikalien.....	6
3.1.2 Spezielle Chemikalien, Kits und Assays	6
3.1.3 Zellkultur	6
3.1.4 Proteinbiochemie	7
3.1.5 Nukleinsäuren-Analytik	8
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	8
3.1.7 Geräte	9
3.2 Methoden.....	10
3.2.1 Probandenkollektiv	10
3.2.2 Nahrungssupplemente für die Blutplasmagewinnung	11
3.2.3 Interventionsstudie	12
3.2.4 Gewinnung von Blutplasma	13
3.2.5 Zellkultur	14
3.2.6 Kultivierung von humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC).....	16
3.2.7 Kultivierung von zirkulierenden angiogenic cells (CACs)	20
3.2.8 Proliferationstestung	20
3.2.9 In vitro Migrationsmodelle	20
3.2.10 <i>In vitro</i> Angiogenesemodell.....	23
3.2.11 Proteinbiochemische Verfahren	26
3.2.12 Nukleinsäure-Analyseverfahren	34
3.2.13 Viabilitätstest/Mitochondrienaktivitätstest 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT)-Test.....	39

4 Ergebnisse	40
4.1 Kein Einfluss von Plasma und (-)-Epicatechin auf die Zellviabilität und Proliferation	40
4.2 Dosisabhängige Stimulation der NOS-abhängigen Migration von Endothel- und zirkulierenden proangiogenetischen Zellen durch (-)-Epicatechin	43
4.3 Postexpositionsplasma beschleunigt den endothelialen Wundverschluss <i>in vitro</i>	45
4.4 Postexpositionsplasma stimuliert Angiogenese, HIF-1 α und VEGF-Expression	47
4.4.1 Etablierung und Validierung des Tube Formation Assays.....	47
4.4.2 Stimulation der Angiogenese durch Postexpositionsplasma.....	53
4.4.3 Postexpositionsplasma stimuliert die das Proteinlevel von HIF-1 α	55
4.4.4 Postexpositionsplasma stimuliert die Expression von VEGF	58
5 Diskussion.....	60
5.1 Zusammenhang von Flavanolen, Postexpositionsplasma und (-)-Epicatechin	60
5.2 Wirkung von Flavanol(metaboliten) <i>in vitro</i>	62
5.2.1 Einfluss von Flavanolen auf Endothelfunktion.....	62
5.2.2 Zusammenhang von HIF-1 α und VEGF.....	63
5.3 Senkung des kardiovaskulären Risikos – Klinische Bedeutung.....	65
5.4 Methodenkritik	66
Literaturverzeichnis	67

1 Einleitung

Epidemiologische Studien legen nahe, dass eine inverse Beziehung zwischen der Aufnahme von polyphenolreichen Lebensmitteln und kardiovaskulärer Morbidität sowie Mortalität besteht. So wird der Konsum von Polyphenolen, zu denen auch die Gruppe der Flavanole gehören, im Zusammenhang einer Risikominderung für kardiovaskuläre Erkrankungen oder auch der Einfluss auf degenerative Veränderungen diskutiert (Arts & Hollman, 2005; Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Remesy, 2005; Williamson & Manach, 2005). Diese Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in besonders großen Mengen in bestimmten Lebensmitteln, wie z. B. Beeren, Kakao, Schokolade und Tee vorkommen (Baba et al., 2000; Duffy et al., 2001; Heiss et al., 2007; Joshipura et al., 2001). Neben Flavanolen gehören auch Carotinoide, Glukosinolate, Monoterpene, Lektine, Saponine, Sulfide, Phytoöstrogene und Phytosterine zu den sekundären Pflanzenstoffen.

Klinische Interventionsstudien mit kardiovaskulären Surrogatendpunkten unterstützen diese Annahmen (Heiss et al., 2007; Heiss, Jahn, et al., 2010; Heiss, Keen, & Kelm, 2010; Heiss et al., 2005).

Polyphenole verfügen über das flavanoide Grundgerüst, bestehend aus 15 Kohlenstoffatomen, zwei aromatischen Ringen und 3 Kohlenstoffbrückenbindungen. Die verschiedenen Untergruppen der Polyphenole sind durch unterschiedliche positionelle Gruppen definiert (Del Rio et al., 2013).

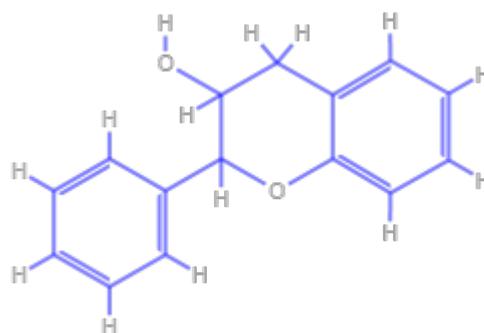


Abbildung 1: flavanoide Grundgerüst

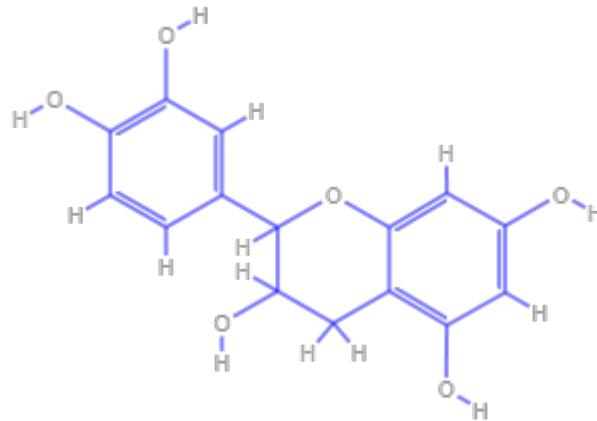


Abbildung 2: (-)-Epicatechin

In der Ernährung liegen Flavanole als Monomere und Oligomere (Prozyanidine) vor (Baba et al., 2000; Henning et al., 2004; Holt et al., 2002; Rodriguez-Mateos, Oruna-Concha, Kwik-Urbe, Vidal, & Spencer, 2012). Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen, dass Oligomere nicht absorbiert werden und von den 4 möglichen Stereoisomeren (-)-Epicatechin, (+)-Epicatechin, (+)-Catechin und (-)-Catechin scheint das monomere (-)-Epicatechin die wichtigste Rolle in der Vermittlung der biologischen Flavanolwirkungen zu spielen.

Die genaue Wirkweise, welche zu den oben genannten Effekten führt, ist aber bisher nicht abschließend geklärt.

Die 2015 veröffentlichte Flaviola Health Studie zeigte bei Aufnahme von Flavanolen sowohl eine akute als auch eine chronische Komponente, welche sich in einer verbesserten flussabhängigen Dilatation (FMD) Funktion als Biomarker der Endothelfunktion der Probanden zeigte die auch nach Ausscheidung der zirkulierenden Flavanole nach nächtlichem Fasten erhalten blieb (Sansone et al., 2015).

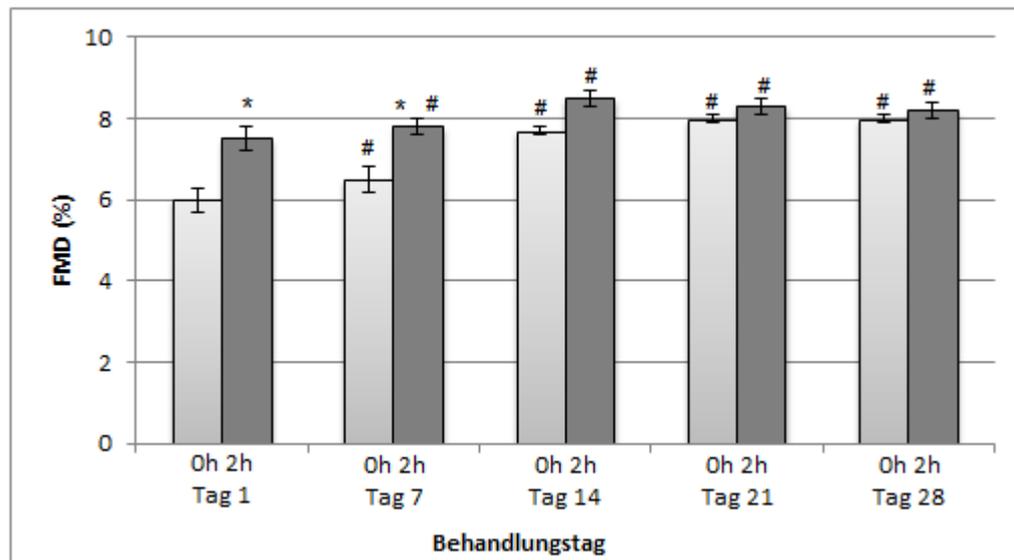


Abbildung 3: Zeitverlauf von flussvermittelter Gefäßdehnung (FMD) basierend auf der offenen Pilotstudie der Flaviola Health Study (Sansone et al., 2015). Die Messungen wurden durchgeführt an den Tagen 1, 7, 14, 21 und 28 vor und nach Aufnahme eines Flavanolreichen Interventionsgetränkes. Die Aufnahme an den Tagen 1 und 7 (A) führten zu einem akuten Anstieg der FMD. Obwohl der gemessene FMD-Wert nach wiederholter Flavanolaufnahme sich in einem chronischen Effekt zeigte (B), waren diese akut-auf-chronisch-Effekte nicht mehr signifikant an den Tagen 14, 21 und 28 trotz weiterer täglicher Aufnahme des Getränkes (C). (* $p < 0,05$ vs. 0h am selbem Tag. # $< 0,05$ vs. 0h an Tag 1) (MW \pm SEM) (Sansone et al., 2015)

Frühere Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Huttemann et al., 2013; Ramirez-Sanchez et al., 2012) legen eine proangiogenetische Wirkung von Flavanolen nahe. Ebenfalls zeigten sich hier interessante Ansatzpunkte und mögliche Signalwege, die chronischen Adaptationsvorgängen im Gefäßsystem zugrunde liegen könnten.

Grundlegende Prozesse der Gefäßneubildung sind Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

Die Vaskulogenese als primärer gefäßbildender Vorgang bezeichnet die Entstehung von Gefäßen noch in der Embryonalphase. Durch Aggregation multipotenter mesenchymaler Progenitorzellen (Angioblasten) entsteht ein primitives kapillares Grundgerüst, welches die Struktur für die nachfolgende Angiogenese bildet (Drake, 2003; Risau et al., 1988).

Die Angiogenese bezeichnet die Sprossung von bestehenden kapillären endothelialen Netzwerken und wichtige zelluläre Prozesse in diesem Zusammenhang sind Migration, Invasion und Differenzierung (Risau, 1997). Es erfolgen Umbauprozesse, welche unter Mitarbeit verschiedener Mediatoren wie VEGF, PECAM-1 und VE-Cadherin eine Steigerung der Gefäßpermeabilität zur Folge haben. Im Laufe dessen kommt es zu einer Proliferation und Migration von Endothelzellen (Carmeliet, 2000).

Während beide oben genannten Prozesse im Embryo in hohem Maße physiologisch ablaufen, wird gerade die Angiogenese im adulten Körper mit Wundheilung oder pathologischen Prozessen wie koronarer Herzkrankheit, Arteriosklerose und Tumorangiogenese in Verbindung gebracht. Somit bietet eine medikamentöse Modifikation der Angiogenese gerade im Bereich der Onkologie, sowie eine Änderung des Lifestyles durch Ernährung eine bereits bekannte Interventionsmöglichkeit, die Basis gegenwärtiger Forschung ist (Carmeliet & Jain, 2000; Heiss et al., 2015; Rodriguez-Mateos et al., 2016; Sansone et al., 2015).

Die Arteriogenese bezeichnet den Vorgang der Lumenexpansion kollateraler Arteriolen, bei der es durch Blutfluss in diesen Kollateralen zu strukturellen Umbauvorgängen mit Anlagerung von glatten Muskelzellen, Perizyten und Endothelproliferation kommt. Bei Zunahme des Kollateralenflusses aufgrund einer Stenosierung eines bestehenden Gefäßes kommt es zur Freisetzung multipler Faktoren, welche ein Umgestalten der vorhandenen Kollateralen auf eine bis zu 20-fache Lumengröße ermöglicht (Carmeliet, 2000).

1.2 Ziele der Arbeit

Die Arbeitshypothese dieser Arbeit war es, dass Nahrungsflavanole bzw. deren zirkulierende Metabolite einen Einfluss auf die zelluläre Funktion von Endothelzellen haben und so Endothelzellregeneration positiv beeinflussen können.

Um dies zu untersuchen wurden Zellviabilität, Proliferation, Migration mittels Boyden Kammer, Wundverschluss im *Scratch Assay* und Angiogenese im *Matrigel Tube Formation Assay*, sowie molekulare Mechanismen mit Fokus auf HIF-1 α - und VEGF-Expression auf mRNA und Proteinebene in Zellkulturmodellen untersucht. HUVECs und CACs wurden hierzu mit (-)-Epicatechin oder Probandenplasma inkubiert, welches vor und nach Flavanolaufnahme gewonnen wurde.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Die laborüblichen Chemikalien wurden, wenn nicht abweichend angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Das für die Lösungen, Puffer und in den Experimenten verwendete Wasser stammt aus einer MilliQ-Reinstwasser-Anlage (Merck Millipore, Darmstadt) und wurde gegebenenfalls autoklaviert und mittels eines Membranfilters (0,22 µm) sterilfiltriert.

3.1.2 Spezielle Chemikalien, Kits und Assays

Tabelle 1: Auflistung spezielle Chemikalien, Kits und Assays

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Flavanolextrakt	Mars Incorporated (Hackettstown, NJ, USA)
PBS (Phosphate Buffered Saline) -Ca -Mg	Thermo Scientific (Schwerte)
Dulbecco's PBS w/o Ca w/o Mg	GE Healthcare (Freiburg)

3.1.3 Zellkultur

Tabelle 2: Auflistung Materialien Zellkultur

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
EBM-2 (phenolrot) (endothelial basal medium)	LONZA (Basel, Schweiz)
EBM-2 (phenolrotfrei) (endothelial basal medium)	LONZA (Basel, Schweiz)
EGM-2 SingleQuots	LONZA (Basel, Schweiz)
Matrigel (phenolrot)	BD Bioscience (Heidelberg)
Matrigel (phenolrotfrei)	BD Bioscience (Heidelberg)
Rekombinantes humanes VEGF	PAN BIOTECH (Aidenbach)

Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)	PAA
Zellproliferationsassay BrdU	Roche (Mannheim)
8 well chamber slides	ibidi (München)
Corning Transwell - Membranen	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

3.1.4 Proteinbiochemie

Tabelle 3: Auflistung Materialien Proteinbiochemie

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Chemilumineszenzreagenz ECL	GE Healthcare (Freiburg)
Chemilumineszenzreagenz Super Signal West Femto	Thermo Scientific (Schwerte)
DC Protein Assay von BioRad	BioRad (München)
Diluiertes acetyliertes LDL (dil-ac-LDL)	Cell Systems (Troisdorf)
HIF-1 α -ELISA KCB1935	R&D Systems (Wiesbaden)
LDS Sample Buffer (4X)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
MagicMark	Life Technologies (Carlsbad, USA)
NuPage 7% Tris-Acetat-Gel 10er Kamm 1,5mmx10mm	Life Technologies (Carlsbad, USA)
NuPage 7% Tris-Acetat-Gel 12er Kamm 1mmx12mm	Life Technologies (Carlsbad, USA)
NuPAGE 7% Tris-Acetat-Gel 15er Kamm 1,5mmx15mm	Life Technologies (Carlsbad, USA)
NuPAGE Antioxidant	Life Technologies (Carlsbad, USA)
NuPAGE Reducing Agent (10X)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
NuPAGE Transfer-Puffer (20X)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
NuPAGE Tris-Acetat Lauf-Puffer (20X)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare (Freiburg)
Phosphatase-/Protease-Inhibitoren	Thermo Scientific (Schwerte)
RainbowMarker „RPN800E“	GE Healthcare (Freiburg)
VEGF-ELISA CSB-E11718h	Cusabio Biotech (Wuhan, China)

3.1.5 Nukleinsäuren-Analytik

Tabelle 4: Auflistung Materialien Nukleinsäuren-Analytik

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Taqman Genexpressionsassay	Life Technologies (Carlsbad, USA)
PCR-Primer <ul style="list-style-type: none"> • 18S • HIF1-α • VEGF 	Qiagen (Hilden)
Quantitec RT KIT <ul style="list-style-type: none"> • gDNA-Eliminationspuffer • Reverse-Transkriptase • Reverse-Transkriptasepuffer 5X • Reverse-Transkriptase Primerixtur 	Qiagen (Hilden)
Trizol	Life Technologies (Carlsbad, USA)
RNAseZap	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Taqman Genexpressionshauptmixture <ul style="list-style-type: none"> • Genexpressionsassay (20X) • Genexpressionshauptmixture (2X) 	Qiagen (Hilden)

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Die laborüblichen Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht abweichend angegeben, von den Firmen BD (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Sigma Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tabelle 5: Auflistung Verbrauchsmaterialien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Nitrocellulose Membran	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Parafilm	Brand (Wertheim)
Pasteur-Glaspipetten	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen	STARLAB (Hamburg)
Zellkulturschalen 100mm ²	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Millex GP Filter Einheit (0,22 μ m)	Merck Millipore (Darmstadt)
Whatmanpapier	Merck Millipore (Darmstadt)
Vacutainer®-System	Becton Dickinson (Plymouth, UK)
Plastikröhrchen (S-Monovetten)	Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.7 Geräte

Tabelle 6: Auflistung Geräte

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
7500 Fast Real-Time PCR System	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Autoklav Systec DX-90	Systec (Wettenberg)
Bildanalysator „Image Quant LAS4000“	GE Healthcare (München)
Feinwaage BP 210 D	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop DM IL	Leica Microsystems (Wetzlar)
Inkubations- / Inaktivierungsbad 1002	GFL (Burgwedel)
Inkubator “BBD 6220 CO2 Incubator”	Thermo Scientific (Schwerte)
Kaltlichtquelle EL 6000	Leica Microsystems (Wetzlar)
Kühlzentrifuge „Centrifuge 5417R“	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge ROTINA 380 R	Hettich (Hanau)
Magnetrührer „IKAMAG RCT“	IKA-Labortechnik (Staufen)
Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Membran-Vakuumpumpe	vacuubrand (Wertheim)
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems (Wetzlar)
Mikroskopkamera DFC 450 C	Leica Microsystems (Wetzlar)
Mini-Vac power Vacuum System	Axonlab (Baden)
MS1 Minishaker	IKA-Labortechnik (Staufen)
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Novex Minizelle „XCess Surelock Elektrophoresezelle“	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Novex XCell II Blotmodul	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Orbitalschüttler „Polymax 1040“	Heidolph (Schwabach)
pH-Meter „Lab 870“	SCHOTT (Mainz)
Photometer „Fluostar Omega“	BMG Labtech (Ortenberg)
Pipet Boy comfort	Integra Bioscience (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Spannungsquelle Power Pac 300	BioRad (München)
Sterilbank Antair “BSK-4 MP”	Heraeus (Osterode)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Vortex Reagenzglasnischer	neoLab (Heidelberg)
Waage „CP225D-OCE“	Sartorius (Göttingen)

3.2 Methoden

3.2.1 Probandenkollektiv

Das Lebensalter der Probanden zur Plasmagewinnung betrug 23 bis 29 Jahre. Sie waren ausnahmslos männlich, gesund und haben sich einem vierundzwanzigstündigen Verzicht flavanolhaltiger Lebensmittel, sowie einer zwölfstündigen Nüchternphase vor Blutentnahme unterzogen.

Ein entsprechender Ethikantrag (3554R AGE-Studie) wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

3.2.2 Nahrungssupplemente für die Blutplasmagewinnung

Kakaopulver mit hohem Flavanolgehalt (450 mg Gesamtflavanole, 64 mg (-)-Epicatechin) wurde von Mars Inc. (Hackettstown, NJ, USA) im Rahmen des FLAVIOLA Projektes zur Verfügung gestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Kakaopulvers. ND= nicht detektierbar

Flavanole total (mg)	450
Monomere (mg)	73
(-)-Epicatechin (mg)	64
(-)-Catechin (mg)	7
(+)-Catechin (mg)	2
(+)-Epicatechin (mg)	ND
Di- und Polymere (mg)	377
Theobromin (mg)	44
Koffein (mg)	10
Fett (mg)	0
Kohlenhydrate (mg)	6
Protein (mg)	100
Energie (kcal)	25
Natrium (mg)	3
Kalium (mg)	95

3.2.3 Interventionsstudie

Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, weisen Flavanele im Blutplasma eine spezielle Absorptions- und Metabolisationsrate mit einer Maximalkonzentration 2 Stunden nach oraler Einnahme auf (Baba et al., 2000; Henning et al., 2004; Holt et al., 2002; Rodriguez-Mateos et al., 2012).

Das flavanolreiche Pulver (2 x 450 mg) wurde in stillem Wasser gelöst und oral durch die Probanden aufgenommen. Der Blutentnahmeschritt wurde direkt vor Aufnahme des gelösten Pulvers durchgeführt und wiederholte sich 2 Stunden nach Aufnahme der Flavanele, um mit Metaboliten angereichertes Blut zu erhalten.

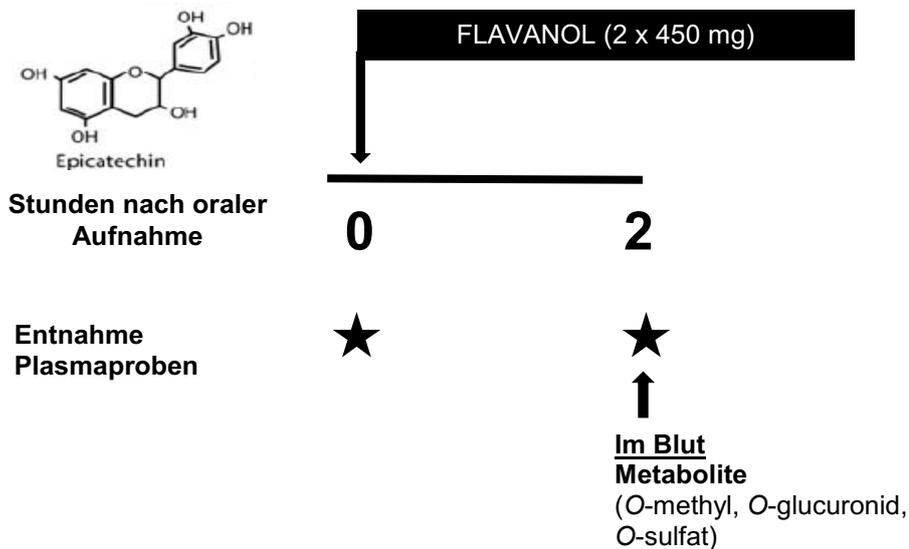


Abbildung 4: Entnahmezeitpunkte der Blutproben. Entsprechend der in der Literatur angegebenen Höchstkonzentrationen von Flavanolbestandteilen im Blut wurde die Postexpositions-Probe 2 Stunden nach Aufnahme des Pulvers durchgeführt (Baba et al., 2000; Henning et al., 2004; Holt et al., 2002; Rodriguez-Mateos et al., 2012).

3.2.4 Gewinnung von Blutplasma

Zur Blutentnahme wurde einheitlich das *Vacutainer*[®]-System (Becton Dickinson, Plymouth, UK) in Kombination mit 4,5 ml Heparin-beschichteten Plastikröhrchen und 10 ml EDTA-beschichteten Plastikröhrchen (S-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht, D) verwendet. Die mit Blut gefüllten Röhrchen wurden unmittelbar nach Entnahme bei 4°C und 800 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde in 750 µl-Aliquote (Heparin-beschichtete Röhrchen) und 1,2 ml-Aliquote (EDTA-beschichtete Röhrchen) in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu den EDTA-Plasmaproben wurde 6 µl Zitronensäure (1 M) hinzugegeben. Das Probenmaterial wurde bei -80°C bis zur weiteren Nutzung eingefroren.

3.2.4.1 Flavanolanalyse in Plasmaproben

(-)-Epicatechin und dessen Metabolite wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und elektrochemischer Detektion extern nach Standards der Firma Mars Inc. durchgeführt.

Zur Primäranalyse wurden 500 µl Plasma aufgetaut und dann β-Glucuronidase sowie Sulfatase zugegeben (2000 Einheiten/ml für 40 Minuten bei 37°C). Danach Zugabe von 2 ml angesäuertem eiskaltem Methanol (0,5% Essigsäure in Methanol, v/v) und 3'-O-ethyl(-)-Epicatechin (500 nM). Die Proben wurden bei 4°C und 17.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet erneut in 2 ml angesäuertem eiskaltem Methanol und 3'-O-ethyl(-)-Epicatechin (500 nM) gelöst, sowie im Anschluss erneut in 1 ml 50% Methanol mit 0,5% Essigsäure und 3'-O-ethyl(-)-Epicatechin (500 nM) versetzt. Die kombinierten Überstände wurden durch ein *Speedvac System* (Thermo Fisher Scientific Inc., Basingstoke, UK) und gemischt mit Resorcin (300 pmol) und Katechol (300 pmol) zur anschließenden Analyse von Flavanolmonomeren und O-methylierten Metaboliten durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in einer *Hewlett-Packard 1200 series HPLC* (Hewlett-Packard, Palo alto, CA, USA) zu 50 µl konzentriert.

Die Proben (50 µl) wurden in eine *reversed-phase Phenomenex Luna C18(2) Column* (4,6 x 150 mm) mit einer Partikelgröße von 3 µm gefüllt. Die mobile Phase bestand aus (A) HPLC Wasser, (B) 200 mM Natriumacetat, pH

4.4/Methanol (84/16) und (C) Acezonitril. Folgendes Protokoll wurde durchlaufen: 0 Minuten, 75% A, 25% B; 5 Minuten, 75% A, 25% B; 20 Minuten, 65% A, 25% B; 28 Minuten, 63% A, 25% B; 34 Minuten, 55% A; 25% B; 41 Minuten, 45% A, 25% B; 45 Minuten, 25% B, 75% C; 55 Minuten, 25% B, 75% C; 56,1 Minuten, 75% A, 25% B; 60 Minuten, 75% A, 25% B. Die Durchflussrate betrug 0,8 ml/min. Die Fluoreszenzdarstellung der Flavanole und ihrer Metaboliten erfolgte mit einer Extinktion bei 276 nm und einer Emissionswellenlänge von 316 nm. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Standarddeichkurve.

3.2.5 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten, die direkt oder indirekt mit der Zellkultur zu tun hatten, wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitsarbeitsbank durchgeführt. Zur Keimreduzierung wurden vor den Arbeitsschritten desinfizierende Reinigungen durchgeführt und zur Arbeit keimarme Nitrilhandschuhe verwendet. Chemikalien und Materialien wurden erst unter der Sicherheitsarbeitsbank geöffnet.

Kulturmedien**Tabelle 8: Zusammensetzung Kulturmedien**

EBM 0% Medium	<i>endothelial basal medium</i> (EBM; LONZA, Basel, Schweiz) +Penicillin/Streptomycin (PAA) 3 ml
EBM No FCS-Medium/ Basismedium	<i>endothelial basal medium</i> (EBM; LONZA, Basel, Schweiz) 500 ml +Penicillin/Streptomycin (PAA) 3 ml +EGM™-2 <i>BulletKit</i> ™(CC-3162)(FCS dem Set entnommen) <ul style="list-style-type: none"> ○ hEGF ○ Hydrocortison ○ GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B) ○ FCS (<i>Fetal Calv Serum</i>) 10 ml (nicht hitzeinaktiviert) ○ VEGF ○ hFGF-B ○ R3-IGF-1 ○ Ascorbinsäure ○ Heparin
EBM 0,5%-FCS-medium	<i>endothelial basal medium</i> (EBM; LONZA, Basel, Schweiz) 500 ml +Penicillin/Streptomycin (PAA) 3 ml +EGM™-2 <i>BulletKit</i> ™(CC-3162) <ul style="list-style-type: none"> ○ hEGF ○ Hydrocortison ○ GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B) ○ FCS (<i>Fetal Calv Serum</i>) 10 ml (nicht hitzeinaktiviert) ○ VEGF ○ hFGF-B ○ R3-IGF-1 ○ Ascorbinsäure ○ Heparin
EBM 2%-FCS-Medium/ EBM Komplettmedium/ Kontrollmedium	<i>endothelial basal medium</i> (EBM; LONZA, Basel, Schweiz) 500 ml +Penicillin/Streptomycin (PAA) 3 ml +EGM™-2 <i>BulletKit</i> ™(CC-3162) <ul style="list-style-type: none"> ○ hEGF ○ Hydrocortison ○ GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B) ○ FCS (<i>Fetal Calv Serum</i>) 10 ml (nicht hitzeinaktiviert) ○ VEGF ○ hFGF-B ○ R3-IGF-1 ○ Ascorbinsäure ○ Heparin
FCS	BioWhitaker <i>Fetal Calv Serum</i> (LONZA) ¾ Std bei 56°C hitzeinaktiviert

3.2.6 Kultivierung von humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVEC)

3.2.6.1 Zelllinie

Die zur Kultivierung verwendeten HUVEC (Jaffe, Nachman, Becker, & Minick, 1973) sind gepoolte (männlich/weiblich) primäre Nabelschnurvenen-Endothelzellen Neugeborener. Geliefert werden sie von der Firma LONZA (Basel, Schweiz) auf Trockeneis und werden bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

3.2.6.2 Zellkulturtechniken

Auftauen von HUVEC

Zum Auftauen wurden die HUVEC dem Stickstofftank entnommen und in der geschlossenen Hand schnell aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 25 ml vorgewärmtem EBM Komplettmedium (mit Phenolrot) überführt (Passage 0). Im Anschluss wurden die Endothelzellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach circa 8 Stunden hatten sich die Zellen abgesetzt und es konnte ein Medienwechsel durchgeführt werden, um das im Gefriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. So sollte eine mögliche Schädigung der HUVEC durch längere Exposition verhindert werden.

Passagieren von HUVEC

Während der Zellkultivierung und bis zum Ausbringen wurden die HUVECs unabhängig vom Konfluenzstatus alle zwei Tage mit 7 ml EBM Komplettmedium versorgt. Bei 70-90 prozentiger Konfluenz der Zellen wurden diese entweder passagiert oder für Versuche in Zellkulturschalen ausgebracht. Insgesamt wurden die Primärzellen höchstens bis in die vierte Passage hin verwendet.

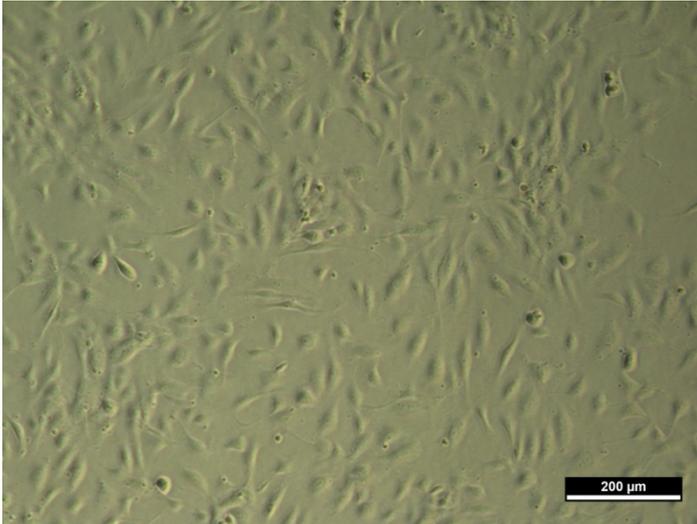


Abbildung 5: Subkonfluenter Monolayer 80%. Bei subkonfluentem Zustand liegen die Zellen in einer größtmöglichen Anzahl ohne funktionelle Einbußen vor.

Zum Passagieren wurden die HUVECs mit 10 ml PBS (ohne Ca^{2+} ohne Mg^{2+}) gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin-EDTA kurz inkubiert, bis sich mikroskopisch das Ablösen der HUVECs vom Flaschenboden durch Abrundung der Zellen beobachten ließ. Zum Stoppen der Reaktion wurden 7 ml EBM Komplettmedium hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden geschabt. Unter Resuspendieren wurden die Zellen im Medium in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 20°C mit 300 g für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen je nach Verwendungszweck (Passagieren oder Versuche) mit EBM Komplettmedium entsprechend verdünnt. Zum Ausbringen der HUVEC für Experimente wurde die Zellzahl bestimmt.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzählung (Zellen/ml) wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Ein mit Alkohol gereinigtes Deckglas wurde durch Anfeuchten auf eine Zählkammer aufgebracht. Nach optischem Nachweis der Newton-Ringe war diese einsatzbereit. EBM Komplettmedium wurde zu dem durch vorherige Zentrifugation erhaltenem Zellpellet hinzugefügt und resuspendiert. Unmittelbar danach wurden 10 µl der Suspension an ein Ende der Kammer pipettiert. Durch Kapillarkräfte wurden diese in die Zählkammer eingesaugt. Unter Verwendung eines 10er Objektivs am Lichtmikroskop DM IL (Leica Microsystems, Wetzlar) wurden 4 Quadranten á 16 Quadrate mäanderförmig ausgezählt.

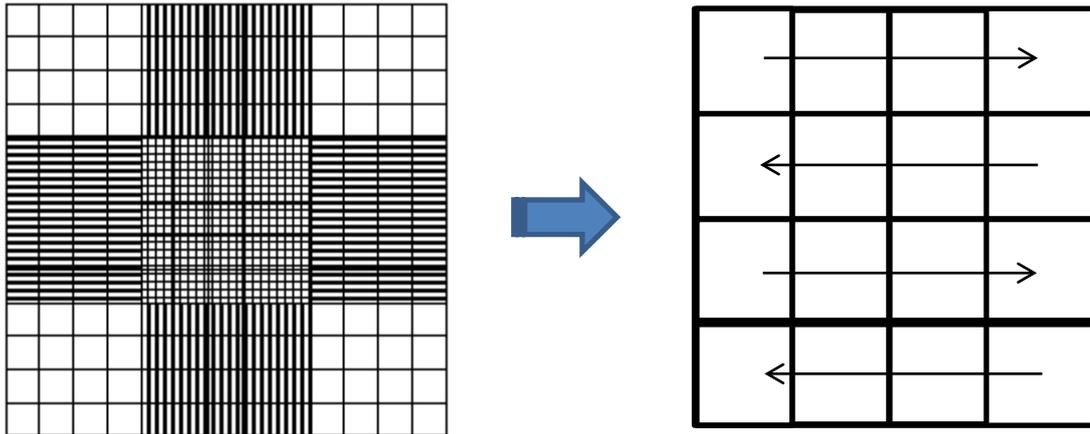


Abbildung 6: Zählkammer mit mäandernder Zählrichtung. In die Zählkammer werden 10 μl einer Zelllösung aufgetragen, anschließend in allen 4 Quadranten entsprechend aufgezeigtem Muster die Zellen gezählt und daraus der Durchschnitt berechnet, um die Zellzahl / ml zu bestimmen.

Der Mittelwert der gezählten Zellen aus den 4 Quadranten (n) wurde in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Zellzahl im Gesamtvolumen (x)} = n * 10^4 * x \text{ ml}$$

Somit erhält man die Konzentration der Zelllösung (x). Mit Hilfe des Dreisatzes konnten Stocklösungen für die anstehenden Experimente erstellt werden.

Zellernte

Zur Gewinnung von Proteinlysaten und totaler RNA aus HUVECs mussten diese nach Abschluss der jeweiligen Versuche aus den Zellkulturschalen abgeerntet werden. Hierzu wurden die Zellkulturschalen aus dem Inkubator genommen und direkt auf Eis gestellt. Daraufhin wurde der Überstand sorgfältig abgenommen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen einmal mit vorgekühltem PBS gewaschen und in 10 ml PBS pro Zellkulturschale aufgenommen, nachdem sie zuvor mittels Zellschaber vom Boden gelöst worden sind. Die nun nicht mehr adhären HUVEC wurden in 50 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bei 4°C mit 800 g für 15 Minuten zentrifugiert, bis ein Pellet entstand. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in einem geringeren Volumen PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C mit 800 g für 15 Minuten wurde der Überstand vollständig

entfernt und das trockene Zellpellet direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

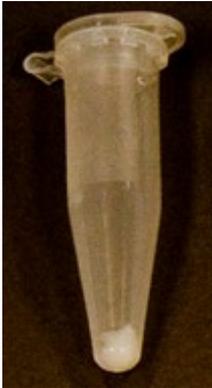


Abbildung 7: Pellet einer Zellbehandlung.

3.2.7 Kultivierung von zirkulierenden angiogenic cells (CACs)

3.2.7.1 Zelllinie

Zur Kultivierung der verwendeten CACs - auch bezeichnet als endotheliale Progenitorzellen (EPC) - wurden bei insgesamt 10 jungen, männlichen Probanden ohne kardiovaskuläres Risiko und bei normaler endothelialer Funktion Blutproben entnommen und mittels Ficoll Gradientenzentrifugation mononukleäre Zellen isoliert. Diese wurden über 7 Tage auf Fibronectin beschichteten Kulturschalen kultiviert (Heiss et al., 2005).

3.2.8 Proliferationstestung

Adhärente CACs wurden nach 7 Tagen Kultur mittels Dissoziationspuffer von den Schalen gelöst und jeweils 2.000 Zellen/Kammer in 96 Well Mikrotiterplatten überführt. Anschließend wurde zur Proliferationstestung ein 5-Bromodeoxyuridinassay verwendet. Hierzu wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt (BrdU Zellproliferationsassay, Roche).

3.2.9 In vitro Migrationsmodelle

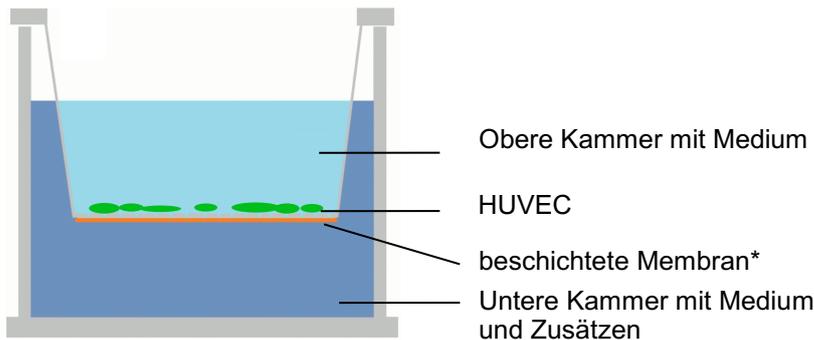
3.2.9.1 Boyden Chamber Assay

Die Zellmigration wurde mit Hilfe eines modifizierten Boyden Kammer Protokolls untersucht (Boyden, 1962). Über 7 Tage kultivierte CACs und HUVECs wurden je in der Konzentration 2×10^4 Zellen in die obere Kammer mit EBM 0,5% FCS-Medium gegeben. Es wurden Membranen mit 8 μm -Poren (Sigma Aldrich) eingesetzt.

In beiden Zellreihen wurden folgende chemotaktische und chemokinetische Faktoren getestet: VEGF, (-)-Epicatechin. Zusätzlich wurde der NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA Negativkontrolle verwendet.

Vor Benutzung wurden die Kammern für 30 Minuten mit 10% BSA-Lösung bei Raumtemperatur geblockt und anschließend 2 Mal mit PBS gewaschen. Die

untere Kammer wurde mit 1500 µl serumfreiem Medium und entsprechenden Zusätzen befüllt. Ein beschichteter Kultureinsatz wurde über die untere Kammer geführt und mit einer Zellsuspension entsprechend 2×10^4 Zellen befüllt. Anschließend wurden die Kammern für 6 Stunden in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre sowie 5% CO₂ und 37°C inkubiert.



*Gelatine, Fibronectin and Vitronectin

Abbildung 8: Boyden Kammer. Bei chemotaktischen und -kinetischen Zusätzen wandern Zellen durch die beschichtete Membran entlang eines Gradienten.

Nach dieser Inkubationszeit folgte eine zweimalige Waschung mit PBS und eine Fixierung in 4% PFA Lösung für 15 Minuten.

Im Anschluss wurde die Oberseite der Kultureinsätze ausgewischt, um verbliebene Zellen zu entfernen. Danach konnten diese in einer leeren 12 *well* Platte über Nacht bei 4°C gelagert oder direkt für die Mikroskopie vorbereitet werden. Die Membran wurde mit einem Skalpell aus dem Kultureinsatz herausgeschnitten und mit der Unterseite, an der die Zellen adhären sind, auf 10 µl *Vectashield® Mounting Medium* mit DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, Großbritannien) auf einen beschrifteten Objektträger platziert. Auf die Oberseite der Membran wurde ein Deckglas gelegt und die Ränder anschließend mit Klarlack versiegelt. Die Objektträger wurden anschließend dunkel gelagert.

Die Auswertung erfolgte anhand von 5 zufällig bestimmten *High Power Fields* (HPFs) per Mikroskopie bei UV-Fluoreszenz in 100facher Vergrößerung.

Aufnahmepositionen pro Kammer

1		2
	3	
4		5

Abbildung 9: Fünf *High Power Fields* (HPF)/Kammer. Jede Kammer wird entsprechend aufgezeigtem System ausgewertet, um etwaige Abweichungen in der Zellansammlung auszugleichen.

3.2.9.2 *Scratch Assay*

Der *Scratch Assay* ist als *in vitro* Korrelat zur Wundheilung eine weit verbreitete Technik (Lampugnani, 1999). In die Kammern eines 8 *well* μ -Slide (ibidi) wurden HUVECs mit 400 μ l 2% FCS-Medium in Kultur gebracht, bis eine 90 prozentige Konfluenz entstand. Ein gleichmäßiger Zellteppich der HUVECs war erkennbar an dem typischen pflastersteinartigen Muster. Nach Erreichen der Konfluenz wurde mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze je Kammer ein zentraler Kratzer in den Zellteppich eingefügt. Anschließend wurden die Kammern mit 400 μ l serumfreiem Medium befüllt. In diesem Medium wurden die Zellen erneut für 30 Minuten in gesättigter Wasserdampfathmosphäre sowie 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Durch das Fehlen der Zusatzstoffe im Medium wird ein Hungern der Zellen forciert und somit der Zellzyklus synchronisiert. Das Medium wurde wieder abgenommen und 400 μ l Medium mit den zu überprüfenden Zusätzen in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Zur weiteren Auswertung wurden mikroskopische Bilder von den zu Beginn 400 μ m breiten Lücken im Zellteppich bei 100-facher Vergrößerung angefertigt und die Zeit bis zum Verschluss der Lücke beobachtet.

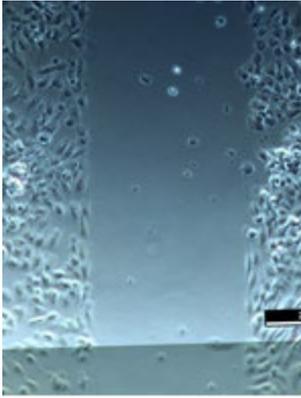


Abbildung 10: Scratch Assay. Ein konfluenter Monolayer wird kontrolliert durchtrennt (gekratzt), daraufhin wird die Zeit bis zum Wundverschluss beobachtet.

3.2.10 *In vitro* Angiogenesemodell

3.2.10.1 *Tube Formation Assay*

Wie schon seit Ende der 80er Jahre bekannt, sind Endothelzellen unter speziellen Voraussetzungen dazu in der Lage tubuläre und kapilläre Formationen auszubilden, welche als Grundstruktur in der Angiogenese gelten (Kubota, Kleinman, Martin, & Lawley, 1988; Maciag, Kadish, Wilkins, Stemerman, & Weinstein, 1982). Die im Assay verwendete Beschichtung (Matrigel) ist ein mit Basalmembran-Bestandteilen angereichertes Gel. Die im Gel enthaltenen Proteine stammen dabei aus Chondrosarkomen von Engelberth-Holm-Swarm-Mäusen. Diese Tumore weisen eine hohe Dichte extrazellulärer Matrix auf. Zu ihren Hauptbestandteilen gehören Lamin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykane, (Kleinman & Martin, 2005; Kleinman et al., 1982).

Für den *Tube Formation Assay* wurde Matrigel (BD Bioscience) über Nacht (6-8 Stunden) aufgetaut, sowie Pipetten und Spitzen heruntergekühlt. Plasma- und VEGF- (PAN Biotech) sowie L-NMMA-Aliquots (Sigma-Aldrich) wurden mindestens 1 Stunde vor geplantem Ausbringen der Zellen auf Eis aufgetaut. 30 Minuten vor Ausbringen der Zellen wurde die gekühlte Pipettenspitze schräg abgeschnitten. Die Matrigeltropfen (40 µl) wurden ins vorgewärmte (im Inkubator, ca. 5 Minuten) *Slide* ausgebracht. Der Boden wurde dabei nicht berührt, um Matrigelschäden beim Polymerisieren zu verhindern. Durch Kippen

und Schnipsen verteilte sich das Matrigel, bis die Polymerisation vollendet war. Anschließend wurde jedes *Slide* 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um darauf mit 40.000 Zellen/400 µl in jede Kammer der LABTECH II *8 well chamber slides* (Thermo Scientific) beimpft zu werden. Nach circa 1 Stunde hatten sich die Zellen abgesetzt und das Medium konnte abgesaugt werden. Um Reste auf dem Matrigel-Zell-Gemisch zu entfernen, wurde einmal mit PBS gewaschen, bevor die Behandlungen in 400 µl/Kammer auf die Zellen gegeben wurden.

Die Behandlungen erfolgten durch eine Standardkontrolle (Basismedium + 2% FCS), der Basalbehandlung (Basismedium + 10% Basal-Plasma) sowie der Metaboliten-Behandlung (Basismedium + 10% Postexpositionsplasma). Die Positivkontrolle erfolgte durch die Standardkontrolle unter Zusatz von VEGF 50 ng/ml, die Negativkontrolle durch Zusatz von L-NMMA 1 mM zum Basismedium mit 2% FCS.

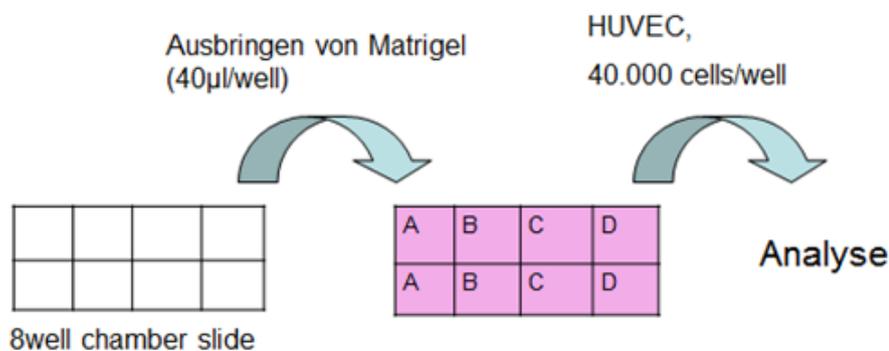


Abbildung 11: Ladung 8 well chamber slide. Die zu untersuchenden Proben wurden immer in Doppelbestimmung untereinander getestet.

Es folgten zweistündige Aufnahmen mit der DFC 450 C-Kamera (Leica Microsystems) am Lichtmikroskop DM IL (Leica Microsystems) der Kammer mit 5 *High Power Fields* (HPFs).

1		2
	3	
4		5

Abbildung 12: Fünf *High Power Fields* (HPF)/Kammer. Jede Kammer wird entsprechend aufgezeigtem System ausgewertet, um etwaige Abweichungen in der Zellansammlung durch z.B. Meniskeneffekt auszugleichen.

Die Bearbeitung erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Zur Auswertung wurden die *branches* (Verzweigungen) herangezogen.

3.2.11 Proteinbiochemische Verfahren

3.2.11.1 Protein-Lyse

Tabelle 9: Zusammensetzung der TRIS-HCl-Lösung mit pH 8,0.

Tris-HCl pH 8,0 (ml)	500
TRIZMA Base (g)	60,55
H ₂ O (ml)	500
HCl (N)	5
HCl zum Titrieren (N)	1

TRIZMA wurde in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert wurde mit 1 M Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Lysepuffer.

Lysepuffer (ml)	100
Saccharose (g)	10,95
H ₂ O (ml)	96
EDTA pH 8,0 (ml)	2
Tris-HCL pH 8,0 (ml)	1
Triton (v/v) (ml)	1

Vor Verwendung des Lysepuffers erfolgte die Zugabe eines Phosphatase-/Protease-Inhibitors (Thermo Scientific, Schwerte). Die hundertfache Stammlösung wurde hierfür auf einfach verdünnt.

Für die Proteinlyse wurden die in Kapitel 3.2.6.2 Methoden-Zellkultur-Zellernte gewonnenen Zellpellets genutzt. Diese wurden in einer der Pelletgröße entsprechenden Menge Lysepuffer (mit Inhibitoren) resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und intermittierend gevortext. Durch anschließende Zentrifugation bei 15000 rpm (*rounds per minute*) und 4°C für 15 Minuten in einer Mikro280R Zentrifuge (Hettich, Hanau) erfolgte eine Trennung der Proteine vom Zelldebris. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand in neue vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). Das Proteinlysate wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.11.2 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

Die Quantitative Proteinbestimmung unter Verwendung des Bio-Rad *DC Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) basiert auf der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry (Lowry et al., 1951). Die Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlysate mit 25 µl einer alkalischen Kupfer(II)-Arbeitslösung und 200 µl Folin-Reagenz pro Kammer einer 96 *well* Mikrotiterplatte gemischt und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 740 nm in einem Fluostar Omega Photometer (BMG Labtech, Ortenberg) gemessen und die Proteinkonzentration mittels BSA-Eichgerade bestimmt.

3.2.11.3 Enzym-linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Der *Enzym-linked Immunosorbent-Assay*, auch als ELISA bezeichnet, ist ein Verfahren, bei dem mit Hilfe von enzymgekoppelten Antikörpern spezielle Antigene nachgewiesen werden können. Dabei wird entweder direkt ein Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden und mittels Antikörper nachgewiesen oder man verwendet das Sandwich-Prinzip, in dem ein Antikörper, der gegen das Antigen gerichtet ist, an die Mikrotiterplatte gebunden ist. Diese Bindung wird durch Detektion mittels Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die meisten Antikörper sind an Enzyme gekoppelt, die über eine Substratumsetzung in der Lage sind Farbveränderungen auszulösen, welche photometrisch gemessen und mit einer Standardreihe verglichen werden können (Van Weemen & Schuurs, 1971).

ELISA zur Quantifizierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α (HIF1-α)

Zum Nachweis von HIF-1α wurde ein zellbasiertes ELISA-KIT der Firma R&D Systems verwendet.

Entsprechend des mitgelieferten Protokolls wurden die Reagenzien vorbereitet. Es wurden in einer 96 *well* Mikrotiterplatte 100 µl á 2 x 10⁵ HUVECs/Kammer ausgebracht. Die Platte wurde über Nacht im Inkubator bei 37°C gehalten,

damit sich die Zellen absetzen konnten. Am darauf folgenden Tag wurden die HUVECs zeitversetzt behandelt (0 h, 4 h, 24 h), so dass die Behandlungen zeitgleich abgeschlossen werden und die Menge an HIF-1 α gleichzeitig photometrisch bestimmt werden konnte. Eine Hypoxieprobe durch Zugabe von Kobaldchlorid wurde als Positivkontrolle durchgeführt (Wu & Yotnda, 2011).

Nach Abschluss der Behandlungen wurden die Zellen mit 0,4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen und es erfolgte die Zugabe von 100 μ l 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS pro Kammer. Die Platte wurde abgedeckt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit 200 μ l Waschpuffer pro Kammer gewaschen und für 20 Minuten mit jeweils 100 μ l Fluoreszenzauslöschpuffer (*Quenching-Buffer*) behandelt, um endogene Enzyme zu deaktivieren, welche im späteren Verlauf des Assays zu fehlerhafter bzw. vorzeitiger Signalaktivierung führen könnten. Nach einem weiteren Waschschrift wurde Blockpuffer aufgetragen, um unspezifische Bindungen zu vermindern. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift und Zugabe von 100 μ l der primären Antikörpermixtur, welche über Nacht bei 2-8°C in den Kammern inkubierte. Am darauf folgenden Tag wurde die Platte erneut gewaschen und die Zellen mit 100 μ l sekundärer Antikörpermixtur pro Kammer für zwei Stunden bei RT inkubiert. Die folgenden Waschschriffe wurden zuerst mit Waschpuffer und danach mit PBS durchgeführt. 75 μ l Substrat F1 wurde in jede Kammer gegeben und für 20-40 Minuten ohne direktes Licht bei RT inkubiert, bis eine Rosafärbung sichtbar wurde. Danach wurden 75 μ l Substrat F2 in jede Kammer pipettiert und die Platte für 20-40 Minuten abgedunkelt bei RT inkubiert.

Die Fluoreszenzmessung am Photometer erfolgte bei einem Anregungslicht von 540 nm und einer Emission von 600 nm, um die Menge an HIF-1 α zu ermitteln. Die Anregung bei 360 nm und anschließende Messung der Emission bei 450 nm wurde zur Bestimmung der Cytochrom C- Menge in den Proben durchgeführt. Die Menge an Cytochrom C einer jeden Probe wurde zur Normalisierung der HIF-1 α -Werte herangezogen.

ELISA zur Quantifizierung des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

Zum Nachweis von VEGF wurde ein ELISA-KIT der Firma CUSABIO verwendet. Entsprechend des mitgelieferten Protokolls wurden die Reagenzien vorbereitet. Es erfolgte ein Sandwich-ELISA, was bedeutet, dass 100 µl der Standardreihe und der Proteinlysate in die Kammern einer mit Antikörper auf das zu untersuchende Antigen vorbehandelten 96 *well* Mikrotiterplatte pipettiert und zwei Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Die Flüssigkeit aus den Kammern wurde ohne zu waschen entfernt und durch 100 µl Biotin-Antikörper ersetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Kammern mehrfach mit beiliegendem Waschpuffer gewaschen und verbleibende Flüssigkeit durch Schläge gegen saubere Tücher entfernt. Je Kammer wurden 100 µl Meerrettich-Peroxidase-Avidin-Antikörper, welche sich gegen den Biotin-Antikörper richteten, hinzugegeben. Nach erneuten Waschschritten wurden 90 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat hinzugegeben, bis sich nach circa 1 h Inkubation bei 37°C eine Blaufärbung zeigte.

Um die Reaktion abzustoppen, wurden 50 µl Stopplösung pro Kammer hinzugegeben, woraufhin eine Gelbfärbung eintrat. Innerhalb von 5 Minuten wurde in einem Photometer die optische Dichte bei 450 nm, 540 nm und 570 nm gemessen.

Zur Auswertung musste man nun die 450 nm-Messergebnisse von den 540 nm- bzw. den 570 nm-Messergebnissen abziehen, worauf die plattenbezogenen Messungenaugkeiten ausgeglichen wurden.

3.2.11.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*))

Zur Herstellung von 20 X Tris-Acetat-Laufpuffer (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, USA) wurden 50 ml des 20 X Tris-Acetat-Laufpuffers mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt.

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, die bei der Auftrennung von Proteinen in einer Matrix, bestehend aus Polyacrylamid, Verwendung findet. Das ursprüngliche Verfahren basiert auf einer Methode, die von Laemmli entwickelt worden ist (Laemmli, 1970). Durch Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) wird die Eigenladung der Proteine überdeckt (1,4 g SDS/g Protein), so dass die Proteine eine konstante negative Ladung aufweisen. Durch Aufkochen der Proteine werden diese zusätzlich linearisiert. Werden die negativ geladenen Proteine in ein engporiges Gel gefüllt und an eine Spannungsquelle angeschlossen, ermöglicht dies ihre Auftrennung nach der Molekülmasse. Entsprechend ihrer Ladung und Größe trennen sie sich im elektrischen Feld in einzelne Banden auf.

Entsprechend der zu erwartenden Proteine wurde ein 7% Tris-Acetat-Gel gewählt, um im Zielbereich der Banden eine höchstmögliche Auflösung zu erhalten.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Proben. x entsprechend der bestimmten Konzentration.

Probe (µl)	10
Lysat (µl)	x
LDS Sample Buffer 4X (µl)	2,5
NuPAGE Reducing Agent 10X (µl)	1
Deionisiertes H ₂ O (µl)	auffüllen bis 10

Proben vorbereiten

Die Proteinlysate wurden für die SDS-PAGE vorbereitet und zur Denaturierung 10 Minuten bei 70°C in einem Thermomixer erhitzt. Anschließend wurden sie direkt wieder auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte in einer XCESS Surelock Elektrophoresekammer (Life Technologies, Carlsbad, USA) unter Verwendung eines 7 prozentigen Tris-Acetat-Gels. Die obere (innere) Kammer wurde mit 200 ml Laufpuffer + 500 µl NuPAGE Antioxidant, die untere (äußere) Kammer mit 600 ml Laufpuffer befüllt. Zusätzlich zu den Proteinproben wurden angefärbte Proteinstandards, *Rainbow Marker* (GE Healthcare, Freiburg) und *MagicMark* (Life Technologies, Carlsbad, USA) mit aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 V für maximal 1,5 Stunden. Im Anschluss wurde direkt zum Western Blot übergegangen.



Abbildung 13: SDS-Page. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate in 7 prozentigen Tris-Acetat-Gel erfolgte bei 150 V für maximal 1,5 Stunden.

3.2.11.5 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (*Western Blot*)

Tabelle 12: Zusammensetzung des Transferpuffer 1X.

Transferpuffer 1X (ml)	500
Transferpuffer 20 X (Life Technologies, Carlsbad, USA) (ml)	25
Methanol je Membran, die in der Kammer verwendet wird (ml)	50
Deionisiertes H ₂ O (ml)	auffüllen bis 500

Vor dem Transfer wurde der Transferpuffer mit 500 µl Antioxidant versehen.

Tabelle 13: Zusammensetzung von TBS 5X.

TBS 5X	500
Tris-HCl 2 M (ml)	125
NaCl 5 M (ml)	150
KCl (ml)	4,2

Tabelle 14: Zusammensetzung von 0,1% TBS-T.

TBS-T 0,1 % (L)	1
TBS 1X (L)	1
Tween (%)	1

Tabelle 15: Zusammensetzung von 5% (w/v) Milch-Blockpuffer.

5% (w/v) Milch-Blockpuffer (ml)	50
0,1% TBS-T (ml)	50
Milchpulver (%)	5

Die Prozedur des elektrophoretischen Blottens auf eine Nitrocellulosemembran wurde bereits 1979 beschrieben (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Hierbei werden die in der SDS-PAGE aufgespaltenen Proteine auf eine Membran übertragen und stehen damit für weitere immunologische Bestimmungen zur Verfügung.

Das im SDS-PAGE verwendete Gel wurde in der Westernblotkammer mit den befeuchteten Whatman-Filterpapieren, Schwämmen und der Nitrocellulosemembran zusammengebaut. Dies geschah unter Wässerung mit SDS-Transferpuffer.

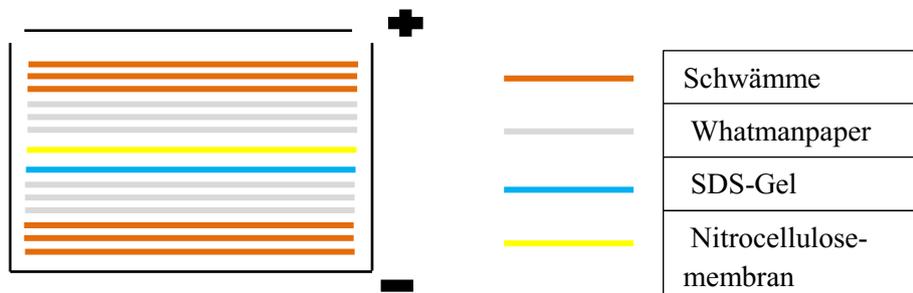


Abbildung 14: Western Blot. Schematische Darstellung der Beladung der Westernblotkammer.

Nach dem Entfernen von Luftblasen wurde die Kammer eingespannt und die innere Transferkammer mit 200 ml Transferpuffer (mit 500 μ l NuPAGE Antioxidant) gefüllt. Für die äußere Kammer wurde vollentsalztes Wasser verwendet. Der Transfer erfolgte bei 30 V für 1 Stunde.

3.2.11.6 Immunochemische Detektion

Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5% (w/v) Milch-Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Entsprechend der Fragestellung wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper, der vor Gebrauch in 5% (w/v) Milch-Blockpuffer verdünnt worden war, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem Antikörper gegen α -Tubulin fand über Nacht bei 4°C in einer Glasküvette auf einem Orbitalshaker statt. Für die restlichen Inkubationen wurde der Boden einer Petrischale mit Parafilm (Brand) bedeckt und mit 2 ml der Primärantikörper-Verdünnung versehen. Die 8,3 cm x 7,3 cm große Nitrocellulosemembran wurde mit der Proteinseite auf die Primärantikörperverdünnung gelegt. Ein kleiner Streifen Whatman-Filterpapier wurde mit H₂O befeuchtet im Deckel der Schale befestigt. Nach der Primärantikörperinkubation wurde die Membran 3x15 Minuten mit 0,1% TBS-T bei RT auf dem Orbitalshaker gewaschen, bevor sie mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase (*horse-radish-peroxidase*-(HRP-)) konjugierten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Orbitalshaker behandelt wurde. Im nächsten Schritt wurde die Membran erneut 4x15 Minuten bei RT auf dem Shaker gewaschen. Zur Darstellung der auf der Membran immobilisierten Proteine wurde die Membran mit der Chemilumineszenzreagenz *Super Signal West Femto* (Thermo Scientific) behandelt, so dass sich die Meerrettichperoxidase nachweisen ließ. Die Oxidationsreaktion konnte mittels anschließender Lichtmessung im ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare) nachgewiesen werden. Der Nachweis von α -Tubulin diente in den Western Blots als Gleichladungskontrolle.

3.2.11.7 Entfernung eines Antikörpers von einer Nitrocellulosemembran (Stripping)

Tabelle 16: Zusammensetzung von Strippingpuffer 1X.

Strippingpuffer 1X (ml)	500
SDS (ml)	50
Tris-HCl 1 M (ml)	31,25
Deionisiertes H ₂ O (ml)	auffüllen bis 500

Das *Stripping* erlaubt die Entfernung des Primärantikörpers von der Membran und ihre erneute Verwendung für die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper. Hierzu wurden 49 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) frisch zu 7 ml des erstellten Strippingpuffers hinzugegeben. Diese Mischung wurde direkt auf die ursprünglich behandelte Membran gegeben und für 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Nachdem sich der Primärantikörper gelöst hatte, wurde diese 3 x mit TBS gewaschen und anschließend erneut 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt, bevor sie erneut mit einem Primärantikörper inkubiert werden konnte.

3.2.12 Nukleinsäure-Analyseverfahren

3.2.12.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA aus den behandelten Zellpellets wurde das Reagenz TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, USA) verwendet. Das Protokoll basiert auf der AGPC-Methode (Guanidinsäure-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (*Acid Guanidinum Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*)) (Chomczynski & Sacchi, 1987). Alle Schritte erfolgten unter einem Abzug. Zudem wurden ausschließlich gestopfte Spitzen so wie RNase-freie Reaktionsgefäße und Handschuhe verwendet.

Pro Pellet, welches zuvor auf Eis gelagert worden war, erfolgte die Zugabe von 1ml TRIzol, einer Phenol-Isothiocyanat-Mischung, 200 µl Chloroform und 50 µl RNase-freiem Wasser. Nach mehrfachem Schütteln, dreiminütiger Inkubation bei RT, und 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000 g entstanden zwei Phasen, wobei in der oberen wässrigen Phase die RNA gelöst war und in der

unteren restliche Proteinstrukturen und DNA. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt, was die RNA ausfallen ließ. Nach erneuter 10-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 4°C und 12000 g für 10 Minuten war ein RNA-Pellet sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 75 prozentigem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert, bei 4°C und 7500 g für 5 Minuten. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet offen und nur mit einem fusselreien Tuch abgedeckt bei 37°C in einem Thermomixer (Eppendorf) gehalten, bis das Pellet vollständig getrocknet war. Dieses wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Nach Messung der RNA-Konzentration im NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) wurde die RNA zur cDNA-Synthese verwendet oder bei -80°C eingefroren.

3.2.12.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im NanoDrop 1000, beruhend auf dem Lambert-Beer'schen-Gesetz. λ der Nukleinsäuren entspricht einer OD bei 260 nm und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Beurteilung der Reinheit der RNA-Proben erfolgte über das Verhältnis OD260/OD280. Nur ab einem Wert >1,85 (Idealwert 2) wurden die Proben zur cDNA-Synthese verwendet.

$$E_{\lambda} = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot l$$

Abbildung 15: Lambert-Beer'sches Gesetz. (E: Extinktion, I1: Intensität des transmittierten Lichts, I0: Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichts, c: Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit (mol·l⁻¹), ϵ : dekadischer Extinktionskoeffizient (oft auch als spektraler Absorptionskoeffizient bezeichnet) bei der Wellenlänge λ , l: Schichtdicke der verwendeten Küvette)

3.2.12.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die cDNA-Synthese aus RNA stand das *QuantiTect Reverse Transkriptions Kit* (Quiagen) zur Verfügung. Es besteht aus zwei Grundsritten, der Elimination von genomischer DNA (gDNA) und der Umschreibung von mRNA in cDNA.

Abhängig von der RNA-Konzentration wurden für die cDNA-Synthese zwischen 10 pg und 1 µg RNA, standardmäßig 100 ng eingesetzt. Die auf Eis gelagerte RNA-Probe wurde zusammen mit Wasser und gDNA-Eliminationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 14 µl gebracht.

Tabelle 17: Vorbereitung der RNA-Proben. X=entsprechend gewünschter Konzentration.

RNA-Proben-Gemisch (µl)	14
gDNA-Eliminationspuffer (µl)	2
Proben-RNA (µg)	x
RNase-freies Wasser (µl)	auffüllen bis 14

Der Reaktionsansatz wurde 2 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend wieder auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde für sämtliche Proben eine cDNA-Synthese-Hauptmischung erstellt.

Tabelle 18: Zusammensetzung cDNA-Synthese-Hauptmischung 1n.

cDNA-Synthese-Hauptmischung 1n (µl)	20
Reverse-Transkriptase (µl)	1
Reverse-Transkriptasepuffer 5X (µl)	4
Reverse-Transkriptase Primermischung (µl)	1
ProbenRNA	14

Es folgten zwei Inkubationsschritte.

1. 15 Minuten bei 42°C
2. 3 Minuten bei 95°C

Nach diesem Schritt konnte die Konzentration der cDNA mittels NanoDrop gemessen, mit der *real-time-PCR* fortgefahren oder die Proben bei -80°C eingefroren werden.

3.2.12.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time-PCR)

Die Quantitative-Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ist die Weiterentwicklung der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion, bei der eine fluoreszenzbasierte Endzeitdetektion durchgeführt wird (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time*-PCR) hingegen basiert auf der Fluoreszenzdetektion während der Amplifikationsphase der PCR (Lee, Connell, & Bloch, 1993; Livak, Flood, Marmaro, Giusti, & Deetz, 1995).

Die *real-time*-PCR wurde mit den Reagenzien und nach dem Taqman-Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt (Holland, Abramson, Watson, & Gelfand, 1991). Hierbei wird die DNA Polymerase des *Thermus aquaticus* (thermophiles gramnegatives Bakterium) verwendet. Dieses Bakterium lebt bei einer Umgebung von heißen Wasserquellen. Durch die Thermostabilität der Polymerase ist diese ideal in der Verwendung bei den Annealingprozessen der PCR. Je mehr Matrizen-DNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig, um den Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Dieser Punkt wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) definiert und befindet sich immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Für die *real-time*-PCR wurde die im vorherigen Kapitel erstellte cDNA verwendet. Die PCR wurde für jede Probe in Dreifachbestimmung in einer 96 *well* Mikrotiterplatte durchgeführt. Die verwendeten Primer bezogen sich auf die 18S-DNA als Standard zur späteren Verrechnung und die zu untersuchenden HIF-1 α - und VEGF-DNA. 18S wurde als Teil der ribosomalen Untereinheit zum *Housekeeper* gewählt, da hier eine große Stabilität gegenüber den zu erwartenden Genregulationsprozessen aufgewiesen wird und es im Labor ebenfalls etabliert ist. Pro Primer mussten die 9 Proben (FCS, Basalplasma und Postexpositionsplasma für die Zeiteinheiten 0 h, 4 h, 24 h) und eine Kontrolle (NTC-*no template control*) aufgetragen werden. Hierzu wurden entsprechend der cDNA-Konzentrationsbestimmung die Proben auf 100 ng/4 μ l gebracht. Dann wurde entsprechend der folgenden Tabelle eine PCR Reaktionsmischung erstellt.

Tabelle 19: Zusammensetzung der PCR Reaktionsmischung.

<u>PCR Reaktionsmischung (µl)</u>	<u>16</u>
Genexpressionsassay 20X (µl)	1
Genexpressionshauptmischung 2X	10
Wasser (µl)	5

Diese Mischung wurde je 4 µl Probe in die entsprechende Kammer der Platte hinzugegeben.

Die Platte wurde daraufhin mit einer Folie versiegelt und für 30 Sekunden bei 1000 g abzentrifugiert, bis alle Luftblasen zerstört waren. Im Anschluss wurde die Platte in das *7500 Fast Real-Time PCR System* eingeführt.

Die Amplifikation der cDNA erfolgte nach dem Programm der Initialen Denaturierung 2 Minuten bei 50°C, 10 Minuten bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen je 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei 60°C.

Nach dem Programmablauf und der manuellen Anpassung des Schwellenwertes, um die Hintergrundaktivität auszublenden, konnte die relative Genexpression mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ermittelt werden.

Zur Berechnung mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode:

$$\text{CT-Wert (behandelt)} - \text{CT-Wert (Standard)} = \text{dCT}$$

$$\text{dCT (behandelte Probe)} - \text{dCT (unbehandelte Probe/Zeiteinheit)} = \text{ddCT}$$

Dieser Wert wurde dann in die Formel n-fache Expression $2^{-n(\text{ddCT})}$ eingefügt und die Veränderungen der Genexpression konnten vergleichend für die einzelnen Zeitpunkte ermittelt werden.

3.2.13 Viabilitätstest/Mitochondrienaktivitätstest

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT)-Test

Um den Einfluss von mit Blutplasma versetztem Endothelzellmedium auf die Lebensfähigkeit der HUVEC zu ermitteln, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Dieser beruht auf dem Nachweis des aus 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid reduzierten Formazans. Diese Reduktion in Anwesenheit von NADH und NADPH wird ermöglicht durch mitochondriale Enzyme und ist somit abhängig von lebenden Zellen. Je mehr blau-violette Formazankristalle nachweisbar sind, desto mehr Zellen leben (Berridge & Tan, 1993; Hansen, Nielsen, & Berg, 1989; Mosmann, 1983).

Für diesen Versuch wurden auf drei 24 well Platten 3×10^5 HUVEC/Kammer ausgebracht. Die Zellen wurden anschließend mit a) Basismedium + 2% FCS 56°C, b) Basismedium + 10% FCS 56°C, c) Basismedium + 10% Basalplasma, d) Basismedium + 10% Postexpositionsplasma und e) Basismedium + 2% FCS 56°C + 200 μM H_2O_2 für 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h behandelt. Zusätzlich wurden HUVEC mit Basismedium + 2% FCS 56°C + 2 mM H_2O_2 für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen 1 fach mit PBS gewaschen. Zur Vorbereitung der MTT-Lösung wurden MTT (5 mg/ml in PBS) in EBM (0%-Medium) 1:10 verdünnt (entspricht 3,75 ml MTT und 33,75 ml EBM) und die Zellen mit 500 μl /Kammer dieser Lösung inkubiert. Dann wurde gewartet bis eine Blaufärbung auftrat (>1 Stunde). Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und die Reaktion durch Zugabe von 100 μl DMSO/Kammer abgestoppt. Die Proben wurden in eine 96 well Platte umpipettiert und die Absorption im Photometer bei 570 nm gemessen. Je Behandlungszeitpunkt konnte so die prozentuale Zellüberlebensrate bestimmt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Kein Einfluss von Plasma und (-)-Epicatechin auf die Zellviabilität und Proliferation

Die Kernhypothese dieser Arbeit behandelt die Wirkung von Flavanolen und deren zirkulierende Metabolite auf Gefäßzellen. Da diese Metabolite kommerziell nicht zur Verfügung stehen, wurden Inkubationsversuche mit Postexpositions- und Kontrollplasma von Probanden aus klinischen Studien durchgeführt. Auf Grund möglicher Plasmatoxizität auf kultivierte Zellen und um hierbei valide Ergebnisse in den weiteren Untersuchungen zu erhalten, wurde zunächst eine Toxizitätstestung des Kontrollmediums (Basismedium mit 2% FCS-Zusatz) gegenüber dem Basismedium mit Plasma-Zusatz durchgeführt.

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test untersucht. Bei diesem Test wird der Umsatz von Formazan gemessen, welches als blau-violette Kristallform nachweisbar ist. Durch die Abhängigkeit von mitochondrialen Enzymen in dieser Reduktion zur Herstellung des Formazans können Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Mitochondrien gezogen werden. Somit stellt der MTT-Test eine indirekte Messmethode zur Aktivität der Mitochondrien und damit der Viabilität der Zellen selber dar.

Zunächst wurde der Einfluss der in den späteren experimentellen Bedingungen eingesetzten Lösungen mit unterschiedlich langer Inkubationszeit auf die zelluläre Viabilität getestet. Es zeigte sich, dass die Zugabe von Basalplasma zum Basismedium keine bzw. nur geringe Auswirkungen auf die Zellviabilität hatte und im Einfluss auf die Zellen dem Kontrollmedium (Basismedium mit 2% FCS) entsprach. Bei der Zugabe des Postexpositionsplasmas zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Zellviabilität, ohne jedoch statistische Signifikanz im Vergleich zum Basalplasma und der Kontrolle zu erreichen. Die Negativkontrollprobe (2 mM H_2O_2) führte, wie erwartet, zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse somit, dass die eingesetzten Versuchsmedien unter den experimentellen Bedingungen keine relevante Toxizität aufweisen.

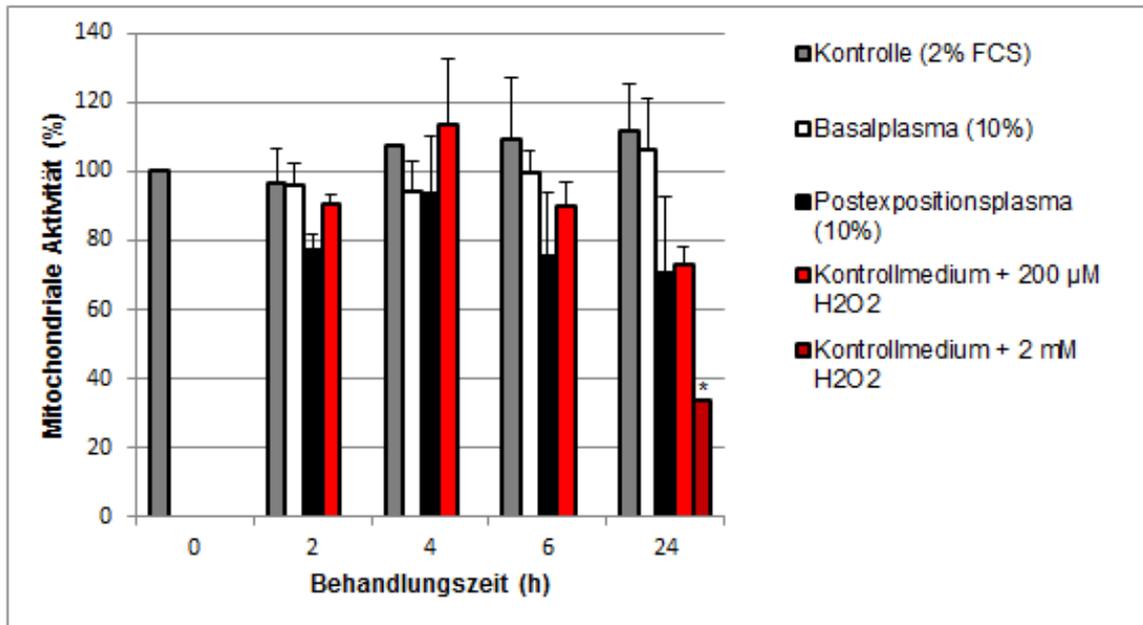


Abbildung 16: Zellviabilität unter den in den weiteren Versuchen eingesetzten experimentellen Bedingungen. Dargestellt ist der prozentuale Verlauf der Zellviabilität unter verschiedenen Medienzusätzen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung. Unter Zugabe von Basalplasma kommt es zu keiner signifikanten Differenz in Bezug auf das Kontrollmedium vom Startzeitpunkt bis zum Ende der Behandlung. Bei der Zugabe von Postexpositionsplasma zeigt sich eine Abnahme der Zellviabilität, diese ist aber weder signifikant noch im Bereich der entsprechenden Negativkontrolle durch H₂O₂. Hieraus ergibt sich keine ausschließende Toxizität durch Plasmazusätze für Versuche in Kulturmedien. (*p<0,05 vs. Kontrolle in Kulturmedium zum gleichen Zeitpunkt) (MW±SEM)

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit (-)-Epicatechin einen Einfluss auf Zellproliferation gemessen als BrdU-Inkorporation hat. Die Positivkontrolle (VEGF 50 ng/ml) hatte sowohl in CACs als auch in HUVECs zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation über 24 Stunden geführt. Die Inkubation von (-)-Epicatechin im physiologischen Bereich von 1 bis 1.000 ng/l hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation (Abbildung 4.2 a/b).

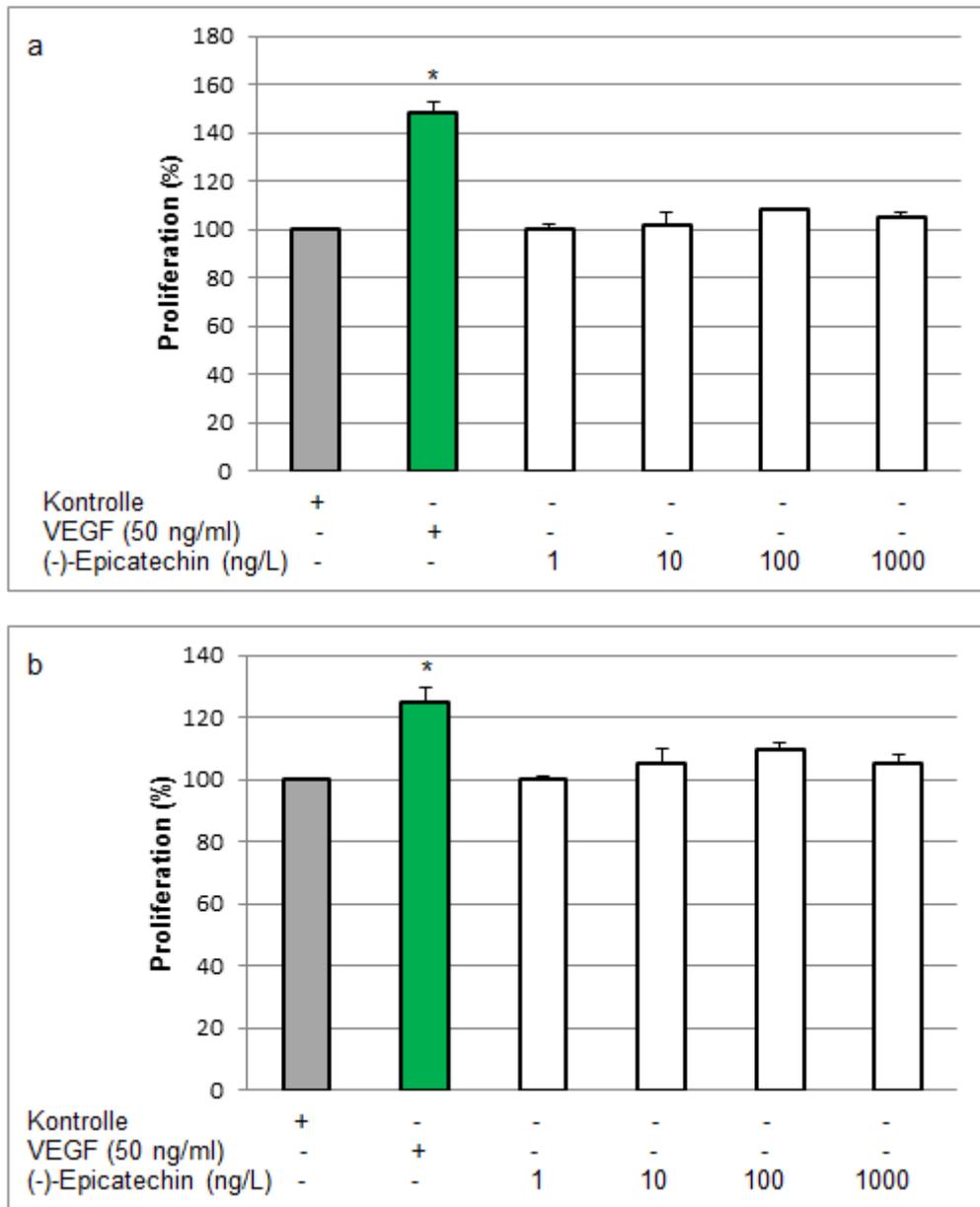


Abbildung 17: Einfluss von (-)-Epicatechin auf die zelluläre Proliferation in HUVECs (a) und CACs (b) durch BrdU Assay in 24 Stunden. Dargestellt ist die prozentuale Proliferationsrate in Bezug auf die Kontrolle ohne Zusätze. Übereinstimmende Proliferation von (-)-Epicatechin-Proben und Kontrollgruppe bei entsprechenden Positivkontrollen durch VEGF. Kein Einfluss von (-)-Epicatechin auf die Proliferation. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle ohne Zusätze) (MW \pm SEM)

4.2 Dosisabhängige Stimulation der NOS-abhängigen Migration von Endothel- und zirkulierenden proangiogenetischen Zellen durch (-)-Epicatechin

Um den Einfluss von (-)-Epicatechin auf die zelluläre Migration zu untersuchen, wurden CACs und HUVECs mit ansteigenden Konzentrationen von (-)-Epicatechin (1-1.000 ng/l) inkubiert und sowohl die ungerichtete Zellmigration (Chemokinese) als auch die gerichtete Zellmigration auf VEGF hin (Chemotaxis) in Boyden Kammern untersucht. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung sowohl der Chemokinese mit einem signifikanten Maximum bei HUVECs von 50 ng/l und CACs von 10 ng/l als auch der Chemotaxis mit einem Maximum von 10 ng/l bei beiden Zellarten (Abbildung 4.3). (*p<0,05)

L-NMMA als kompetitiver Inhibitor der NO-Synthase inhibierte sowohl die VEGF-Wirkung, als auch die von (-)-Epicatechin. Dies legt nahe, dass die promigratorischen Effekte von (-)-Epicatechin über einen NOS-abhängigen Mechanismus vermittelt werden.

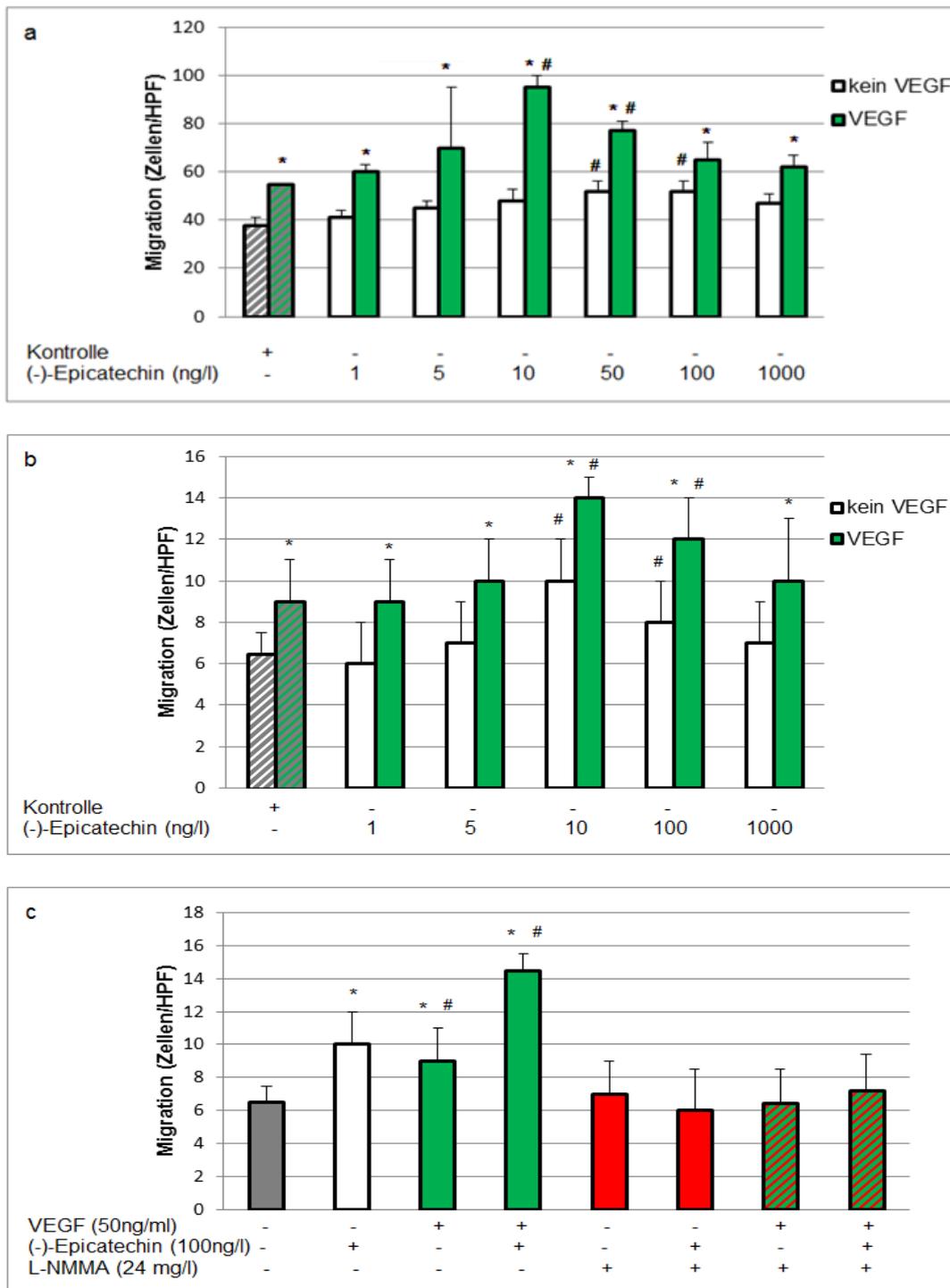


Abbildung 18: Zellmigration für HUVECs (a) und CACs (b, c) im Boyden Chamber Assay.

Dargestellt ist die Migration von HUVECs und CACs unter Gabe verschiedener Zusätze. In den VEGF-Proben wird ein signifikanter Anstieg bei allen Zelltypen deutlich. Unter Zugabe von (-)-Epicatechin zeigt sich ein Anstieg der Migration, welcher sich bei den HUVECs im Bereich von 50-100 ng/l und bei den CACs im Bereich von 10-100 ng/l darstellt. Durch Zugabe des NOS-Inhibitors L-NMMA wird dieser Effekt aufgehoben. (-)-Epicatechin steigert die NOS-abhängige Migration beider Zelltypen. (* $p < 0,05$ vs. Probe ohne VEGF (a, b) bzw. Kontrolle ohne Zusätze (c). # $p < 0,05$ vs. Kontrolle (a, b) bzw. zur Kontrolle ohne VEGF und L-NMMA) (MW \pm SEM)

4.3 Postexpositionsplasma beschleunigt den endothelialen Wundverschluss *in vitro*

Um den Einfluss von zirkulierenden Flavanolen auf die endotheliale Regeneration zu untersuchen wurde der Wundverschluss von HUVECs im *Scratch Assay* untersucht. Zunächst wurde der Einfluss von NO und der NOS auf den Wundverschluss untersucht. Es zeigt sich, dass die Zugabe des NO-Donors SNAP zu einer beschleunigten Verschlussrate im *Scratch Assay* führte, wobei es bei einer Konzentration von 0,1 μM SNAP zum schnellsten Wundverschluss kam. Der NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA führte zu einer signifikanten Verlangsamung des Wundverschlusses. Dies legt eine wichtige Rolle von NO und NOS für den endothelialen Wundverschluss nahe.

Anschließend wurde der Einfluss von Basalplasma und Postexpositionsplasma von gesunden Probanden auf den Wundverschluss untersucht. Beim Vergleich von Postexpositions- zu Basalplasma zeigte sich ein deutlich schnellerer Wundverschluss. So führte der Zusatz von 10% Postexpositionsplasma annähernd zu einer Halbierung der Verschlusszeit ($p < 0,05$). Prinzipiell lässt sich ein beschleunigter Wundverschluss entweder auf eine gesteigerte Proliferation oder Migration der Endothelzellen zurückführen. Da im Kapitel 4.1 bereits eine Proliferation durch die Kulturzusätze ausgeschlossen wurde, ist davon auszugehen, dass die Effekte hinsichtlich der beschleunigten Verschlusszeit auf eine gesteigerte Zellmigration zurückzuführen sind.

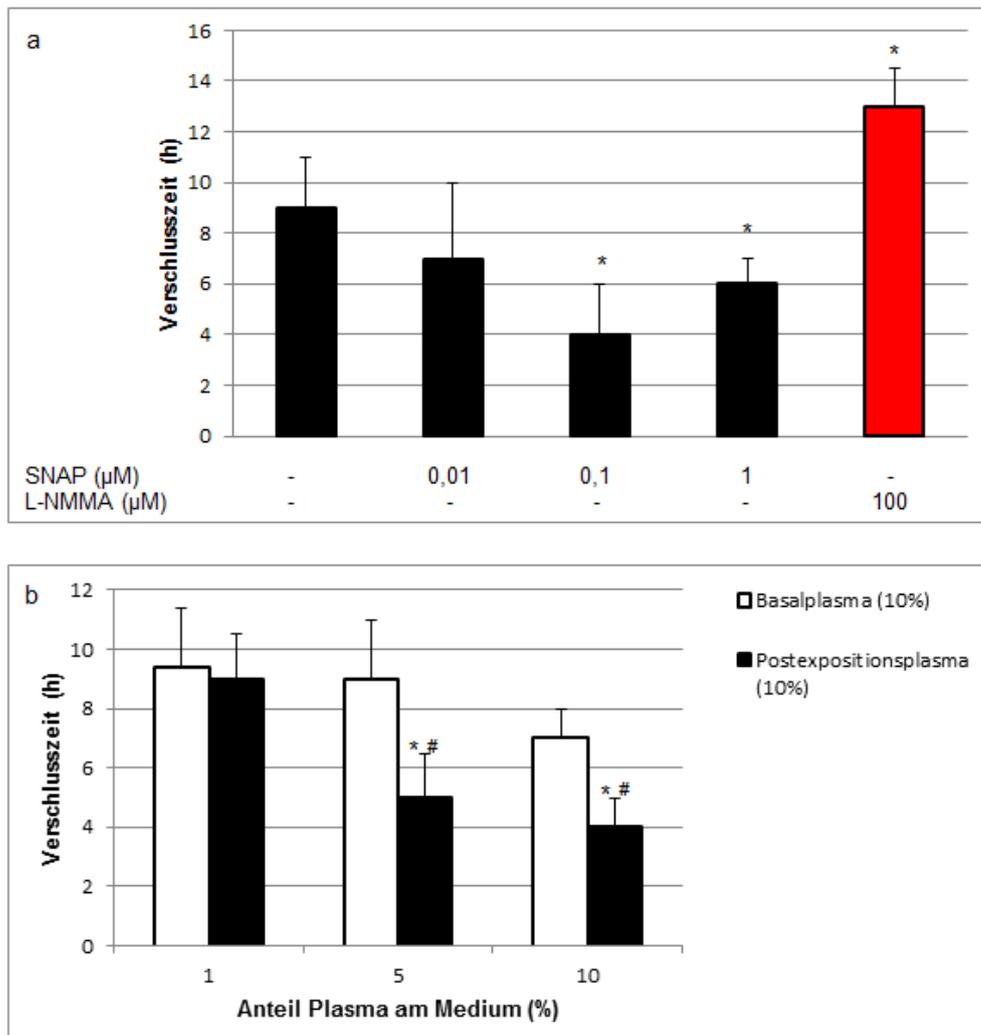


Abbildung 19: Einfluss von Postexpositionsplasma auf die Wundverschlusszeit im Scratch Assay. Dargestellt sind die Ergebnisse des NO-Scratch Assay (a) sowie des Plasma-Scratch Assay. Im Hinblick auf die NO-Abhängigkeit zeigt sich nach Zugabe des NO-Donors SNAP eine deutlich schnellere Verschlusszeit (50% der Kontrolle), während die Zugabe von NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA eine Verlängerung der Verschlusszeit (150% der Kontrolle) und somit einen gegenteiligen Effekt aufweist. Im Plasma-Scratch Assay (b), welcher die Verschlusszeiten unter Zugabe unterschiedlicher Mengen an Plasma mit zunehmender Konzentration an Epicatechinmetaboliten aufzeigt, wird deutlich, dass es unter Postexpositionsplasma zu einer signifikanten Beschleunigung der Verschlusszeit gegenüber dem Basalplasma kommt. Es zeigt sich ein dosisabhängiger beschleunigter Wundverschluss. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle ohne Zusätze (a) bzw. Basalkontrolle der gleichen Konzentration (b). # $p < 0,05$ vs. Plasmakonzentration mit 1%) (MW \pm SEM)

4.4 Postexpositionsplasma stimuliert Angiogenese, HIF-1 α und VEGF-Expression

4.4.1 Etablierung und Validierung des Tube Formation

Assays

Eine gebräuchliche Methode Angiogenese *in vitro* zu untersuchen ist das Matrigel-basierte *Tube Formation Assay*. Hierbei werden Endothelzellen auf einer ECM Matrix kultiviert und dies führt bei Endothelzellen zur Bildung von kapillären Strukturen (*Tube Formation*).

Zunächst mussten aber Etablierungsversuche durchgeführt werden. Hierbei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welches Volumen an Matrigel wird mindestens benötigt, um Langzeituntersuchungen (24 Stunden) durchführen zu können?
2. Welches Volumen muss mindestens benutzt werden, um eine Mikroskopierbarkeit zu gewährleisten?
3. Welche Mindestzellzahl wird benötigt für die Ausbildung von Kapillaren?
4. Zu welchen Zeitpunkten startet die Tube Formation bzw. schließt diese ab?
5. Welche Auswertungsschemata bieten sich an?

Getestet wurden Matrigel in den Volumina von 30, 40, 50 und 60 μl /Kammer über 24 Stunden entsprechend des Protokolls des Herstellers.

Bei geringer Matrigelmenge traten vermehrt Zellkonglomerate auf und es zeigte sich ein Meniskeneffekt durch die adhäsiven Eigenschaften der Kammerwände.

Bei höheren Konzentrationen kam es zu Problemen während der Polymerisation des Matrigels. Durch die größere Menge kam es zu Verwerfungen und Taschen, welche zu einer inhomogenen und damit schlechterer Quantifizierbarkeit der Tube Formation führte.

Für die Experimente gut beurteilbare Verhältnisse ergaben sich bei einer Konzentration von 40 μl /Kammer.

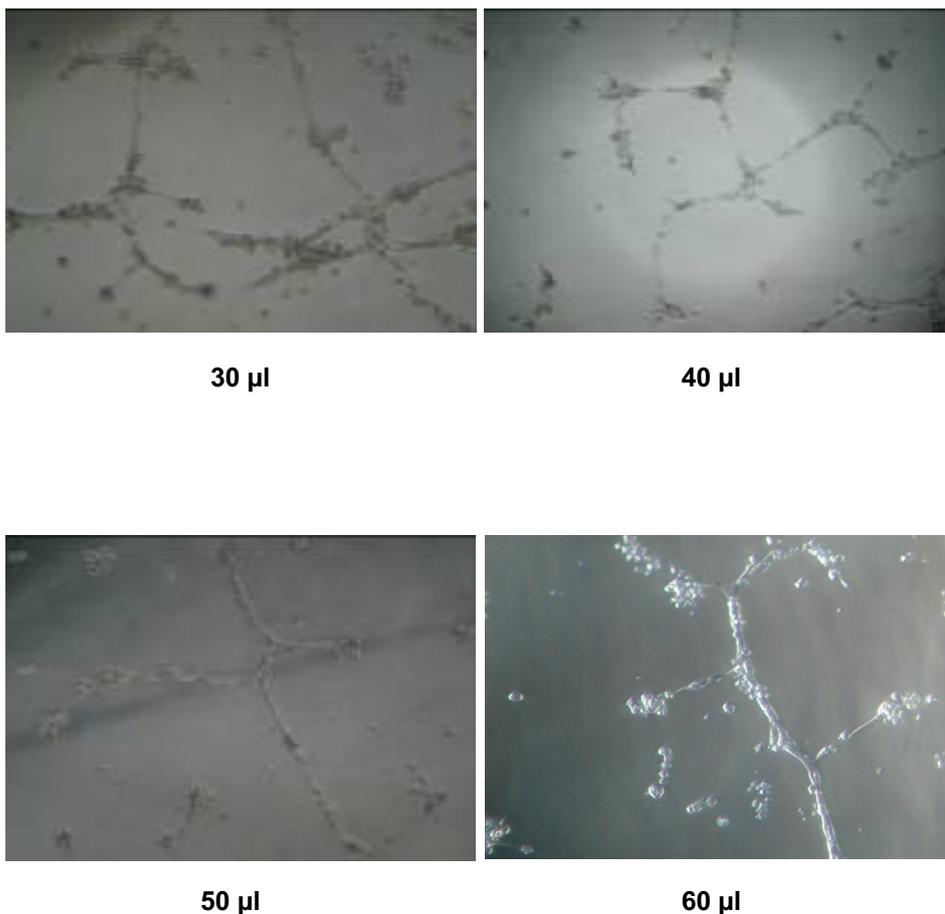


Abbildung 20: Etablierung Matrigel. Verschiedene Matrigelmengen (30/40/50/60 μl) zur Etablierung des *Tube Formation Assays*.

Getestet wurden Zellzahlen (je Matrigelvolumen) von 20.000 bzw. 40.000 Zellen/Kammer. Dies entspricht einer Zellzahl von 28.571 und 57.143 Zellen/cm².

Bei 20.000 Zellen/Kammer ergaben sich Probleme, dass die Migration teilweise ausblieb und die Zellausbreitung, das Wachstum und somit die Angiogenese stagnierten. Bei 40.000 Zellen ergaben sich diese Probleme nicht und es kam rasch zu einer Migration mit anschließender, gut beurteilbarer Tube Formation.



28571 Zellen/cm²
(20000 Zellen/ Kammer)



57143 Zellen/cm²
(40000 Zellen/Kammer)

Abbildung 21: Zellzahltestung. Verschiedene Zellzahlkonzentrationen/Kammer zur Etablierung des *Tube Formation Assays*.

Entsprechend der gängigen Literatur und üblich genutzten Assays wurden Zeiträume von 6 bis 20 bzw. 12 bis 24 Stunden beschrieben, in denen die Angiogenese abgeschlossen sei (Arnaoutova, George, Kleinman, & Benton, 2009; Kubota et al., 1988). Aus diesem Grund wurden Aufnahmen zum Zeitpunkt des Absetzens der Zellen, im Beginn und am Ende der Angiogenese angestrebt. Es wurden Aufnahmen über 24 Stunden angefertigt. Hierbei zeigten sich die besten Verhältnisse bei den in Abbildung 4.7 beschriebenen Zeitpunkten.

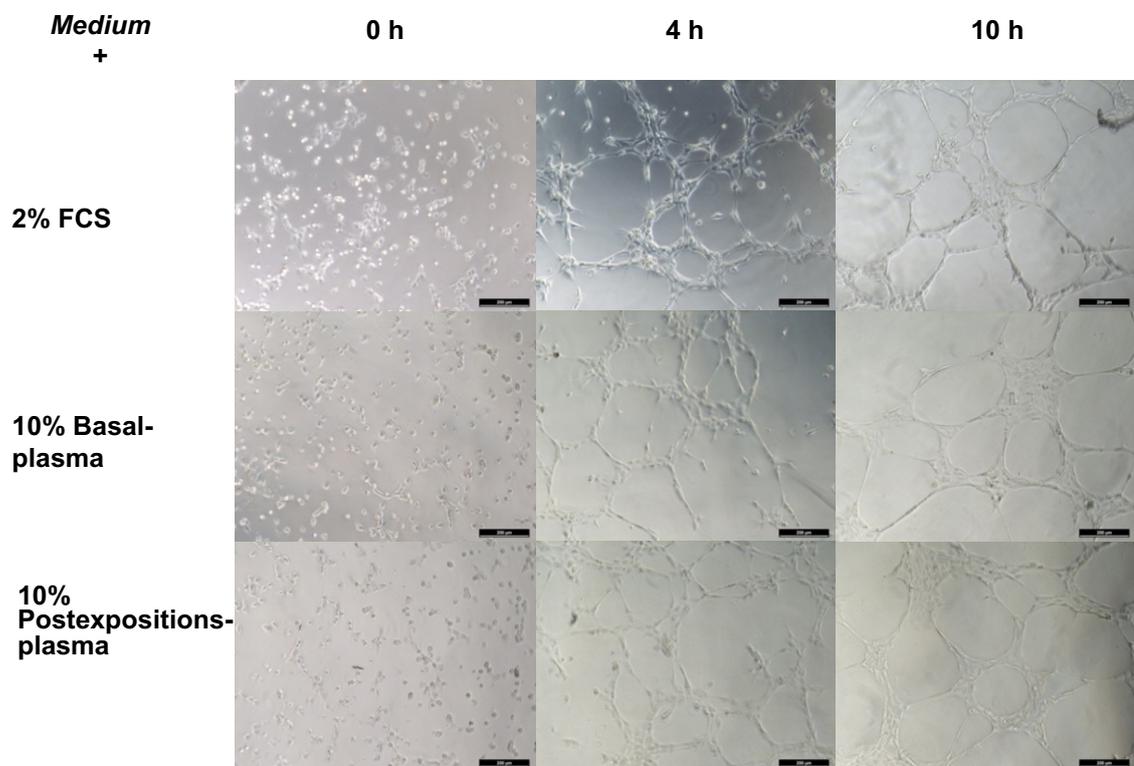
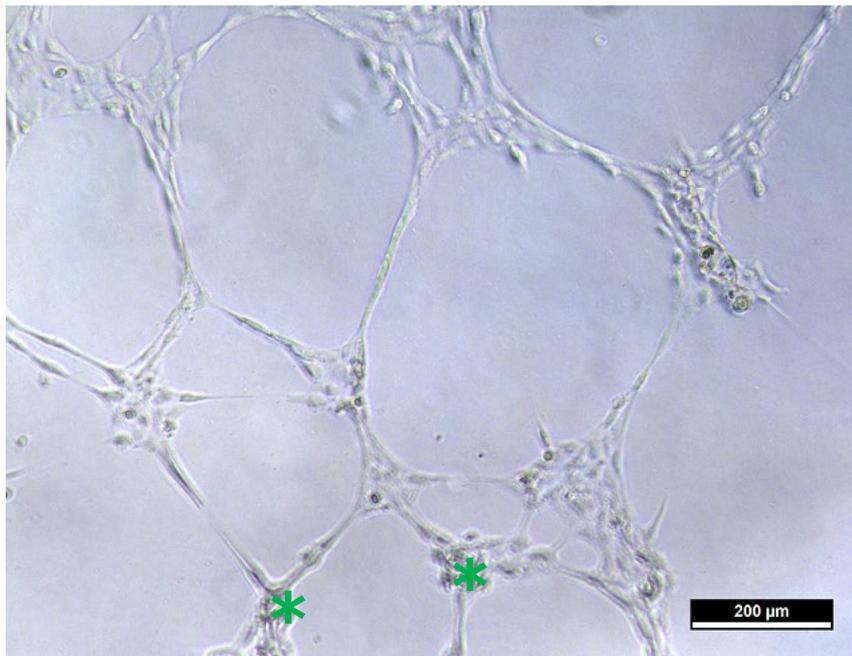


Abbildung 22: Etablierung Zeitpunkte der Tube Formation. Nach Testung über den gesamten Zeitraum von 0 bis 10 Stunden zeigten sich die oben genannten Zeitpunkte bei allen Zusätzen als entsprechend dem Absetzen der Zellen (0 h), dem Beginn der *Tube Formation* (4 h) sowie dem Abschluss der *Tube Formation* (10 h).

Anschließend wurden einzelne Charakteristika der *Tube Formation*, welche potentiell als Auswertkriterien zur Quantifizierung der *tubes* dienen könnten, einschließlich *loops*, *branches* sowie Anzahl und Areal der *tubes* verglichen. Unter der Annahme, dass NO ein zentrales endotheliales Signalmolekül im Rahmen der Angiogenese darstellt, wurde getestet, welches dieser Charakteristika durch Inhibition der NO-Synthase beeinflusst wird und somit als Auswertkriterium dienen kann. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl der *branches* (Verzweigungen) durch NOS-Inhibition relevant vermindert wurde und somit der Quantifizierung der NOS-abhängigen Angiogenese dienen könnte.



* Branches

Abbildung 23: Darstellung der angewandten Auswertungskriterien (*branches*). Nach Testung verschiedener Auswertungskriterien zeigten sich bei Ausstattung des Labors die Anzahl der Abzweigungen (*branches*) als einheitlich am besten durchführbar.

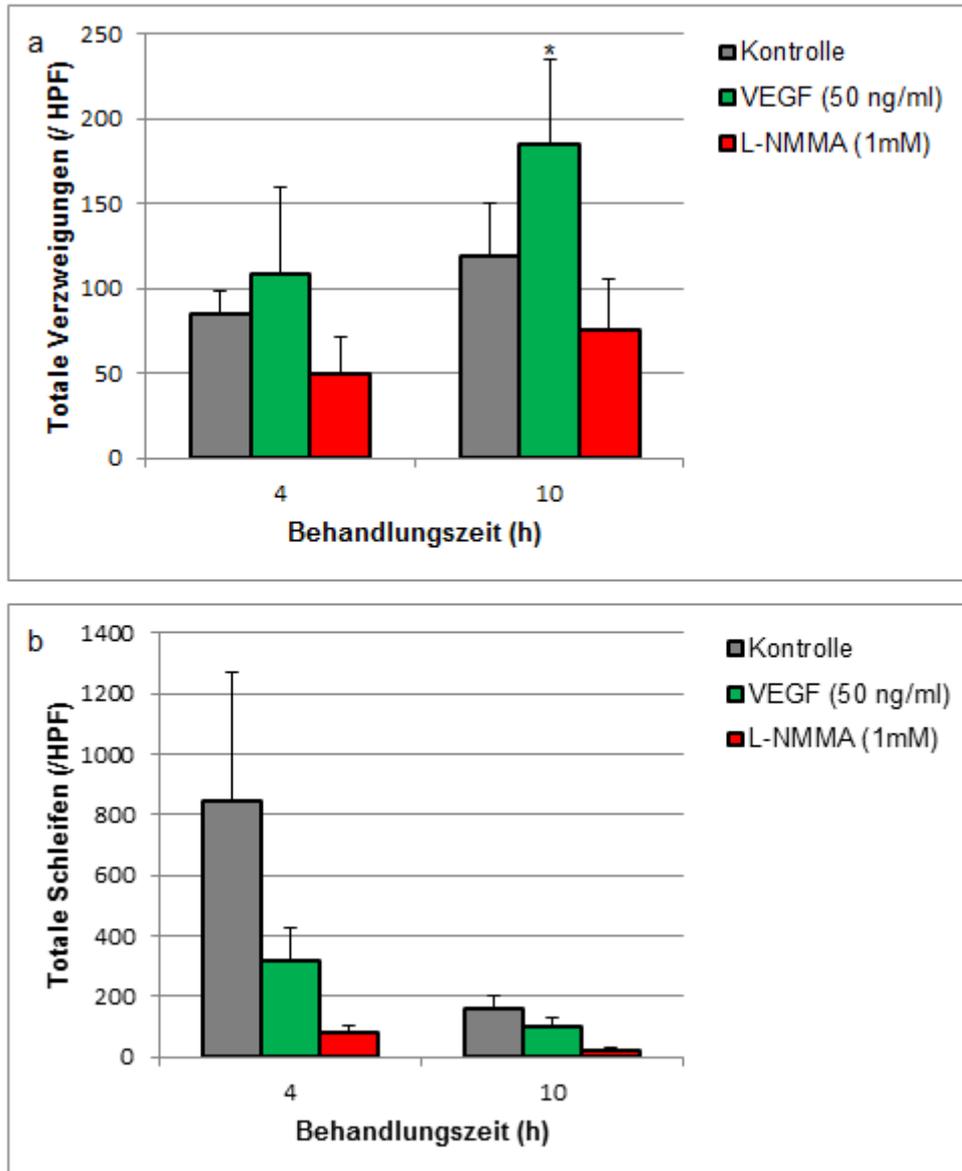


Abbildung 24: Darstellung der Auswertungskriterien der *Tube Formation*. Nach Testung verschiedener Auswertungskriterien zeigten sich die Anzahl der Abzweigungen (*branches*)(a) als einheitlich am besten durchführbar bei funktionierenden Kontrollen. Die *loops* (b) zeigen weder zu erwartende Reaktion auf VEGF, noch Signifikanzen. (* $<0,05$ vs. Kontrollmedium) (MW \pm SEM)

4.4.2 Stimulation der Angiogenese durch Postexpositionsplasma

Um den Einfluss von zirkulierenden Flavanolen auf die Angiogenesekapazität von Endothelzellen zu untersuchen, wurden HUVECs unter Zugabe von Basal- und Postexpositionsplasma im adaptierten *Tube Formation Assay* unter dem Kriterium der Bildung von Verzweigungen (*branches*) als NOS-abhängiges Angiogenesecharakteristikum untersucht. Während sich die Basalplasmaproben in den Experimentalbedingungen ähnlich der normalen Kulturprobe zeigten, wiesen die Proben mit Zugabe von Postexpositionsplasma schon ab Beginn der Angiogenese vermehrt Verzweigungen im Vergleich zum Basalplasma auf. Die anfängliche marginale Differenz zwischen beiden Proben bei circa 10% steigerte sich über die Zeit der Angiogenese auf bis zu 40% im Endpunkt und stellt sich durchgängig signifikant dar ($p < 0,05$). Zugleich entsprachen die Postexpositionsplasmaproben durchgängig in etwa den VEGF-Positivkontrollen. Zusammenfassend legen die Experimente nahe, dass Postexpositionsplasma die Angiogenese von Endothelzellen *in vitro* stimuliert.

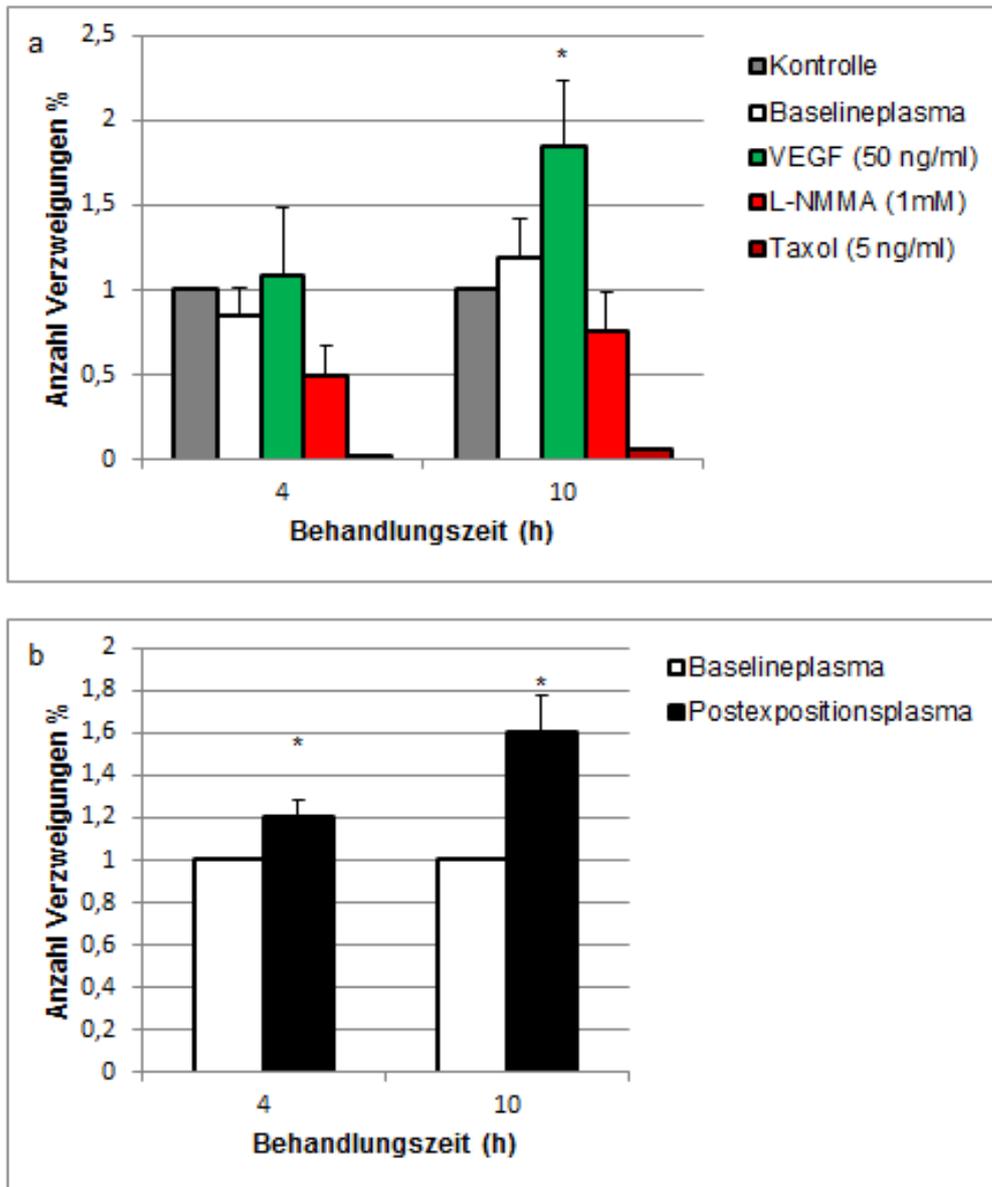


Abbildung 25: Einfluss von Postexpositionsplasma auf die Angiogenesekapazität von HUVECs. Dargestellt sind die Ergebnisse der *Tube Formation*. Die Experimentalbedingungen zeigen, dass es zwischen normalem Kulturmedium und Basalplasma nur geringe Unterschiede gibt. Die Positivkontrolle durch VEGF und Negativkontrollen durch L-NMMA als Inhibitor der NO-Synthase sowie Taxol als Zytoskelett-Inhibitor zeigen die erwartete Wirkung, welche sich über die Zeit verstärkt. Die Untersuchung von Basal- vs. Postexpositionsplasma (b) zeigt schon zu Beginn eine deutliche Differenz, welche sich durchgängig signifikant darstellt. (#<p 0,05 vs. Kontrollmedium; *<0,05 vs. Basalplasma) (MW±SEM)

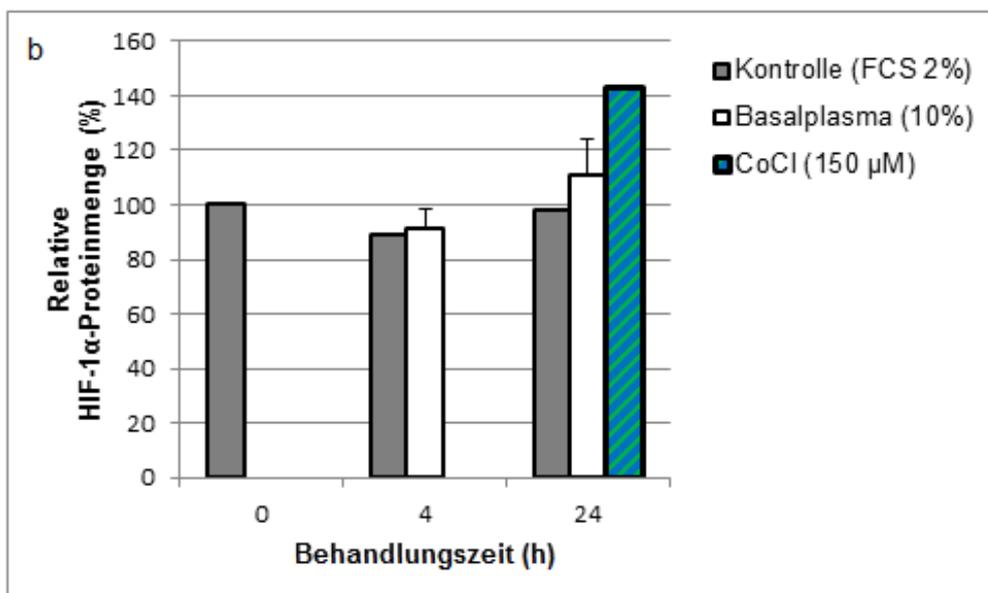
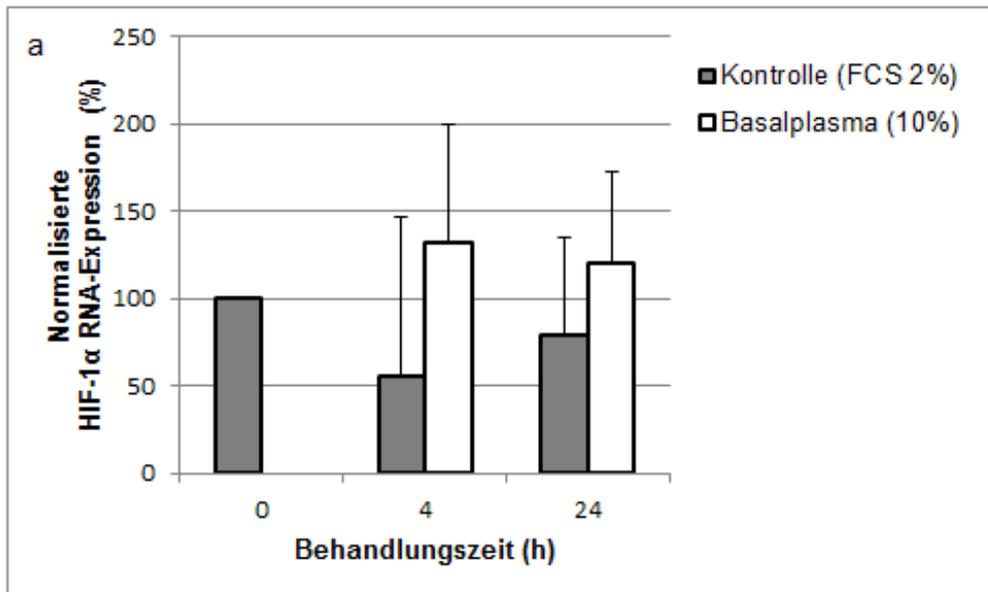
4.4.3 Postexpositionsplasma stimuliert das Proteinlevel von HIF-1 α

Des Weiteren wurde der Einfluss von Postexpositionplasma auf den Transkriptionsfaktor HIF-1 α als zentralen Angiogenesesignalweg untersucht.

Basalplasma hatte im Vergleich zum Kontrollmedium keinen signifikanten Einfluss auf beiden Ebenen. Nach 4 Stunden in der mRNA-Untersuchung und nach 24 Stunden in der Protein-Untersuchung zeigte sich im Vergleich ein höherer HIF-1 α -Umsatz, dieser erreichte jedoch kein signifikantes Niveau.

Eine Positivkontrolle auf Proteinebene erfolgte mit dem chemischen Hypoxieinduktor Kobaldchlorid.

Die Kultur von HUVECs mit Postexpositionsplasma im Vergleich zum Basalplasma hatte keinen Einfluss auf HIF-1 α -mRNA-Expression, führte jedoch zu einer signifikant höheren Proteinkonzentration nach 24 Stunden ($p < 0,05$) (Abbildung 4.10). Dies legt nahe, dass zirkulierende Flavanole die HIF-1 α -Expression auf Proteinebene hypoxieunabhängig steigern können.



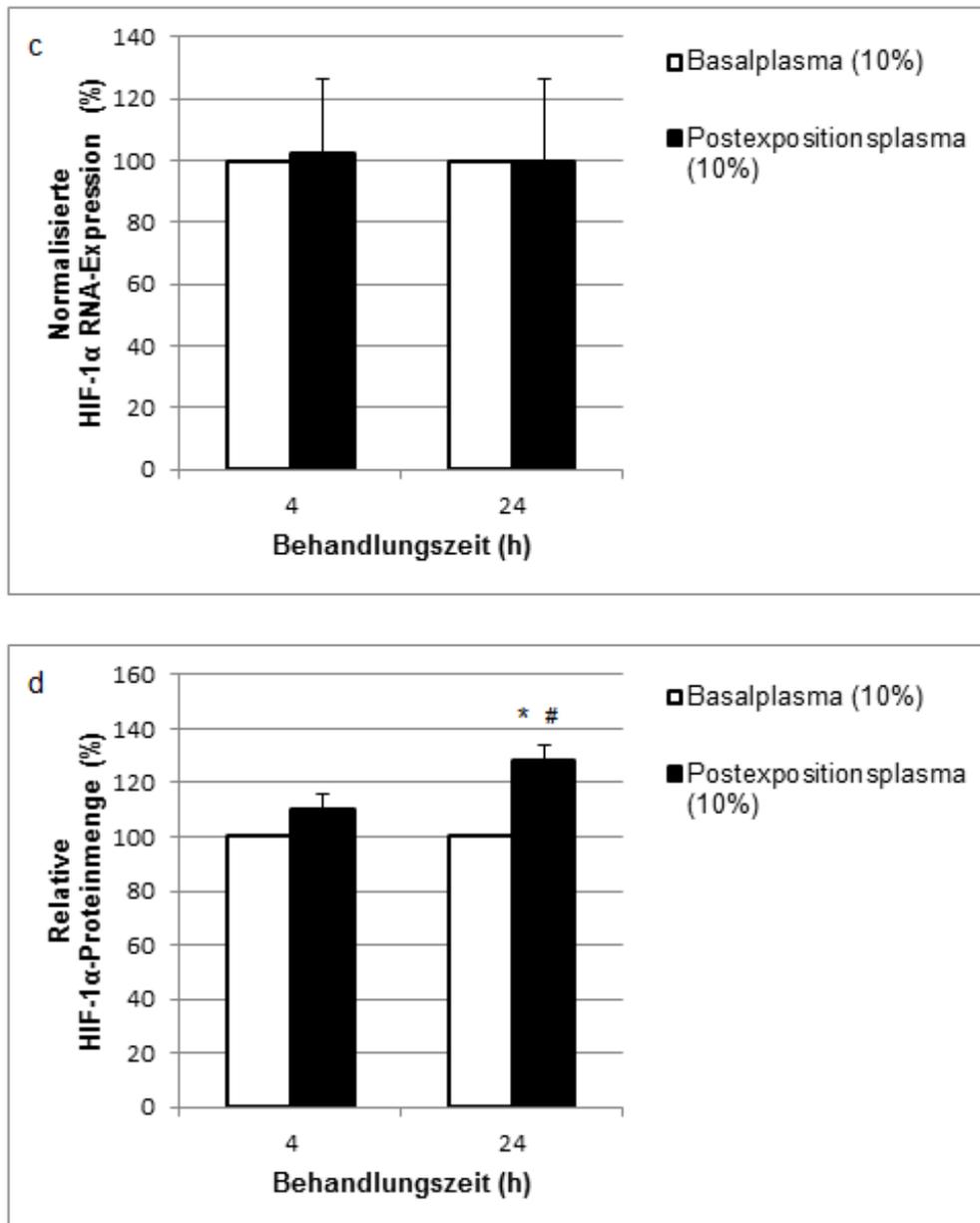
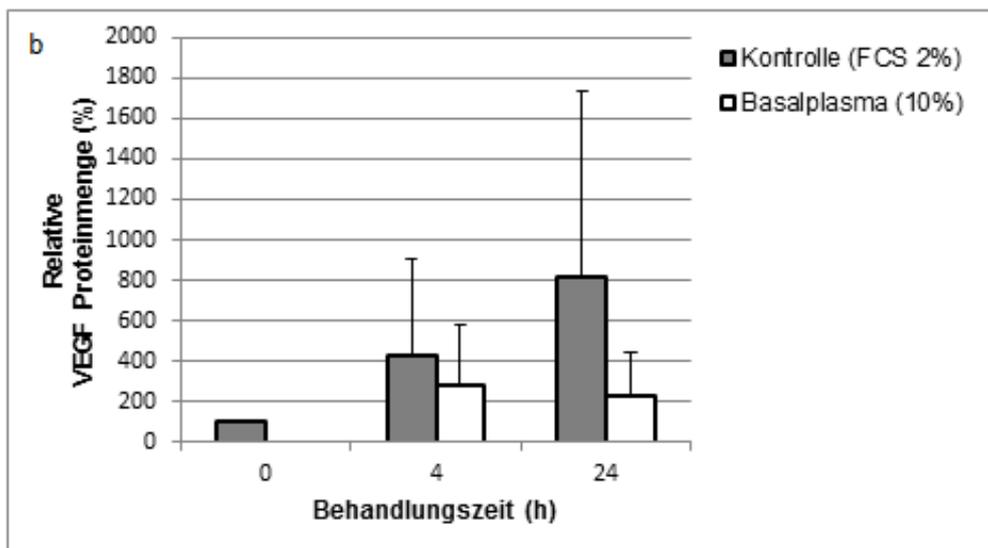
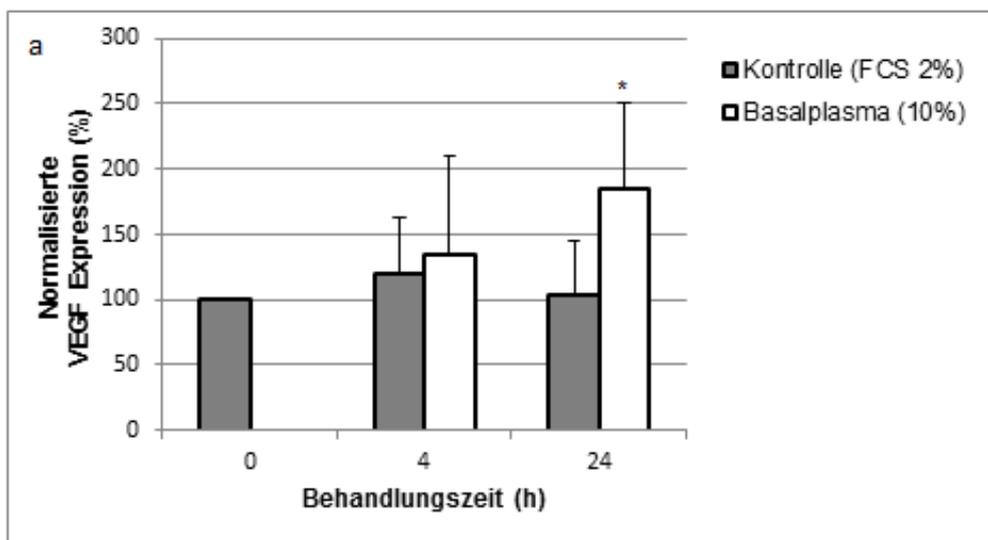


Abbildung 26: Einfluss von Postexpositionsplasma auf die Expression von HIF-1 α im ELISA. Dargestellt ist die HIF-1 α -Expression auf mRNA- (a, c) und Proteinlevel (b, d). In den Experimentalbedingungen (a, b) zeigt sich ein durchgängig höherer Umsatz beim Basalplasma im Vergleich zum Kontrollmedium. Während sich dieser Unterschied auf RNA-Level schon ab vier Stunden zeigt, ist dies auf Proteinlevel erst zum Ende der Behandlung ersichtlich. Auf RNA-Ebene konnte die Wirkung des Postexpositionsplasmas (c) bisher nicht bestätigt werden, weist jedoch eine hohe Varianz auf. Auf Proteinebene (d) zeigt sich jedoch ein gesteigerter Umsatz zum Basalplasma, der über die Zeit steigt und zur Inkubation bei 24 Stunden signifikant ist. Postexpositionsplasma stimuliert den Umsatz an HIF-1 α -Protein in HUVECs. (* $p < 0,05$ vs. Basalkontrolle zum gleichen Zeitpunkt; # $p < 0,05$ vs. Postexpositionsplasma zum vorherigen Zeitpunkt) (MW \pm SEM)

4.4.4 Postexpositionsplasma stimuliert die Expression von VEGF

VEGF ist eines der zentralen angiogenetischen Faktoren im Signalweg *downstream* von HIF-1 α . Deshalb wurde die Expression von VEGF ebenfalls auf mRNA- und Proteinebene in HUVECs untersucht. Basalplasma hatte im Vergleich zum Kontrollmedium lediglich bei 24 Stunden einen signifikanten Einfluss auf Proteinebene. Wobei unter Zugabe von Postexpositionsplasma im Vergleich zum Basalplasma signifikant höhere Konzentrationen von VEGF auf mRNA- und Proteinebene erreicht wurden.



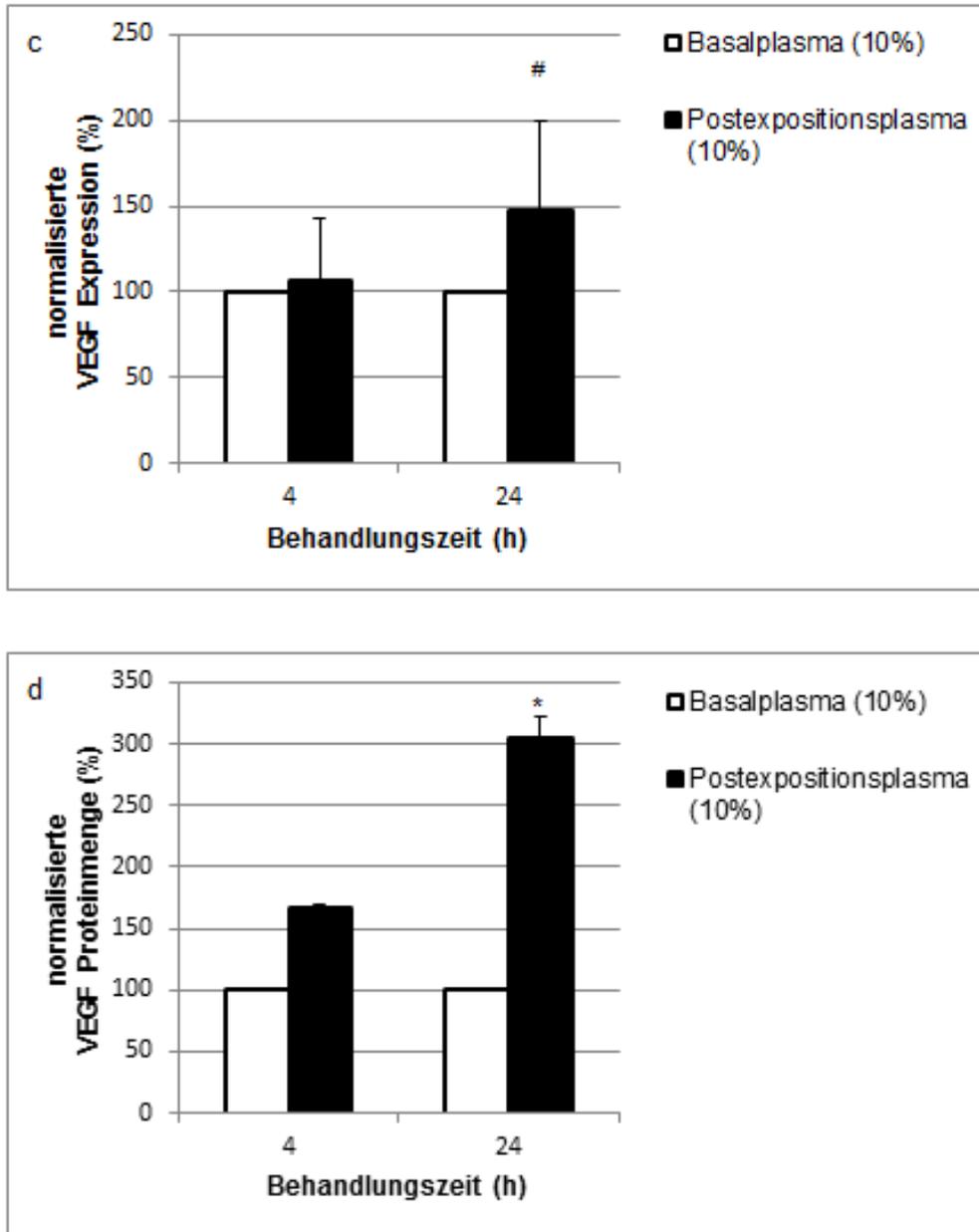


Abbildung 27: Einfluss von Postexpositionsplasma auf die Expression von VEGF im ELISA. Dargestellt ist die VEGF-Expression auf RNA- (a, c) und Proteinlevel (b, d). In den Experimentalbedingungen zeigt sich auf RNA-Ebene (a) ein durchgängig höherer Umsatz beim Basalplasma im Vergleich zum normalen Kulturmedium. Auf Proteinebene (b) zeigt sich eine gegenteilige Situation durch gesenkten Umsatz. Die Wirkung des Postexpositionsplasmas in Bezug auf das Basalplasma zeigt durchgängig auf RNA- (c) und Proteinebene (d) einen erhöhten Umsatz. Dieser erhöhte Umsatz zeigt sich auf Proteinebene zur 24 h-Probe signifikant. Postexpositionsplasma steigert den VEGF-Umsatz in HUVECs. (* $p < 0,05$ vs. Basalkontrolle zum gleichen Zeitpunkt; $\#p < 0,05$ vs. Postexpositionsplasma zum vorherigen Zeitpunkt) (MW \pm SEM)

5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen. Es wurde gezeigt, dass (-)-Epicatechin in HUVECs und CACs die Chemokinese und Chemotaxis dosisabhängig und NOS-abhängig mit Maximum bei 100 ng/ml steigern kann, ohne jedoch die Zellproliferation zu beeinflussen. Durch Postexpositionsplasma, jedoch nicht durch Kontrollplasma, konnte ein signifikanter NOS-abhängiger Anstieg des Wundverschlusses und der *Tube Formation* gezeigt werden. Parallel zeigten sich gesteigerte Expression von HIF-1 α und VEGF in den Endothelzellen.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass zirkulierende Flavanole und deren Metabolite *in vitro* die Endothelregeneration auf zellulärer Ebene positiv beeinflussen können und legen eine Rolle von HIF-1 α in diesem Zusammenhang nahe.

5.1 Zusammenhang von Flavanolen, Postexpositionsplasma und (-)-Epicatechin

In dieser Arbeit wurde neben (-)-Epicatechin auch Plasma von Probanden nach Flavanolaufnahme verwendet. Der Grund hierfür lag in der Hypothese, dass die Flavanole, speziell die (-)-Epicatechine zum größten Teil wie in der Arbeit von Heiss et al. (Heiss, Keen, et al., 2010) beschrieben, in metabolisierter Form konjugiert mit Methylgruppen, Glucuronsäure oder Sulfat vorliegen. Nur ein geringer Teil liegt frei zirkulierend vor, sodass eine lokale Wirkung beispielsweise durch Abspaltung der metabolisierten Formen möglich erscheint. Die exakten Wirkmechanismen sind aber bisher noch nicht bekannt.

Die entsprechenden Metabolite waren nicht auf kommerziellem Wege erhältlich, was der Grund war, warum sie bisher keine Anwendung fanden. Als Lösung dieses Problems blieb die Möglichkeit der Metabolisierung von Flavanol in einer Gruppe von gesunden jungen Männern. Entsprechende Protokolle wurden bereits in klinischen Studien, wie der AGE-Studie und der *Flaviola Health Study* verwendet (Heiss et al., 2015; Sansone et al., 2015).

Aufgrund der Annahme, dass Postexpositionsplasma sich gegenüber dem Basalplasma lediglich durch einen höheren Anteil an zirkulierenden Flavanolmetaboliten unterscheidet, wurde Plasma verwendet. Es handelte sich bei den zum Vergleich herangezogenen Proben stets um das Plasma desselben Probanden zum Zeitpunkt vor bzw. 2 Stunden nach Aufnahme von Flavanol (Rodriguez-Mateos et al., 2012).

Das verwendete flavanolreiche Getränkpulver (2x450 mg) bestand dabei zu 128 mg aus (-)-Epicatechin. Dies ist hervorzuheben, da Ergebnisse der Arbeitsgruppe schon im Vorfeld zeigten, dass Oligomere nicht absorbiert werden und unter den 4 möglichen Stereoisomeren das (-)-Epicatechin die wichtigste Rolle in der Vermittlung der biologischen Flavanolwirkung zu spielen scheint. Zur Validierung des Postexpositionsplasmas wurde dieses im Vergleich mit entsprechenden Kontrollplasmen von Probanden ohne Flavanolsubstitution untersucht. Im Ergebnis zeigte sich, dass in den Kontrollplasmen die Flavanele unter der Nachweisgrenze lagen, während in den Plasmen zwei Stunden nach oraler Flavanolaufnahme eine signifikante Erhöhung dieser festgestellt werden konnte (987 nmol/l [95% CI: 857 – 1,118 nmol/l]) (Sansone et al., 2015).

Die Ergebnisse der plasmabasierten Versuche konnten somit der Wirkung von zirkulierenden, größtenteils metabolisierten Flavanolmetaboliten zugeschrieben werden.

5.2 Wirkung von Flavanol(metaboliten) *in vitro*

5.2.1 Einfluss von Flavanolen auf Endothelfunktion

Um die Wirkung *in vitro* auf die endotheliale Funktion und somit auf ein kardiovaskuläres Risiko aufzuzeigen, wurde die Angiogenese von gefäßbildenden Zellen wie HUVECs und CACs unter Flavanolsubstitution untersucht. Generell, in der *Tube Formation* und in weiteren Migrationsexperimenten, zeigte sich eine proangiogenetische Wirkung auf signifikantem Level. Weiter konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung in Abhängigkeit mit der NO-Synthase steht.

Diese Ergebnisse *in vitro* scheinen vereinbar mit den Ergebnissen *in vivo* der neueren Literatur. Hier werden Surrogatendpunkte wie flussvermittelte Dilatation (FMD, *flow-mediated vasodilation*), Blutdruck (BP, *blood pressure*) und Pulswellengeschwindigkeit (PWV, *pulse wave velocity*) verwendet. Diese sind Indikatoren für die endotheliale Funktion und stehen somit in einer entsprechenden Relation zum Risiko kardiovaskulärer Ereignisse. Wie dieser Effekt jedoch entsteht wurde bislang nicht abschließend geklärt.

Schroeter et al. beschrieb bereits 2006 eine Korrelation zwischen zirkulierenden Flavanol(metabolit)en aus Kakao und erhöhter FMD, sowie eine NOS-Abhängigkeit. Dieser Effekt hatte einen Peak bei 2 Stunden und endete 6 Stunden nach Flavanolaufnahme (Schroeter et al., 2006).

Erstaunlich ist, dass die bis zum heutigen Tag gezeigten Arbeiten verbesserte endotheliale Funktionen über Zeiträume von 2-4 bzw. 2-6 Stunden aufwiesen, obwohl die Metabolite im Blutplasma der Probanden bereits zu diesem Zeitpunkt unter die Nachweisgrenze gesunken waren (Rodriguez-Mateos et al., 2012; Schroeter et al., 2006)..

2015 zeigte Sansone et al. ähnliches. Es kam nach oraler Aufnahme von Kakaoflavanolen zu einer signifikant erhöhten endothelialen Funktion. Den Probanden wurden über 30 Tage 2 mal am Tag flavanolhaltige Getränke verabreicht. Neben der Beobachtung wie bei Schroeter et al. führte die kontinuierliche Gabe der flavanolhaltigen Getränke zu einer schrittweisen Erhöhung der endothelialen Funktion nach nächtlichem Fasten. Diese

Steigerungen hielten bis zum 21. Tag an und stagnierten bei erreichtem Wert. Somit hatte sich neben der akuten Wirkung noch ein chronischer Effekt gezeigt (Sansone et al., 2015).

Auch die *in vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine proangiogenetische Wirkung, welche über 10 Stunden anhält, im Nachweis der beeinflussten Zielstrukturen des Signalweges sogar über 24 Stunden.

Ein möglicher Erklärungsansatz hierzu ist, dass die Flavanole bzw. deren zirkulierende Metabolite initial über eine direkte Wirkung, ggf. rezeptorvermittelt, verfügen, jedoch auch Signalkaskaden anstoßen, welche zu einer molekularen Veränderung des Gewebes führen. Dies muss noch in weiteren Untersuchungen charakterisiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Flavanole und ihre Metabolite einen positiven Einfluss auf die endotheliale Funktion, speziell über die Steigerung der angiogenetischen Funktion haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen einen *in vitro*-Erklärungsansatz für die in der Literatur bereits mehrfach aufgezeigten *in vivo*-Ergebnisse dar.

5.2.2 Zusammenhang von HIF-1 α und VEGF

VEGF als Motor der Angiogenese ist in der Literatur zahlreich beschrieben. Auch die Induktion von Angiogenese durch Ischämie in Mausmodellen und Zellkulturen ist eine gängige Praxis (Shweiki, Itin, Soffer, & Keshet, 1992). Speziell eine Beeinflussung des VEGF durch erhöhte HIF-1 α -Aktivität wurde bereits untersucht (Forsythe et al., 1996).

In den Versuchen dieser Arbeit ging es um diese Beeinflussung von HIF-1 α durch Flavanole und die Einarbeitung in einen möglichen Wirkungsweg (*downstreaming pathway*).

Der Nachweis von signifikanten Änderungen der HIF-1 α Expression konnte in den Experimenten auf der Proteinebene, nicht aber auf mRNA-Ebene erbracht werden. Die vermutete transkriptionelle Beeinflussung von HIF-1 α durch Flavanole auf mRNA-Level, wie sie auch von Ramirez et al. beschrieben wurde,

ließ sich somit nicht bestätigen (Ramirez-Sanchez et al., 2012). Dies mag auch an der kleinen n-Zahl der Experimente liegen.

Vielmehr kann man nachvollziehen, dass ein direkter Einfluss der Flavanele auf HIF-1 α durch die Stabilisierung bereits produzierter Proteine dargestellt werden kann. Dies wäre dadurch zu erklären, dass HIF-1 α permanent gebildet, jedoch durch die PHD2 auch immer wieder degradiert wird (Berra et al., 2003).

Erweiterte Experimente mit PHD-Inhibitoren und Hypoxiekammern könnten hier die nächsten Ansätze sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Flavanele einen positiven Einfluss auf den Umsatz an HIF-1 α und VEGF haben.

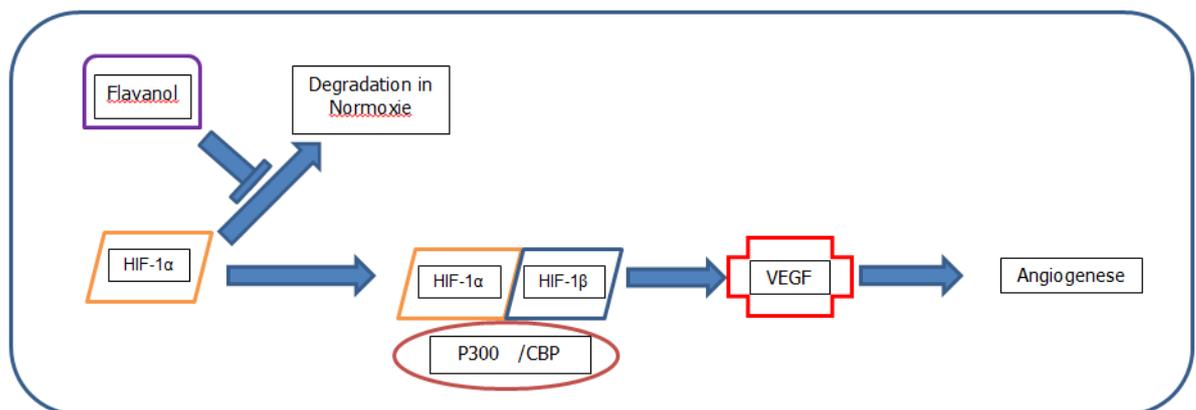


Abbildung 28: Downstreaming pathway. Einfluss und Folgebeziehung von Flavanolmetaboliten auf HIF und VEGF

5.3 Senkung des kardiovaskulären Risikos – Klinische Bedeutung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zirkulierende Flavanolmetabolite aus Kakao die *in vitro*-Angiogenese steigern können. Diese proangiogenetische Wirkung kann man bezogen auf die kardiovaskuläre Risikosenkung als positiv beschreiben. Zeitgleich jedoch müssen im Hinblick auf andere Erkrankungen die Risiken weiter untersucht werden. Beispielsweise wäre eine gesteigerte Angiogenese bei Patienten mit Tumoren schädlich, da sie das Tumorwachstum begünstigen würden. Sie fallen also aus dem Patientenkontext für eine mögliche diätetische Lifestyle-Intervention heraus.

Über den neu dargestellten Weg der Einflussnahme der Flavanole auf HIF-1 α ergibt sich eine neue Herangehensweise an weitere Studien zu den bekannten Forschungsschwerpunkten von Risikominderung der kardialen Ereignisse und tumoröser Angiogenese, als auch auf neue Gebiete, wie zum Beispiel auf den Bereich der Neuroforschung (Sokolov, Pavlova, Klosterhalfen, & Enck, 2013).

5.4 Methodenkritik

Vor der Verwendung der Ergebnisse ist es anzubringen, dass *in vitro* Systeme nur Modelle sind und folglich immer nur Teilaspekte der zu untersuchenden Prozesse wie sie *in vivo* stattfinden abbilden können.

Der Nachteil aller verwendeten *in vitro*-Versuche ist die Auslegung auf nur einen Zelltypus. Somit sind Aussagen über im Körper stattfindende Wechselwirkungen der Interzell-Kommunikationen verschiedener Zellklassen schwer zu formulieren.

Ebenfalls anzubringen ist, dass weitere Faktoren wie der Blutfluss, mit Scherkräften und Dehnung, sowie ein durchgehender Nährstoffzufluss und ein in sich abgeschlossenes Blutsystem durch permanente Inkubation und Luftabschluss einen Einfluss auf die Angiogeneseprozesse haben. All diese Faktoren konnten bei den beschriebenen Experimenten nicht berücksichtigt werden. Das nächste anzustrebende Modell wäre somit ein Assay einer extrazellulären Matrix, unter Flussbedingungen, welche mit Hilfe eines Mikroskops mit integriertem Inkubator untersucht werden kann.

Literaturverzeichnis

- Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K., & Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, *12*(3), 267-274. doi:10.1007/s10456-009-9146-4
- Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, *81*(1 Suppl), 317S-325S.
- Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T., & Terao, J. (2000). Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res*, *33*(5), 635-641.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., & Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J*, *22*(16), 4082-4090. doi:10.1093/emboj/cdg392
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, *303*(2), 474-482. doi:10.1006/abbi.1993.1311
- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, *115*, 453-466.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, *6*(4), 389-395. doi:10.1038/74651
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, *407*(6801), 249-257. doi:10.1038/35025220
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, *162*(1), 156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, *18*(14), 1818-1892. doi:10.1089/ars.2012.4581
- Drake, C. J. (2003). Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, *69*(1), 73-82. doi:10.1002/bdrc.10003
- Duffy, S. J., Keaney, J. F., Jr., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P. L., Frei, B., & Vita, J. A. (2001). Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, *104*(2), 151-156.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, *16*(9), 4604-4613.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, *119*(2), 203-210.
- Heiss, C., Finis, D., Kleinbongard, P., Hoffmann, A., Rassaf, T., Kelm, M., & Sies, H. (2007). Sustained increase in flow-mediated dilation after daily

- intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J Cardiovasc Pharmacol*, 49(2), 74-80. doi:10.1097/FJC.0b013e31802d0001
- Heiss, C., Jahn, S., Taylor, M., Real, W. M., Angeli, F. S., Wong, M. L., . . . Yeghiazarians, Y. (2010). Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 56(3), 218-224. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.039
- Heiss, C., Keen, C. L., & Kelm, M. (2010). Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J*, 31(21), 2583-2592. doi:10.1093/eurheartj/ehq332
- Heiss, C., Keymel, S., Niesler, U., Ziemann, J., Kelm, M., & Kalka, C. (2005). Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 45(9), 1441-1448. doi:10.1016/j.jacc.2004.12.074
- Heiss, C., Sansone, R., Karimi, H., Krabbe, M., Schuler, D., Rodriguez-Mateos, A., . . . Flaviola Consortium, E. U. t. F. P. (2015). Impact of cocoa flavanol intake on age-dependent vascular stiffness in healthy men: a randomized, controlled, double-masked trial. *Age (Dordr)*, 37(3), 9794. doi:10.1007/s11357-015-9794-9
- Henning, S. M., Niu, Y., Lee, N. H., Thames, G. D., Minutti, R. R., Wang, H., . . . Heber, D. (2004). Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr*, 80(6), 1558-1564.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16), 7276-7280.
- Holt, R. R., Lazarus, S. A., Sullards, M. C., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., Hammerstone, J. F., . . . Keen, C. L. (2002). Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*, 76(4), 798-804.
- Huttemann, M., Lee, I., Perkins, G. A., Britton, S. L., Koch, L. G., & Malek, M. H. (2013). (-)-Epicatechin is associated with increased angiogenic and mitochondrial signalling in the hindlimb of rats selectively bred for innate low running capacity. *Clin Sci (Lond)*, 124(11), 663-674. doi:10.1042/CS20120469
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 52(11), 2745-2756. doi:10.1172/JCI107470
- Joshiyura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., . . . Willett, W. C. (2001). The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*, 134(12), 1106-1114.
- Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15(5), 378-386. doi:10.1016/j.semancer.2005.05.004
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., & Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21(24), 6188-6193.

- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., & Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol*, *107*(4), 1589-1598.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685.
- Lampugnani, M. G. (1999). Cell migration into a wounded area in vitro. *Methods Mol Biol*, *96*, 177-182. doi:10.1385/1-59259-258-9:177
- Lee, L. G., Connell, C. R., & Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, *21*(16), 3761-3766.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, *4*(6), 357-362.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*(1), 265-275.
- Maciag, T., Kadish, J., Wilkins, L., Stemerman, M. B., & Weinstein, R. (1982). Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol*, *94*(3), 511-520.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, *81*(1 Suppl), 230S-242S.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, *65*(1-2), 55-63.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, *155*, 335-350.
- Ramirez-Sanchez, I., Nogueira, L., Moreno, A., Murphy, A., Taub, P., Perkins, G., . . . Villarreal, F. (2012). Stimulatory effects of the flavanol (-)-epicatechin on cardiac angiogenesis: additive effects with exercise. *J Cardiovasc Pharmacol*, *60*(5), 429-438. doi:10.1097/FJC.0b013e318269ae0d
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, *386*(6626), 671-674. doi:10.1038/386671a0
- Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H. G., Sasse, J., Eklom, P., Kessler, R., & Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*, *102*(3), 471-478.
- Rodriguez-Mateos, A., Feliciano, R. P., Boeres, A., Weber, T., Dos Santos, C. N., Ventura, M. R., & Heiss, C. (2016). Cranberry (poly)phenol metabolites correlate with improvements in vascular function: A double-blind, randomized, controlled, dose-response, crossover study. *Mol Nutr Food Res*. doi:10.1002/mnfr.201600250
- Rodriguez-Mateos, A., Oruna-Concha, M. J., Kwik-Urbe, C., Vidal, A., & Spencer, J. P. (2012). Influence of sugar type on the bioavailability of cocoa flavanols. *Br J Nutr*, *108*(12), 2243-2250. doi:10.1017/S0007114512000475
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic

- sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Sansone, R., Rodriguez-Mateos, A., Heuel, J., Falk, D., Schuler, D., Wagstaff, R., . . . Flaviola Consortium, E. U. t. F. P. (2015). Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: a randomised, controlled, double-masked trial: the Flaviola Health Study. *Br J Nutr*, 114(8), 1246-1255. doi:10.1017/S0007114515002822
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., . . . Kelm, M. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(4), 1024-1029. doi:10.1073/pnas.0510168103
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398), 843-845. doi:10.1038/359843a0
- Sokolov, A. N., Pavlova, M. A., Klosterhalfen, S., & Enck, P. (2013). Chocolate and the brain: neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 37(10 Pt 2), 2445-2453. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.06.013
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.
- Van Weemen, B. K., & Schuurs, A. H. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*, 15(3), 232-236.
- Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 243S-255S.
- Wu, D., & Yotnda, P. (2011). Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp*(54). doi:10.3791/2899

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Heiss, meinem Doktorvater, der mir die Welt der Wissenschaft näher gebracht hat und mich dabei nie aufgegeben hat. Durch seine Ideengebung und Projekte hatte ich die Möglichkeit über mich hinaus zu wachsen und ein spannendes Themengebiet zu erkunden. Die zahlreichen Gespräche werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Udo Boeken für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Ich danke Frau Univ-Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler für ihren Einsatz und die neuen Blickwinkel an Entscheidungspunkten meiner Forschung.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Margarete Lukosz und Frau Dr. Ana Rodriguez-Mateos, meinen Betreuerinnen, welche mir die ersten Schritte in der experimentellen Forschung beigebracht haben.

Auch möchte ich mich bei Pia Eber, Sophie Huschka und Ann-Kathrin Lück bedanken für das Verständnis über die letzten Jahre und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm und seiner Klinik für die Bereitstellung des Labors und der mannigfaltigen Unterstützung.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Familie, meiner Großmutter Josefa Schulte, meinen Eltern, Dieter und Marita Enge, sowie meinen Schwestern Judith Bohnacker und Jenny Tebbe, samt ihren Familien, denen ich mit meine Arbeit widme.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Freundin Ulla Banse, die mir stets zur Seite stand und durch sämtliche Höhen und Tiefen stets ein Kompass war. Auch wenn sie die letzten Schritte zum Abschluss dieser Arbeit nicht mehr erleben kann, so erfüllt es mich Stolz eines unserer letzten Projekte zum Abschluss zu bringen.