

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Regulation des Transkriptionsfaktors Grainyhead-like 3 durch Pflanzeninhaltsstoffe in Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Annika Vierkant

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Altschmied

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Cox, F.F.*, Misiou, A.*, Vierkant, A., Ale-Agha, N., Grandoch, M., Haendeler, J., Altschmied, J., (2022), Protective Effects of Curcumin in Cardiovascular Diseases-Impact on Oxidative Stress and Mitochondria. *Cells*, (11, 3), 342.

Merk, D.*, Greulich, J.*, Vierkant, A., Cox, F., Eckermann, O., von Ameln, F., Dyballa-Rukes, N., Altschmied, J., Ale-Agha, N., Jakobs, P., Haendeler, J., (2023), Caffeine Inhibits Oxidative Stress- and Low Dose Endotoxemia-Induced Senescence-Role of Thioredoxin-1, *Antioxidants* (12, 6), 1244.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Bei deren Entstehung spielt endotheliale Dysfunktion, die durch eine verminderte NO-Produktion und Migrationsfähigkeit von Endothelzellen (EZ) gekennzeichnet ist, eine wichtige Rolle. Bei der endothelialen Dysfunktion, die mit einer chronischen Entzündung einhergeht, kommt es auch zum Auftreten von Stress-induzierter Seneszenz der EZ. Senescente Zellen haben einen veränderten Metabolismus und sind in ihrer ursprünglichen Funktion eingeschränkt. Der Pflanzeninhaltsstoff Curcumin wird seit Jahrtausenden in der traditionellen asiatischen Medizin eingesetzt. Zahlreiche Studien zeigen, dass Curcumin die Endothelfunktion verbessert. Kaffeekonsum ist in großen epidemiologischen Studien mit einer reduzierten kardiovaskulären Mortalität assoziiert. Koffein, der Hauptwirkstoff von Kaffee, erhöhte in Studien die NO-Produktion von EZ. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 (GRHL3) ist essenziell für die Funktion der EZ, indem er die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert und so die NO-Produktion und Migration verstärkt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Curcumin und/oder Koffein den Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ regulieren. Zudem sollte untersucht werden, ob GRHL3 in Stress-induzierter Seneszenz in EZ reguliert ist und ob Koffein einen Einfluss auf Stress-induzierte Seneszenz in EZ hat. Hierfür wurden humane EZ mit Curcumin oder Koffein für 24 h inkubiert. Sowohl die Behandlung mit Curcumin als auch mit Koffein führte zu einer Zunahme der GRHL3-Menge im Immunoblot verglichen mit den Kontrollen. Die Koffein-Behandlung führte auch zu einer Zunahme der *grhl3* Expression in der semiquantitativen *real-time* PCR. Um Stress-induzierte Seneszenz zu erzeugen, wurden EZ zwei Wochen lang mit H₂O₂ behandelt. Der Nachweis der Seneszenz-Induktion durch H₂O₂ wurde durch die Hochregulation von nukleärem p21 und die Herunterregulation von eNOS nachgewiesen. Gleichzeitig zeigte sich ein Verlust der GRHL3-Proteinmenge im Immunoblot. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Koffein wurde weder die p21 Proteinmengen hochreguliert, noch kam es zu einer Veränderung von GRHL3 und eNOS im Vergleich zur Kontrolle. Aus den Ergebnissen lässt sich folgern: Erstens regulieren Curcumin und Koffein den vasoprotektiven Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ hoch. Zweitens ist GRHL3 in Stress-induzierter Seneszenz herunterreguliert. Drittens verhindert Koffein Stress-induzierte Seneszenz in EZ durch Erhaltung der Proteinmengen von GRHL3 und eNOS. Die Pflanzeninhaltsstoffe Curcumin und Koffein könnten langfristig neue Optionen in der Prävention und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen darstellen.

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death across the globe. Endothelial dysfunction, which is characterized by reduced NO production and migratory capacity of endothelial cells (EC), plays an important role in their development. Endothelial dysfunction, that goes along with chronic inflammation, also encompasses the occurrence of stress-induced senescence of EC. Senescent cells have an altered metabolism and are impaired in their original functions. The plant compound curcumin has been used in traditional Asian medicine for thousands of years. In many studies curcumin has been shown to improve endothelial function. Coffee consumption has been associated with reduced cardiovascular mortality in large epidemiological studies. Studies have shown that caffeine, the main active ingredient in coffee, increases NO production of EC. The transcription factor Grainyhead-like 3 (GRHL3) is essential for EC function as it activates endothelial NO synthase (eNOS), thereby enhancing NO production and migration. In this study it was investigated whether curcumin and/or caffeine regulate the transcription factor GRHL3 in EC. In addition, it was investigated if GRHL3 is regulated in stress-induced senescence in EC and if caffeine has an influence on stress-induced endothelial cell senescence. Therefore, human EC were incubated for 24 h with curcumin or caffeine, respectively. Curcumin and caffeine treatment both lead to an increase of GRHL3 protein level compared to controls in immunoblot analysis. Caffeine treatment also led to an increase of *grhl3* expression in semiquantitative real-time PCR. To induce stress-induced senescence, EC were treated with H₂O₂ for two weeks. Senescence induction by H₂O₂ was proven by upregulation of nuclear p21 and downregulation of eNOS. Concomitantly, GRHL3 protein levels were reduced as shown by immunoblot. Simultaneous treatment with caffeine did not lead to upregulation of p21 protein levels compared to controls, and, moreover, GRHL3 and eNOS protein levels were unaltered. From these results the following conclusions can be drawn: Firstly, curcumin and caffeine both upregulate the vasoprotective transcription factor GRHL3 in EC. Secondly, GRHL3 is downregulated in stress-induced EC senescence. Thirdly, caffeine prevents stress-induced senescence in EC by sustaining GRHL3 and eNOS protein levels. In the long run, the plant compounds curcumin and caffeine could therefore offer new options in the prevention and therapy of CVDs.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
∞	unendlich
ACh	Acetylcholin
AKT1	Protein Kinase B alpha
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
BCL-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
BH4	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
cDNA	<i>complementary</i> DNA
cm	Zentimeter
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>

dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBM	<i>endothelial basal medium</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDD	<i>endothelium dependent dilation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EPZ	Endotheliale Progenitorzellen
EZ	Endothelzellen
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMD	<i>flow mediated dilation</i>
FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRH	Grainyhead
GRHL3	Grainyhead-like 3
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit

LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	<i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NGS	<i>normal goat serum</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterasen
PKA	Protein Kinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation-assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPL32	Ribosomales Protein L32
s	Sekunde(n)
SA-betaGal	Seneszenz-assoziierte Beta Galaktosidase
SASP	<i>senescence associated secretory phenotype</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SOD	Superoxiddismutase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween®-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
x	Mal
xg	x-fache der mittleren Erdbeschleunigung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen	1
1.2 Endothelzellfunktionen und die endotheliale NO-Synthase	2
1.3 Endothelzellen und kardiovaskuläre Erkrankungen	4
1.3.1 Endotheliale Dysfunktion	4
1.3.2 Seneszenz	4
1.4 Auswirkungen von Pflanzeninhaltsstoffen auf das kardiovaskuläre System	6
1.4.1 Curcumin	6
1.4.2 Koffein	8
1.5 Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3	10
1.6 Ziele der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Zellkultur	15
2.1.3 Kits	16
2.1.4 Antikörper	16
2.1.5 Oligonukleotid-Primer	17
2.1.6 Geräte	17
2.1.7 Labormaterialien	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Zellbiologische Methoden	19
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	22
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.4 Statistische Auswertung	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Einfluss von Pflanzeninhaltsstoffen auf GRHL3	35
3.1.1 Einfluss von Curcumin auf GRHL3	35
3.1.2 Einfluss von Koffein auf GRHL3	36
3.2 Regulation von GRHL3 in Stress-induzierter Seneszenz	39
3.3 Einfluss von Koffein auf Stress-induzierte Seneszenz	40
4. Diskussion	45

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4.2 Curcumin und GRHL3	45
4.3 Koffein und GRHL3	47
4.4 GRHL3 in EZ-Seneszenz	49
4.5 Koffein und EZ-Seneszenz	49
4.6 Ausblick	52
4.8 Schlussfolgerungen	54
5. Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit und gehen mit einer großen sozioökonomischen Belastung einher. Im Jahr 2019 starben laut *World Health Organisation* (WHO) beinahe 18 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, entsprechend 32 % der weltweiten Todesfälle [1]. Mehr als drei Viertel der Todesfälle aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen finden in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen statt [1]. In einigen Ländern mit hohem Einkommen geht durch bessere medizinische Versorgung die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen zurück, jedoch nimmt dadurch die Anzahl erkrankter Personen zu [2].

Die hohe Krankheitslast in der Bevölkerung führt zu einer großen ökonomischen Belastung: Laut den *European Cardiovascular Disease Statistics* von 2017 [3] kosten kardiovaskuläre Erkrankungen die EU schätzungsweise 210 Milliarden Euro pro Jahr, wovon 53 % auf direkte Gesundheitskosten, 26 % auf Produktivitätsausfälle und 21 % auf informelle Pflege entfallen.

Durch den demographischen Wandel wird sich die durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursachte sozioökonomische Belastung noch verstärken. Laut Statistischem Bundesamt [4] wird der Anteil der Personen ab 67 Jahre in Deutschland zwischen 2020 und 2035 voraussichtlich um 22 % von 16 Millionen auf 20 Millionen zunehmen. Da hohes Alter der Hauptrisikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist [5], wird die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen in den nächsten Jahren mit der alternden Bevölkerung ansteigen. Daher ist die großflächige Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung.

Neben dem Alter sind weitere, beeinflussbare Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bekannt: Erhöhter Blutdruck, hohes *low density lipoprotein*-(LDL)-Cholesterin, Übergewicht und Diabetes mellitus, aber auch Verhaltensweisen wie Rauchen, physische Inaktivität, ungesunde Ernährung und Alkoholkonsum tragen nachweislich zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei [2].

Die Atherosklerose ist sehr häufig für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen verantwortlich. Hierbei werden die Wände arterieller Blutgefäße fibrotisch umgebaut, was zu einem verminderten Blutfluss bis hin zu einem akuten Verschluss des Gefäßes mit

darauffolgender Ischämie des Versorgungsgebiets führen kann. Bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques ist eine Lipideinlagerung in die Gefäßwand mit darauffolgender Entzündungsreaktion von großer Bedeutung [6], aber auch eine endotheliale Dysfunktion spielt eine wichtige Rolle [7]. Der Plaque wird fibrotisch umgebaut und kann das Gefäßlumen einengen. Reißt ein atherosklerotischer Plaque auf, thrombosierte das Gefäßlumen und es kommt zu einem akuten kardiovaskulären Ereignis [6].

Zu den kardiovaskulären Erkrankungen zählen laut WHO [1] koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskuläre Erkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), rheumatische Herzerkrankungen, kongenitale Herzfehler und tiefe Venenthrombosen. Die drei erstgenannten Erkrankungen beruhen u.a. auf dem atherosklerotischen Umbau von Arterien. Dies kann je nach Lokalisation zu verschiedenen Manifestationen führen: Die KHK kann zu einem Myokardinfarkt und zur ischämischen Kardiomyopathie mit konsekutiver Herzinsuffizienz führen, die zerebrovaskuläre Erkrankung zu einem Schlaganfall und die pAVK zu einer Ischämie der Extremitäten [6].

Die derzeitige Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen konzentriert sich, neben der Revaskularisierung im Falle eines akuten kardiovaskulären Ereignisses, hauptsächlich auf die primäre und sekundäre Prävention dieser Ereignisse. Etablierte Medikamente sind hierbei Statine zur Senkung des LDL-Cholesterins, Acetylsalicylsäure (ASS) zur Thrombozytenaggregationshemmung und Blutdrucksenker [8]. Des Weiteren empfiehlt die *American Heart Association* eine ausgewogene Ernährung zur Verbesserung der kardiovaskulären Gesundheit [9].

1.2 Endothelzellfunktionen und die endotheliale NO-Synthese

Endothelzellen (EZ) bilden die innerste Schicht von Blutgefäßen. Gefäßwände sind aus drei Schichten aufgebaut: Außen befindet sich die aus Bindegewebe bestehende Adventitia. Darunter liegt die Media, die aus glatten Muskelzellen besteht und den Gefäßtonus durch Kontraktion oder Entspannung reguliert. Ganz innen befindet sich die Intima, eine einzelne Schicht aus EZ, die mit dem Blutstrom in Kontakt tritt und zahlreiche regulatorische Funktionen erfüllt [10].

Für die Regulation der Gefäßfunktionen ist ein Gleichgewicht verschiedener Faktoren essenziell [10]. So regulieren EZ die Blutgerinnung [11] und die Immunantwort [12] durch

das fein abgestimmte Gleichgewicht prothrombotischer und antithrombotischer bzw. proinflammatorischer und antiinflammatorischer Faktoren. Auch für die Aufrechterhaltung eines Redox-Gleichgewichtes zwischen oxidativem Stress und antioxidativen Faktoren sind EZ zuständig [13]. Des Weiteren regulieren EZ den Gefäßtonus vor allem durch Freisetzung von NO [10]. NO bewirkt über die Aktivierung einer löslichen Guanylatcyclase eine Relaxation der glatten Muskelzellen der Media und somit eine Vasodilatation [14]. EZ regulieren außerdem die eigene Migration, die für die Angiogenese und Reparatur von Blutgefäßen notwendig ist [10].

Zahlreiche Prozesse in Blutgefäßen werden durch NO reguliert [10]. So hat NO neben der vasodilatatorischen Wirkung eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, das heißt der Migration von EZ [15]. Des Weiteren erhöht NO die Lebensfähigkeit von EZ, indem es das Apoptose-Enzym Caspase-3 inhibiert [16]. Auch für die Inhibition der Blutgerinnung [17] und der Inflammation [18] spielt NO eine wichtige Rolle.

In *in vivo* und klinischen Studien wird als Parameter für die EZ-Funktion häufig die Fluss-abhängige Vasodilatation (*flow mediated dilation*, FMD) herangezogen [19, 20]. Diese beruht auf der NO-vermittelten Vasodilatation und spiegelt die NO-Produktion der EZ wider [19]. In anderen Studien wird als Maß für die EZ-Funktion die Acetylcholin-(ACh)-induzierte Endothel-abhängige Vasodilatation (*endothelium dependent dilation*, EDD) gemessen, da nur intakte Endothelzellen auf ACh mit einer NO-vermittelten Vasodilatation reagieren [21, 22].

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist die Hauptquelle für NO in EZ und daher entscheidend für die Gefäßfunktion [10]. Im funktionalen Zustand ist das Enzym eNOS ein Homodimer und katalysiert die Reaktion von L-Arginin zu Citrullin und NO [23]. eNOS kann Calcium-abhängig und -unabhängig aktiviert werden. Der wichtigste Calcium-unabhängige Aktivierungsmechanismus ist Scherstress durch das vorbeifließende Blut [24]. Die eNOS-Aktivität wird hauptsächlich reguliert durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung an mehreren Stellen des Enzyms durch verschiedene Kinasen wie der Protein Kinase A (PKA) oder der Protein Kinase B alpha (AKT1). So erhöht die Phosphorylierung an Ser1177 die Enzymaktivität, während die Phosphorylierung an Thr495 die Enzymaktivität reduziert. Des Weiteren kann die eNOS-Aktivität durch Translokation zur Plasmamembran, Interaktion mit anderen Proteinen und auf der Ebene der Genexpression reguliert werden [24].

eNOS besitzt zahlreiche Bindungsstellen für essenzielle Cofaktoren, darunter Tetrahydrobiopterin (BH₄), Häm, Calmodulin (CaM), Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und die prosthetischen Gruppen Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) [23]. Der Cofaktor BH₄ ist von großer Bedeutung für die Enzymfunktion: Ohne BH₄ ist eNOS „ungekoppelt“ und produziert Superoxidanion statt NO [25, 26]. Unter oxidativem Stress wird BH₄ sehr schnell oxidiert und steht nicht mehr als Cofaktor für eNOS zur Verfügung. Dadurch wird eNOS dysfunktional und trägt somit zur Verstärkung des oxidativen Stresses bei, was u.a. auch zu einer endothelialen Dysfunktion führt [25].

1.3 Endothelzellen und kardiovaskuläre Erkrankungen

1.3.1 Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion ist ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen [7] und ist von einer unzureichenden NO-Produktion der EZ gekennzeichnet. Dadurch ist die NO-vermittelte Vasodilatation eingeschränkt. Weiterhin führt endotheliale Dysfunktion zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in EZ zugunsten prothrombotischer und proinflammatorischer Faktoren. In endothelialer Dysfunktion herrscht außerdem oxidativer Stress, da die EZ nicht genug antioxidative Faktoren produzieren [27]. Des Weiteren verringert endotheliale Dysfunktion die Migrationsfähigkeit von EZ [15] und erhöht ihre Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli [28].

Endotheliale Dysfunktion tritt im Alterungsprozess von Gefäßen auf [5, 29], kann aber durch äußere Einflüsse auch im jüngeren Alter entstehen [7]. Ein wesentlicher Entstehungsmechanismus endothelialer Dysfunktion ist oxidativer Stress, das heißt ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) im Verhältnis zu antioxidativen Faktoren [27]. ROS entstehen in großen Mengen in Mitochondrien. Zusätzlich werden ROS von oxidativen Enzymen wie den NADPH-Oxidasen oder der Xanthin-Oxidase produziert [30]. Zu den antioxidativen Faktoren gehören die Thioredoxin-Systeme [31], das Glutathion-System [32] und die Superoxiddismutasen (SOD) [33]. Ein Ungleichgewicht dieser Faktoren resultiert in einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und damit in endothelialer Dysfunktion [27].

1.3.2 Seneszenz

Seneszenz ist ein Stadium, in dem Zellen ihre Fähigkeit zur Zellteilung verlieren und ihre ursprünglichen Funktionen gestört sind [34].

Seneszenz wurde zunächst bei gealterten Zellen beschrieben, kann aber auch durch äußere Einflüsse wie oxidativen Stress ausgelöst werden [34]. Demnach kann Seneszenz anhand ihrer Ursache in replikative und Stress-induzierte Seneszenz eingeteilt werden [35]. Die Grundlage für das Konzept der replikativen Seneszenz bildet die Beobachtung von Hayflick und Moorhead [36], dass menschliche Zellen in Kultur nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchlaufen können. Ursächlich dafür ist eine Verkürzung der Chromosomenenden (Telomere) bei jeder Zellteilung [37]. Im Gegensatz dazu sind bei der Stress-induzierten Seneszenz äußere Einflüsse wie oxidativer Stress durch z. B. inflammatorische Zytokine [38] oder mitochondriale Dysfunktion [39] für den seneszenten Phänotyp der Zellen verantwortlich.

In seneszenten Zellen treten typische Veränderungen auf. Einerseits sezernieren seneszente Zellen eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen, zusammengefasst unter dem Begriff „*senescence associated secretory phenotype*“ (SASP) [34]. Der SASP beeinflusst die Mikroumgebung und kann zu Seneszenz-Induktion in benachbarten Zellen führen [40]. Andererseits sind die eigentlichen Funktionen seneszenten Zellen eingeschränkt, da ihre Proteine und Lipide z. B. durch ROS aus dysfunktionalen Mitochondrien beschädigt sind [41, 42].

Seneszenzmarker sind Proteine, die in seneszenten Zellen verstärkt exprimiert sind und mit deren Hilfe seneszente Zellen nachgewiesen werden können [34]. Dazu gehört u.a. der Zellzyklusinhibitor p21, der im Zellkern seneszenten Zellen akkumuliert [34, 43]. Ein weiterer Seneszenzmarker ist die Seneszenz-assoziierte Beta Galaktosidase (SA-betaGal), die aufgrund der erhöhten lysosomalen Aktivität verstärkt in seneszenten Zellen vorhanden ist [44].

Seneszenz wird eine große Bedeutung bei Alterungsprozessen zugeschrieben [45]. Es ist bekannt, dass Seneszenz ebenfalls in physiologischen Prozessen wie der Embryogenese [46, 47], der Tumorsuppression [48] und der Wundheilung [49] auftritt. Jedoch spielt die Akkumulation seneszenten Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung degenerativer Erkrankungen wie z.B. Typ 2 Diabetes [50], renaler Dysfunktion [51], Sarkopenie [52] und kardiovaskulären Erkrankungen [53].

Bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist die EZ-Seneszenz von wesentlicher Bedeutung, denn diese führt zu endothelialer Dysfunktion [54] und ist ein

Pathomechanismus der Atherosklerose [53]. Minamino et al. [55] konnten eine Häufung seneszenten EZ in atherosklerotischen Plaques beim Menschen nachweisen.

Senescente EZ weisen eine verminderte eNOS Proteinmenge und -aktivität auf und produzieren dadurch weniger NO [28, 56]. Des Weiteren produzieren senescente EZ mehr proinflammatorische und vasokonstriktorische Faktoren [54]. Senescente EZ besitzen außerdem eine höhere Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli [28].

1.4 Auswirkungen von Pflanzeninhaltsstoffen auf das kardiovaskuläre System

1.4.1 Curcumin

Curcumin ist ein Polyphenol aus der Curcumawurzel *Curcuma longa*, das seit Jahrtausenden in der traditionellen asiatischen Medizin eingesetzt wird [57]. Außerdem wird Curcumin als Gewürz und Lebensmittelfarbstoff (E100) verwendet.

Curcumin zeigt in Studien einen positiven Einfluss auf viele verschiedene chronische Erkrankungen, in denen Inflammation eine wichtige Rolle spielt [58]. Dazu gehören z. B. Alzheimer Demenz [59], Multiple Sklerose [60], Asthma [61], rheumatoide Arthritis [62], Colitis [63], Diabetes [64] und kardiovaskuläre Erkrankungen [65]. Des Weiteren besitzt Curcumin antibakterielle Eigenschaften [66] und zeigt therapeutisches Potenzial gegen Krebs [67].

Curcumin entfaltet seine Wirkung, indem es zahlreiche Signalwege moduliert. Unter anderem hemmt Curcumin den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF-κB) und senkt dadurch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine [68]. Außerdem induziert Curcumin antioxidative Systeme. Curcumin bewirkt die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), wodurch die Expression antioxidativer Systeme wie der Mangan-SOD, auch SOD2 genannt, erhöht wird [68]. SOD2 ist ein mitochondriales Enzym, das Superoxid zu dem weniger toxischen H₂O₂ entgiftet [33]. H₂O₂ kann dann von dem Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden [33]. Dadurch kann Curcumin den oxidativen Stress in Zellen reduzieren [68].

Bezogen auf die Entwicklung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen hat Curcumin vielfältige Effekte [65]. Erstens kann Curcumin zelluläre Seneszenz hinauszögern und damit verbundenen oxidativen Stress senken, wodurch endotheliale Dysfunktion

verringert wird [65]. Zweitens kann Curcumin die Adipositas-assoziierte Inflammation des Fettgewebes reduzieren und ein *beiging* von weißen Adipozyten induzieren, sodass der kardiovaskuläre Risikofaktor Übergewicht positiv beeinflusst wird [65]. Drittens kann Curcumin im Mausmodell die Entwicklung von Atherosklerose hemmen und bestehende atherosklerotische Plaques verkleinern [65]. Viertens kann Curcumin die Größe eines Myokardinfarkts reduzieren, unter anderem durch Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase und Hemmung von Inflammation, Apoptose, Proteasen und der Kollagensynthese [65].

Viele Studien zeigen, dass Curcumin die EZ-Funktion verbessert. In einer *in vitro* Studie von Kadam et al. [69] konnte Curcumin die Dysfunktion endothelialer Progenitorzellen (EPZ) durch Hochregulation von SOD2 rückgängig machen. Ouyang et al. [70] konnten zeigen, dass Curcumin in EZ den oxidativen Stress unter H₂O₂-Behandlung verringert. Fang et al. [71] haben nachgewiesen, dass Curcumin die ACh-induzierte EDD in isolierten Aortenringen von Ratten unter Behandlung mit hohen Dosen Glukose verbessert. Auch *in vivo* kann Curcumin die EZ-Funktion verbessern: In einer Studie von Fleenor et al. [72] verbesserte Curcumin die ACh-induzierte EDD in alten Mäusen. You et al. [73] konnten in einem Ischämiemodell des Hinterbeins bei Mäusen zeigen, dass Curcumin die EPZ-Funktion verbessert und so therapeutische Angiogenese induziert. Auch in klinischen Studien konnte Curcumin die EZ-Funktion verbessern: Oliver et al. [74] beobachteten eine Verbesserung der FMD nach 8-wöchiger Einnahme von Curcumin bei jungen gesunden Probanden. Des Weiteren konnten Santos-Parker et al. [75] bei mittelalten und älteren gesunden Probanden eine verbesserte ACh-induzierte EDD nach 12-wöchiger Einnahme von Curcumin feststellen.

Allerdings besteht in der Literatur Uneinigkeit bezüglich wirksamer bzw. toxischer Curcuminkonzentrationen. In einigen *in vitro* Studien wurden toxische Effekte von Curcumin auf EZ und EPZ in unterschiedlichen Konzentrationen von 2,5 µM bis 50 µM beobachtet [76-78], wohingegen mit den gleichen Konzentrationen in weiter oben genannten Studien positive Effekte beobachtet wurden. Unsere Arbeitsgruppe hat für EZ einen promigratorischen Effekt bei einer Curcuminkonzentration von 7,5 µM beobachtet [79]. Klinische Studien zu physiologischen Curcuminkonzentrationen und -dosierungen beim Menschen liefern bislang sehr heterogene Ergebnisse, vermutlich da Curcumin schlecht wasserlöslich ist, im Darm nur wenig resorbiert und in der Leber stark metabolisiert wird und somit eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit aufweist. Hinweise auf eine toxische

Wirkung beim Menschen nach Einnahme hoher Curcuminindosen gibt es bislang jedoch nicht. Des Weiteren wurden bereits verschiedene vielversprechende Methoden zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit entwickelt, wie zum Beispiel die Herstellung von Curcumin-Nanopartikeln oder die Bindung an Lipid-carrier [80].

Zusammenfassend verbessert Curcumin also die EZ-Funktion *in vitro*, *in vivo* und in klinischen Studien. Die effektiven Curcuminkonzentrationen und die zugrundeliegenden Wirkmechanismen sind jedoch bislang unklar.

1.4.2 Koffein

Koffein ist der Hauptwirkstoff von Kaffee, der am meisten konsumierten stimulierenden Substanz weltweit.

Kaffeekonsum ist in großen epidemiologischen Studien mit einer reduzierten kardiovaskulären Mortalität assoziiert [81, 82]. So konnten Freedman et al. [81] in einer Kohortenstudie mit über 400 000 Teilnehmern aus der US-Population eine Assoziation zwischen Kaffeekonsum und reduzierter allgemeiner und unter anderem kardiovaskulärer Mortalität feststellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Gunter et al. [82], die in einer Kohorte von über 500 000 Teilnehmern aus zehn europäischen Ländern eine Assoziation zwischen Kaffeekonsum und reduzierter allgemeiner und kardiovaskulärer Mortalität feststellen konnten. In weiteren Studien zeigte sich vor allem bei älteren Menschen ein starker Zusammenhang zwischen Kaffeekonsum und reduzierter kardiovaskulärer Mortalität [83-86]. Van Dongen et al. [87] fanden bei Patienten mit Myokardinfarkt ebenfalls eine Assoziation zwischen Kaffeekonsum und reduzierter kardiovaskulärer Mortalität. Metaanalysen zeigen eine nichtlineare, U-förmige Assoziation zwischen Kaffeekonsum und kardiovaskulärer Mortalität [88, 89]. Demnach ist die kardiovaskuläre Mortalität für moderaten Kaffeekonsum am niedrigsten (3-4 Tassen pro Tag [88] bzw. 2,5 Tassen pro Tag [89]).

Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten zeigen, dass Koffein die EZ-Funktion in Konzentrationen verbessert, die ungefähr der Koffeinserumkonzentration von Probanden nach Einnahme von 3-4 Tassen Kaffee entsprechen [90, 91]. Dafür hatte unsere Arbeitsgruppe die Koffein-Serumkonzentrationen beim Menschen nach Einnahme von 4 Tassen Kaffee bestimmt. Diese lag mit ca. 20-30 μM deutlich niedriger als die in den meisten *in vitro* Studien verwendeten Konzentrationen [90]. In Experimenten mit 50 μM Koffein wurde eine verbesserte Migration und mitochondriale Funktion von EZ und EPZ, sowie eine

verbesserte Reendothelisierung beobachtet [90]. Damit übereinstimmend wiesen Wang et al. [91] nach der Behandlung von EZ mit Koffein-Konzentrationen von 10 bis 50 μM eine erhöhte Teilung von Mitochondrien und eine verbesserte Angiogenese nach. *In vivo* konnte unsere Arbeitsgruppe nach Koffein-Gabe im Trinkwasser verringerte Infarktnarben bei prädiabetischen Mäusen feststellen [92]. Klinische Studien weisen darauf hin, dass Koffein die NO-Produktion von EZ verbessert: Eine Studie von Umemura et al. [93] zeigt eine verbesserte ACh-induzierte EDD nach Einnahme von 300 mg Koffein bei jungen gesunden Männern. Eine andere Studie von Shechter et al. [94] zeigt eine verbesserte FMD nach Einnahme von 200 mg Koffein bei Probanden mit und ohne kardiovaskuläre Erkrankungen und eine Reduktion inflammatorischer Marker im Plasma.

Die Wirkmechanismen von Koffein sind gegenwärtig noch nicht vollständig erforscht. Lange bekannte Wirkmechanismen von Koffein umfassen Calcium-Freisetzung, Inhibition von Phosphodiesterasen (PDE) und Antagonisierung von Adenosin-Rezeptoren [95]. Jedoch werden für die Calcium-Freisetzung und die Inhibition von PDE wesentlich höhere Koffein-Konzentrationen benötigt (über 500 μM bzw. 250-500 μM) [92, 95, 96], welche für Menschen letal wären [97]. Unsere Arbeitsgruppe hat einen neuen Wirkmechanismus von Koffein in physiologischen Konzentrationen gefunden. Koffein führt zur Phosphorylierung und mitochondrialen Translokation des Zellzyklusinhibitors p27, was in einer verbesserten mitochondrialen Funktion resultiert [92]. Außerdem ist mitochondrial lokalisiertes p27 für die EZ-Migration notwendig [92]. Ob Koffein die Regulation von Transkriptionsfaktoren in EZ beeinflusst, ist bisher unklar.

Wenige Studien haben bisher den Effekt von Koffein auf Seneszenz untersucht. Tao et al. [98] konnten zeigen, dass Koffein in hohen Konzentrationen von 0,5 bis 1 mM replikative Seneszenz verringert durch Hochregulation des Enzyms *telomerase reverse transcriptase* (TERT), welches die Telomere verlängert und somit die Anzahl möglicher Zellteilungen erhöht. Zhan et al. [99] konnten zeigen, dass Koffein H_2O_2 -induzierte Seneszenz in EZ verhindert durch Inhibition von *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), einem wichtigen Mediator der DNA-Schadensantwort *upstream* der Zellzyklusinhibitoren p53 und p21. Hierfür wurden allerdings hohe, unphysiologische Koffeinkonzentrationen von 0,1 bis 5 mM verwendet. Hingegen beobachteten Li et al. [100], dass niedrige Koffeinkonzentrationen $<10 \mu\text{M}$ Stress-induzierte Seneszenz in Hautzellen durch Aktivierung von Autophagie und Reduzierung von ROS inhibieren. Ob Koffein in physiologischen Konzentrationen Seneszenz in EZ verhindern kann, war bislang nicht erforscht und ist Teil dieser Arbeit.

1.5 Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3

Die Funktionalität einer Zelle beruht auf dem Zusammenspiel verschiedener Proteine, deren Expression fein abgestimmt und den aktuellen Bedingungen angepasst werden muss. Die Regulation der Genexpression in Eukaryoten, die hauptsächlich auf Ebene der Transkription stattfindet, benötigt verschiedene Klassen von Proteinen. Zunächst sind hier die drei RNA-Polymerasen zu nennen, die jeweils spezifische Gene transkribieren: Die RNA-Polymerase-I transkribiert ausschließlich Gene für ribosomale RNAs, die RNA-Polymerase-III u.a. Gene für Transfer-(t)-RNAs und andere kleine RNAs, die permanent in Zellen benötigt werden. Proteinkodierende Gene hingegen, deren Expression aus den oben genannten Gründen am stärksten reguliert werden muss, werden von der RNA-Polymerase-II transkribiert [101]. Zur Rekrutierung der RNA-Polymerasen an den Transkriptionsstart des jeweiligen Gens werden sogenannte generelle, aber für die jeweilige Polymerase spezifische, Initiationsfaktoren benötigt, die mit der Polymerase einen Präinitiationskomplex bilden [101]. Die Stärke der Expression eines Gens wird dadurch bestimmt, wie häufig sich dieser Präinitiationskomplex bilden kann. Dies wird über sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert, die damit in der Lage sind, die Expression einzelner Zielgene zu steuern und somit essenziell für die Zellfunktion sind. Jedes Gen enthält zahlreiche Bindungsstellen für verschiedene dieser Transkriptionsfaktoren. Dadurch erlaubt wiederum die Kontrolle der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, die Regulation ihrer Aktivität und deren Interaktion eine feine Regulation der Genexpression. Durch die Rekrutierung von Cofaktoren, die auch Histone kovalent modifizieren und damit die Chromatinstruktur beeinflussen können, sind sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren auch daran beteiligt, Bereiche des Genoms, die transkribiert werden müssen, zugänglich für RNA-Polymerasen zu machen [101].

Der sequenzspezifische Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 (GRHL3) ist ein Transkriptionsfaktor der evolutionär hochkonservierten Grainyhead-Familie [102, 103]. Diese wird in zwei Subfamilien unterteilt: Die eine Subfamilie besteht aus den Homologen des *Drosophila*-Proteins CP2 (CP2, LBP-1a und LBP-9), die andere aus den Homologen des *Drosophila*-Proteins Grainyhead (GRH) [102]. Namensgebend für die GRH-Transkriptionsfaktoren war die Beobachtung, dass ein Defekt des *grh*-Gens bei *Drosophila* zu einem defekten Kopfskelett (*grainy head*) und zu Hautdefekten während der Embryogenese führt [104]. Bei Säugetieren sind drei Homologe von GRH bekannt: GRHL1 bis -3 [102]. Die GRH-Homologe sind strukturell gleich aufgebaut: Sie besitzen alle eine N-

terminale Aktivierungsdomäne, eine zentrale DNA-Bindedomäne und eine C-terminale Dimerisierungsdomäne [102, 103, 105]. Die Dimerisierungsdomäne erlaubt bei Säugetieren die Bildung von Homo- oder Heterodimeren zwischen den GRH-Homologen [105].

Auch die Funktionen des Säugetier-Homologs GRHL3 wurden zuerst im Zusammenhang mit der Embryogenese beschrieben [106]. So führt ein Defekt von GRHL3 zu Neuralrohrdefekten bei der Maus [106] und zu kraniofazialen Fehlbildungen beim Menschen [107]. Des Weiteren wurde in Mäusen gezeigt, dass GRHL3 für die Hautintegrität [108] und Wundheilung [109, 110] benötigt wird, da GRHL3 notwendig für die Migration von Keratinozyten ist [109].

Im kardiovaskulären System hat GRHL3 eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der EZ-Funktion [111]. Guardiola-Serrano et al. [112] entdeckten GRHL3 2008 in einem Screening für Brustkrebs-Treibergene und zeigten, dass es die Migration von EZ fördert. Daraufhin konnte nachgewiesen werden, dass GRHL3 durch Aktivierung von eNOS die NO-Produktion von EZ steigert und dadurch NO-abhängig die Migration von EZ verstärkt und Apoptose vermindert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die NO-abhängige EZ-Migration abhängig von GRHL3 ist [111].

Menschliches GRHL3 hat 3 Isoformen, wovon Isoform 2 dem Maus-GRHL3 entspricht [102, 113]. Die Transkription der Isoformen 1 und 3 beginnt bei einem nur beim Menschen vorkommenden alternativen ersten Exon, wobei das zweite Exon bei Isoform 1 beibehalten und bei Isoform 3 durch alternatives Spleißen übersprungen wird. Somit entspricht Isoform 3 einer gekürzten Version von Isoform 1. Hingegen unterscheiden sich die Isoformen 1 und 2 nur in den ersten 11 Aminosäuren [102]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Isoform 1 und 2 ähnliche, protektive Effekte auf EZ haben, indem sie die NO-Produktion fördern. Hingegen hat Isoform 3 gegenteilige Effekte und reguliert vollkommen andere Gene [113].

Zusätzlich wurden in unserer Arbeitsgruppe extranukleäre Funktionen von GRHL3 entdeckt. Mithilfe einer GRHL3-Mutante, die nicht mehr im Zellkern lokalisiert war, konnte gezeigt werden, dass GRHL3 außerhalb des Zellkerns direkt mit eNOS interagiert und so die NO-Produktion und Migration von EZ steigern kann [114].

Zusammenfassend erfüllt der Transkriptionsfaktor GRHL3 eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der EZ-Funktion. Jedoch ist die Regulation von GRHL3 durch

Pflanzeninhaltsstoffe wie Curcumin oder Koffein oder in Stress-induzierter Seneszenz völlig unklar.

1.6 Ziele der Arbeit

Bisher ist nicht bekannt, ob Pflanzeninhaltsstoffe wie Curcumin oder Koffein den vasoprotektiven Transkriptionsfaktor GRHL3 regulieren. In vielen Studien wurde gezeigt, dass Curcumin [69-75, 115] und Koffein [90-94] die EZ-Funktion verbessern. GRHL3 nimmt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der EZ-Funktion ein [111]. Weiterhin reguliert Curcumin bekanntermaßen verschiedene Transkriptionsfaktoren [68]. Aus diesen Gründen liegt es nahe, dass Curcumin und Koffein ihre protektive Wirkung auf EZ über die Hochregulation von GRHL3 entfalten. Daher soll im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob Curcumin oder Koffein den Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ regulieren.

Des Weiteren ist nicht bekannt, ob sich die GRHL3-Regulation in seneszenten EZ von der in funktionalen EZ unterscheidet. Daher soll im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob GRHL3 in Stress-induzierter EZ-Seneszenz reguliert ist.

Außerdem ist bisher nicht bekannt, ob Koffein einen Einfluss auf die Entstehung von EZ-Seneszenz hat. EZ-Seneszenz spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen [53-55]. Kaffeekonsum ist mit reduzierter kardiovaskulärer Mortalität assoziiert, insbesondere bei älteren Menschen [81-89]. Aus diesem Grund könnte vermutet werden, dass Koffein EZ-Seneszenz verringert. Daher soll im dritten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob Koffein einen Einfluss auf EZ-Seneszenz hat und wie sich die GRHL3-Expression dabei verhält.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller
4',6-Diamidino-2-Phenylindol	Roche Diagnostics, Mannheim
Agarose Standard Roti®Garose	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose Ultra Pure™	Invitrogen / Life technologies, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Destilliertes Wasser, DNase/RNase-frei	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP-Mix) 10 mM	Invitrogen / Life technologies, Darmstadt
Dimethylformamid	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Größenstandard 1 kb Plus DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNA-Größenstandard GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einbettmedium ProLong™ Diamond Antifade Mountant	Invitrogen/ Life Technologies, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1 % (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
IGEPAL™ CA-630 1 % (v/v)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
KCl	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat -Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (v/v; 29:1) Rotiphorese®	Carl Roth, Karlsruhe
Oligonukleotid-Primer	Sigma Aldrich / Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phalloidin, CF® 488A	Biotium, California, USA

Phosphatase Inhibitor Cocktail A + B (100x)	BioTool, Kirchberg
Protease Inhibitor Cocktail (EDTA free) (100x)	BioTool, Kirchberg
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
Proteingrößenstandard Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™	BioRad, München
Q5® High GC Enhancer (5x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Q5® Reaktionspuffer (5x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Real-time</i> PCR Mastermix 2x primaQUANT qPCR-CYBR-Green-MasterMix	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
RNA Ladepuffer (6x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	Adefo, Dietzenbach
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth, Karlsruhe
Trichlormethan / Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Triton™ X-100	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
TRIzol® Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tween®20	Carl Roth, Karlsruhe
Western Blot Reagenz Amersham™ ECL™ start Western blotting detection reagent	GE Healthcare Life Sciences/ Amersham Biosciences, Freiburg
Western Blot Reagenz Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Zellkultur

Tabelle 2: Liste der für die Zellkultur verwendeten Chemikalien

Name	Hersteller
Curcumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Endotheliales BasalmEDIUM	Lonza, Köln
Endothelzell-Nährmedium <i>endothelial cell growth medium-2 BulletKit™ Single Quots</i>	Lonza, Köln
Fötales Rinderserum	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
H ₂ O ₂ 30 % (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen	Lonza, Köln

Koffein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung (0.5 %, w/v) 10x	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.3 Kits

Tabelle 3: Liste der verwendeten kommerziell erwerblichen Kits

Kit	Hersteller
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Liste der im Immunoblot verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-eNOS	Kaninchen	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
anti-GAPDH	Maus	1:50.000	Abcam, Cambridge, UK
anti-GRHL3	Kaninchen	1:1000	Millipore, Darmstadt
anti-Kaninchen-IgG (Meerrettichperoxidase-gekoppelt)	Esel	1:2500	GE Healthcare, Freiburg
anti-Maus-IgG (Meerrettichperoxidase-gekoppelt)	Schaf	1:2500	GE Healthcare, Freiburg
anti-p21	Kaninchen	1:500	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
anti-p27	Kaninchen	1:300	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
anti-p-p27 S10	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, UK
anti-α-Tubulin	Maus	1:25.000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 5: Liste der in der Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-eNOS	Maus	1:100	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
anti-Kaninchen-IgG Alexa Flour 594	Ziege	1:500	Invitrogen/ Life Technologies, Darmstadt
anti-Maus-IgG Alexa Flour 488	Ziege	1:500	Invitrogen/ Life Technologies, Darmstadt

anti-p21	Kaninchen	1:50	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
----------	-----------	------	---

2.1.5 Oligonukleotid-Primer

Tabelle 6: Liste der in der *real-time* PCR und Prä-Amplifikation verwendeten Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotid-Primer	Sequenz
hGRHL3 Ex04 for3	5'- TTGAGAGCATTCATGGGGTG -3'
hGRHL3 Ex06 rev3	5'- CTCGCCTGACTTGATGTGGAT -3'
hmRPL32 Ex02 for1	5'- GTGAAGCCCAAGATCGTCAA -3'
hmRPL32 Ex03 rev1	5'- TTGTTGCACATCAGCAGCAC -3'
hGRHL3 Ex04 for2	5'- AGCTACCTGTTACCCACCAC -3'
hGRHL3 Ex06 rev2	5'- ACTGGCCTTTGTTGAGGTAGG -3'

2.1.6 Geräte

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Systec DX-150	Systec, Linden
Autoklav Varioklav	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Autoradiographiekassette	Carl Roth, Karlsruhe
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetra	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop AxioVision Observer D1	Carl Zeiss, Oberkochen
Geldokumentationssystem INTAS Gel iX Imager	Royal Biotech, Frankfurt
Inkubator Heraeus HERAccl 240i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lichtmikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Magnetrührer pyro-mag stir	Cenco, Breda, Niederlande
Magnetrührer Yellow line MSC basic C	IKA, Staufen
Mikroliterspritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda Königshofen
Orbitalschüttler HS260 basic	IKA, Staufen
Orbitalschüttler Sky Line DOS-20L	ELMI, Riga, Lettland
pH-Meter SevenGo™	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipette BioPette™ autoclavable und BioPette™ PLUS 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Labnet, New Jersey, USA
Pipette Eppendorf Research 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe Pipetboy 2	Integra, Biebertal
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
<i>Real-time</i> PCR Cycler Rotor Gene Q	Qiagen, Hilden
Spannungsquelle Elektrophoresis Power Supply EV202	PeqLab, Erlangen
Spannungsquelle Power Pac™ 1000, Power Pac™ 200 und Power Pac™ Universal	BioRad, München
Spektralphotometer EMC-11-UV	Emclab, Duisburg
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000c	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sterilwerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Thermocycler MyCycler™	BioRad, München
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer REAX top	Heidolph, Schwabach
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage 440-43N	Kern & Sohn, Baldingen-Frommern
Waage HR-100AZ	A&D Company, Limited, Tokyo, Japan
Waage XS205	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q®	Merck Millipore, Darmstadt
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Combi-Spin FVL-2400N	PeqLab, Erlangen
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge Mikro 22R und Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen

2.1.7 Labormaterialien

Tabelle 8: **Liste der verwendeten Labormaterialien**

Material	Hersteller
6-well-Platten CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen (24 x 24 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm® M	Bemis Company, Wisconsin, USA
Pasteurpipetten	Faust Lab Science, Klettgau
PCR 0,1 ml 4er-Röhrchen und 4er-Deckel	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	StarLab, Hamburg
Plastikküvetten, Halb-Mikro	Sarstedt, Nümbrecht
Protein LoBind Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
PVDF-Blottingmembran 0,45 µm	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäß 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß 15 ml, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Röntgenfilm Fujifilm Super RX-N	Fujifilm Europe, Düsseldorf

Serologische Pipetten 2 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Whatman™-Filterpapier	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturflasche CELLSTAR® T75	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 35 mm, 60 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung primärer humaner Endothelzellen

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) von der Firma Lonza (Köln) wurden in vollständigem endothelialem Basalmedium (*endothelial basal medium*, EBM) kultiviert (Tabelle 9). Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C in einer angefeuchteten und mit 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre in T75-Zellkulturflaschen inkubiert. In der dritten Zellpassage wurden die Zellen auf Zellkulturschalen oder 6-*well*-Platten ausgebracht.

Für das Ausbringen der Zellen wurden diese nach Absaugen des Zellkulturmediums mit 6 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (*Phosphate-buffered saline*, PBS) gewaschen. Das PBS wurde entfernt und die Zellen mit 2 ml 1x Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst (Tabelle 9). Der Ablösungsprozess wurde anhand der Abrundung der Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet und bei ungefähr 90 % Zellabrundung mit 8 ml Zellkulturmedium abgestoppt. Mit einem Zellkulturschaber wurden die Zellen vollständig abgelöst und anschließend durch Resuspendieren vereinzelt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und wie in Abb.1 dargestellt wurden die vier großen Eckquadrate der Kammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

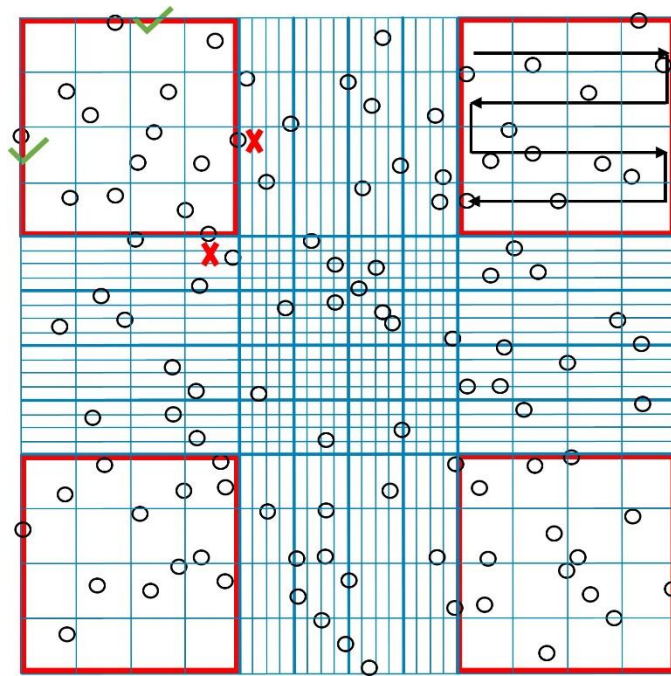


Abb. 1: **Auszählen einer Neubauer-Zählkammer.** Die 4 Eckquadrate mit jeweils 16 Einzelquadraten wurden mäanderförmig ausgezählt. Von den Zellen auf den Außenlinien wurden nur die auf der oberen und linken Linie gezählt. Nur einzelne Zellen wurden gezählt. (einzelne Elemente der Abb. stammen von smart.servier.com).

Da die vier Eckquadrate der Zählkammer ein definiertes Volumen von jeweils 10^{-4} ml besitzen, wurde die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl gesamt}}{\text{Anzahl der gezählten Eckquadrate}} \times 10^4 / \text{ml} = \text{Zellen/ml}$$

Die vorliegende Zellkonzentration wurde anschließend durch Zugabe von EBM an die gewünschte Zellzahl des jeweiligen Experiments angepasst. Für Kurzzeit-Versuche wurden jeweils $2,3 \times 10^5$ Zellen pro Schale in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Für Langzeit-Versuche wurden jeweils 1×10^5 Zellen pro Schale in 6 cm Zellkulturschalen bzw. jeweils 4×10^4 Zellen pro well auf angeätzten Deckgläschen in 6-well-Platten ausgesät.

Tabelle 9: **In der Zellkultur verwendetes Medium und verwendete Lösungen**

Medium/ Lösung	Zusammensetzung
Vollständiges endotheliales Basalmedium	EBM 1 µg/ml Hydrocortison 12 µg/ml Rinderhirnextrakt 50 µg/ml Gentamicin 50 ng/ml Amphotericin B 10 ng/ml Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 10 % (v/v) Fötales Rinderserum
10x Trypsin-EDTA-Lösung	0,5 % (w/v) Trypsin

	0,2 % (w/v) EDTA 145 mM NaCl Die 10x-Lösung wurde vor Gebrauch mit PBS auf 1x verdünnt.
--	---

2.2.1.2 Behandlung der Endothelzellen

Die Behandlung der Zellen und die Herstellung der Behandlungslösungen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Zellkulturschalen bzw. 6-*well*-Platten mit den unbehandelten Kontrollen wurden während der Behandlungszeit aus dem Inkubator genommen, um einen Unterschiedseffekt zu den behandelten Zellen durch die kurzzeitige Änderung der Umgebungsbedingungen auszuschließen.

In Kurzzeit-Versuchen mit Curcumin wurden die Endothelzellen mit 7,5 μM Curcumin behandelt und für 24 h inkubiert (siehe 3.1.1). Dafür wurde Curcumin in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, um eine 7,5 mM Stammlösung zu generieren. Diese wurde bei der Behandlung 1:1000 verdünnt. Die Kontrollen wurden mit DMSO behandelt.

Für Kurzzeit-Versuche mit Koffein wurden die Endothelzellen wie in 3.1.2 beschrieben mit 50 μM Koffein behandelt und 24 h inkubiert. Hierfür wurde eine 50 mM Koffein-Lösung hergestellt, die bei der Behandlung 1:1000 im Zellkulturmedium verdünnt wurde. Um Koffein in EBM zu lösen, wurde der Ansatz zuvor für 2 h auf einem Orbitalschüttler bei Raumtemperatur und 300 Umdrehungen pro Minute (Upm) inkubiert.

Langzeit-Versuche wurden jeweils über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt, wie in 3.2 – 3.3 beschrieben. Alle 2 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die jeweilige Behandlung der Zellen erfolgte 2 h nach dem Mediumwechsel.

Um stressinduzierte Seneszenz zu erzeugen, wurden die Endothelzellen jeden zweiten Tag mit 50 μM H_2O_2 behandelt (siehe 3.3). Hierfür wurde eine H_2O_2 -Stammlösung mit destilliertem Wasser auf 50 mM und bei der Behandlung anschließend noch einmal 1:1000 im Zellkulturmedium verdünnt. Nach Öffnung des H_2O_2 -enthaltenden Reaktionsgefäßes wurden die nachfolgenden Schritte unverzüglich durchgeführt, um einen Zerfall der Substanz zu vermeiden. In den Langzeit-Versuchen wurden die Zellen mit 10 μM Koffein behandelt (siehe 3.3). Hierfür wurde Koffein analog dem oben beschriebenen Vorgehen gelöst.

2.2.1.3 Zellernte

Bei der Zellernte wurden die Endothelzellen mit einem Zellkulturschaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Die Zellkulturschalen standen dabei auf Eis und die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellkulturschalen wurden einmal mit gekühltem PBS gefüllt, die verbliebenen Zellen nochmals mit dem Zellkulturschaber abgelöst, und diese Zellsuspension dem Reaktionsgefäß mit den zuvor abgelösten Zellen hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 800 xg für 9 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 800 µl gekühltem PBS resuspendiert, in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut unter den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und der Waschschritt noch einmal in demselben Reaktionsgefäß wiederholt. Zum Schluss wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet entweder bei -80 °C gelagert oder unmittelbar für Experimente weiterverwendet.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Zellyse

Um die Zellen zu lysieren, wurde RIPA-(*radioimmunoprecipitation-assay*)-Puffer (Tabelle 10) mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren genutzt. Die Protease- und Phosphatase-Inhibitoren wurden dem Puffer den Herstellerangaben entsprechend unmittelbar vor Verwendung 1:100 verdünnt hinzugefügt. Die Menge des Lysepuffers entsprach dem 2- bis 2,5-fachen Volumen des Zellpellets. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Zellen in diesem resuspendiert und die Suspension 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 16.000 xg und 4 °C für 15 min, anschließend wurde das im Überstand befindliche Lysat in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Direkt im Anschluss wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 2.2.2.2). Die Lysate wurden bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 10: Zur Zellyse verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM TRIS-HCl pH 8,0 1 % (v/v) IGEPAL™ CA-630 150 mM NaCl 0,1 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Desoxycholat

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Lysaten wurde spektralphotometrisch mit Hilfe des *protein assay dye reagent* bestimmt. Das Prinzip basiert auf einem durch Bindung an Proteine verursachten Farbumschlag des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von einer Wellenlänge von 470 nm zu 595 nm. Hierfür wurde in einer Plastikküvette 1 µl bzw. 0,5 µl des Lysats in 800 µl dH₂O verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl des Bradfordreagenz wurde die Probe durch Invertieren vermischt und anschließend 5 min inkubiert. Ein Ansatz mit 1 µl bzw. 0,5 µl des Lysepuffers diente als Nullprobe für die Messung. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen, wobei alle Lysate als Duplikate gemessen und ein Mittelwert gebildet wurde. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer zuvor erstellten Kalibrierungsgerade berechnet.

2.2.2.3 Natriumdodecylsulfat (*Sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden mithilfe von Natriumdodecylsulfat (*Sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das im Gel vorhandene SDS sorgt durch Bindung an die Proteine für eine einheitliche negative Ladung und führt damit zu einer einheitlichen Wanderungsrichtung der Proteine im elektrischen Feld. Das Gel bildet eine Gitternetzstruktur, in der Proteine mit niedrigem Molekulargewicht schneller wandern als Proteine mit hohem Molekulargewicht.

Die für die SDS-PAGE verwendeten Gelsysteme bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels wurde anhand des Molekulargewichts des Zielproteins gewählt (10-14 %). Als erstes wurde das Trenngel gegossen (siehe Tabelle 11), Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) wurden zuletzt hinzugegeben, um die Polymerisationsreaktion zu starten. TEMED dient hierbei als Katalysator und APS als Starter der Radikalkettenreaktion. Die Lösung wurde dann sofort zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Die Dicke des Gels wurde durch die Abstandshalter der Grundplatte bestimmt. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde die Lösung für das Sammelgel vorbereitet (Tabelle 11), APS und TEMED wurden wiederum im letzten Schritt hinzugefügt. Die Isopropanol-Schicht wurde vom Trenngel entfernt, das Sammelgel oben auf das erhärtete Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt, um Geltaschen für die Proben zu erzeugen. Nach Aushärtung des Sammelgels wurde das Gel in einer vertikalen Mini-PROTEAN® Tetra

Elektrophoresekammer fixiert. Die Kammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt und die Kämme entfernt (Tabelle 11).

Das benötigte Lysatvolumen für die gewünschte Proteinmenge wurde zusammen mit dem Laemmli-Puffer (Tabelle 11) in ein Reaktionsgefäß pipettiert; bei Bedarf wurde das Probenvolumen zuvor mit RIPA-Puffer angeglichen. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben 5 min bei 95 °C inkubiert, bevor sie mit einer Hamilton-Pipette in die Probentaschen des Sammelgels gegeben wurden. Als Größenmarker diente der Marker Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, der parallel zu den Proben geladen wurde.

Zunächst wurden die Proteine bei einer Feldstärke von 8,4 V/cm an der Grenze von Sammel- und Trenngel konzentriert und anschließend bei einer Feldstärke von 10,5 V/cm aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Trenngel für einen Immunoblot verwendet (2.2.2.4).

Tabelle 11: Für die Natriumdodecylsulfat (*Sodium dodecyl sulfate*)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer (5x)	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 250 mM DTT 0,01 % (w/v) Bromphenolblau Der Puffer wurde in der Probe 1:5 auf 1x Konzentration verdünnt.
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS Der Puffer wurde kurz vor Gebrauch 1:10 auf 1x Konzentration verdünnt.
Trenngel (10-14 %)	10-14 % (v/v) Acrylamid/Bis-Lösung 390 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) APS 0,04 % (v/v) TEMED
Sammelgel (5 %)	5 % (v/v) Acrylamid/Bis-Lösung 126 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED

2.2.2.4 Immunoblot

Nach der Separation der Proteine durch die SDS-PAGE wurde ein Immunoblot durchgeführt, um spezifische Proteine durch Antikörperbindung nachzuweisen. Hierfür wurden die Proteine aus dem Trenngel in einem elektrischen Feld zunächst auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran übertragen. Die Membran wurde zuvor 90 s in Methanol aktiviert und kurz in dH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Blotschwämme, Whatman™-Filterpapier, Trenngel und die Membran in Transferpuffer äquilibriert und wie in Abb. 2: dargestellt zu einem Sandwich zusammengesetzt. Abhängig vom Molekulargewicht des jeweiligen Zielproteins wurden verschiedene Transferpuffer eingesetzt (für Proteine < 75 kDa ohne SDS, für Proteine > 75 kDa mit SDS) (Tabelle 12). Waren Zielproteine verschiedener Größe auf einem Trenngel, wurde dieses vorsichtig horizontal zerschnitten und die beiden Teile in unterschiedlichen Transferpuffern gebロットet. Das Sandwich wurde in einen Mini Trans-Blot® *blotting*-Tank eingesetzt und dieser mit dem jeweiligen, eisgekühlten Transferpuffer gefüllt. Dem Tank wurden ein Kühlpack und ein Magnetrührfisch hinzugefügt. Der Proteintransfer erfolgte für 3 h bei einer Spannung von 100 V für Proteine < 75 kDa und bei 80 V für Proteine > 75 kDa. Der Tank stand hierbei auf einem Magnetrührer in einem 4 °C kalten Raum.

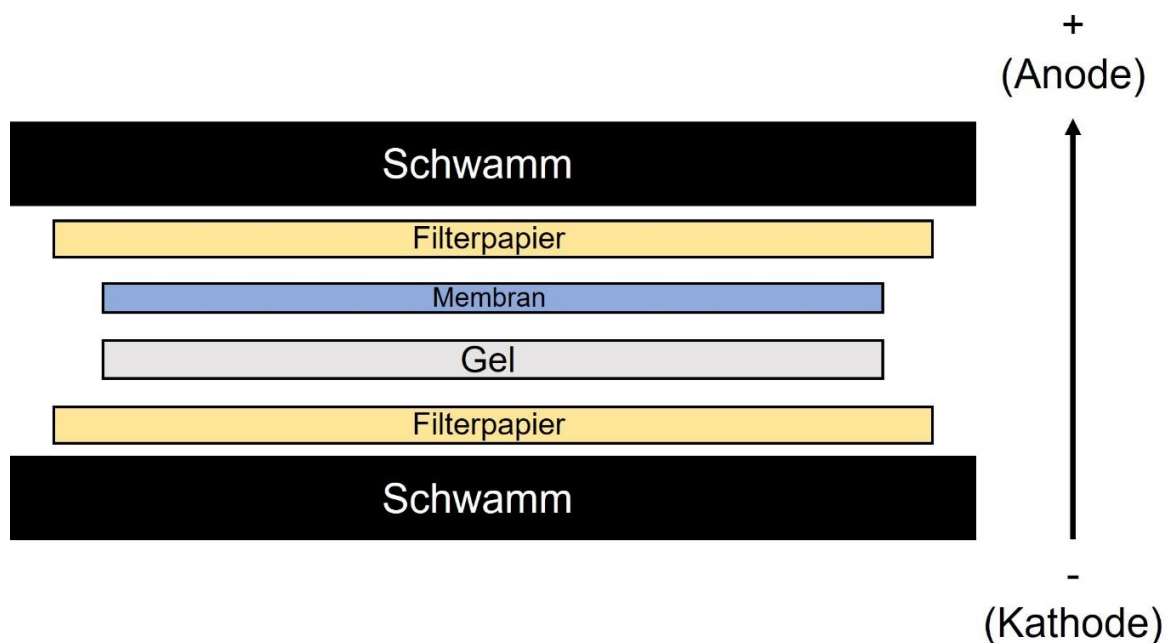


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Immunoblot-Sandwich.

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween®-20 (TBS-T) gewaschen (Tabelle 12) und im Folgenden für 1 h in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T auf einem Orbitalschüttler bei Raumtemperatur und 60 Upm geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen an die Membran zu verhindern. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert, welcher in 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verdünnt wurde (Tabelle 4). Gab es mehrere Zielproteine auf einer Membran, wurde diese geschnitten und die Membranstücke einzeln mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrte in TBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur, bevor der ebenfalls in 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verdünnte Sekundärantikörper hinzugegeben wurde (Tabelle 4). Der Sekundärantikörper richtet sich gegen den Spezies-spezifischen konstanten Teil des Primärantikörpers und ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte über 2 h auf einem Orbitalschüttler bei 60 Upm und Raumtemperatur, gefolgt von drei weiteren Waschschrten wie oben beschrieben.

Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde das Amersham™ Enhanced Chemiluminescence™ (ECL) Western Blot Reagenz entsprechend den Herstellerangaben verwendet, für eine sensitivere Detektion das Pierce™ ECL Plus Western Blot Reagenz. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase reagiert mit dem Western Blot Reagenz und erzeugt so ein Lichtsignal, das mithilfe eines Röntgenfilms aufgezeichnet wird. Dafür wurde die Membran nach der Inkubation mit dem jeweiligen Detektionsreagenz in einer Klarsichtfolie in eine Autoradiographie-Kassette gelegt und anschließend in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf der Membran platziert. Es wurden jeweils mehrere Filme mit unterschiedlichen Belichtungszeiten angefertigt, um unterschiedliche Graustufen des Signals zu erhalten. Die Entwicklung und Fixierung des Films erfolgten ebenfalls in der Dunkelkammer. Hierbei wurde der Film jeweils nach dem Entwicklungsprozess bzw. nach der Fixierung kräftig mit Wasser gespült. Anschließend folgten semiquantitative Analysen der eingescannten Filme mit dem Programm ImageJ (Version 1.53k).

Tabelle 12: Im Immunoblot verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer mit SDS (für Proteine > 75 kDa)	48 mM Tris 386 mM Glycin 0,05 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol

Transferpuffer ohne SDS (für Proteine < 75 kDa)	24 mM Tris 193 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Tris-gepufferte Salzlösung + Tween®-20 (TBS-T)	50 mM Tris-HCl, pH 8 150 mM NaCl 5 mM KCl 0,1 % (v/v) Tween®-20
Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
Antikörper-Puffer	1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde angewendet, um die relative Menge bestimmter Proteine und deren Lokalisation in fixierten Zellen darzustellen. Hierzu wurde ein spezieller Primärantikörper verwendet, der an das jeweilige Zielprotein bindet. In einem zweiten Schritt wurde der Primärantikörper von einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert, der sich gegen den Spezies-spezifischen konstanten Teil des Primärantikörpers richtet. Im Falle zweier nachzuweisender Zielproteine müssen die Primärantikörper dementsprechend von verschiedenen Spezies stammen.

Die Zellen wurden in 6-*well*-Platten auf Deckgläschen kultiviert, wie in 2.2.1 beschrieben. Vor der Fluoreszenzfärbung der Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen und mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend folgten drei Waschschrte à 5 min mit PBS. Die Zellen wurden dann für 15 min bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung aus 3 % (v/v) Ziegenserum (NGS, *normal goat serum*) und 0,3 % (v/v) Triton-X-100 in PBS inkubiert. Triton-X-100 macht die Zellmembran permeabel für die Antikörper, während das NGS unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C mit den in 1 % (v/v) Ziegenserum verdünnten Primärantikörpern (Tabelle 5) gegen die jeweiligen Zielproteine koinkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten à 5 min mit PBS wurden die Zellen lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur mit den zuvor in PBS verdünnten Sekundärantikörpern (Tabelle 5) koinkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS à 5 min. Um das Zytoskelett anzufärben, wurden die Zellen zusätzlich für 20 min bei Raumtemperatur mit Fluorophor-gekoppeltem Phalloidin (488 nm) in einer Verdünnung von 1:70 in PBS inkubiert. Darauf folgten drei weitere Waschschrte wie beschrieben. Zum Schluss wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-

Phenylindol (DAPI) in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml in PBS für 5 min bei Raumtemperatur angefärbt. Nach drei weiteren Waschschritten wie beschrieben wurden die Deckgläschen mit den angefärbten Zellen mit Prolong™ Diamond Antifade Mountant auf Objektträgern eingedeckt und nach dem Trocknen lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Alle Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop AxioVision Observer D1 von Zeiss in einer 400x Vergrößerung durchgeführt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolierung

Die folgenden Schritte wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt, um eine Degradation der RNA zu vermeiden. Dafür wurden alle Materialien und Arbeitsoberflächen vor Gebrauch mit Ethanol gereinigt und stets mit Handschuhen gearbeitet; außerdem wurde ausschließlich RNase-freies Wasser verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Zellen in TRIzol lysiert und anschließend wurde die RNA mithilfe des RNeasy Mini Kit isoliert.

Um die Zellen zu lysieren, wurden die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Sollte eine Zellkulturschale pro Ansatz lysiert werden, wurden 700 µl TRIzol hinzugegeben, für zwei Zellkulturschalen wurden 500 µl TRIzol in jede der Schalen gegeben. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde die Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, wobei Suspensionen eines Ansatzes zusammengeführt wurden. Anschließend wurden die Suspensionen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und entweder bei -80 °C gelagert oder direkt im Anschluss weiterverarbeitet.

Zur Aufreinigung der RNA wurde 300 µl Wasser-gesättigtes Chloroform zu der Probe gegeben und nach 15 s Invertieren für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 12000 xg für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die die RNA enthaltende obere, klare Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde das gleiche Volumen 70 % Ethanol zugegeben und gemischt. Bis zu 700 µl der Probe wurden auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und bei 12000 xg für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die RNA wird hierbei von dem Säulenmaterial gebunden. Betrug das Probenvolumen mehr als 700 µl, wurde das Auffanggefäß geleert und der obige Schritt mit der verbleibenden Lösung wiederholt. Die anschließenden Waschschrritte wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Zuletzt wurde die RNA in 25 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde im Folgenden mit dem NanoDrop™

2000c Spektrophotometer gemessen (siehe 2.2.3.2) und mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde die RNA auf Integrität geprüft (siehe 2.2.3.5). Die RNA-Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop™ 2000c Spektrophotometer ermittelt. Nach Leermessung mit RNase-freiem Wasser wurden 1,5 µl der RNA-Lösung auf den Messsockel gegeben, das Absorptionsspektrum von 220 nm bis 350 nm aufgenommen und die Messwerte bei 230 nm, 260 nm und 280 nm tabellarisch ausgegeben, wobei 260 nm das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren darstellt. Da eine Absorption von 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl entspricht, konnte die RNA-Konzentration der Probe auf diese Weise berechnet werden. Um die Reinheit der RNA zu prüfen, wurden Quotienten aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) sowie bei 260 nm und 230 nm (A_{260}/A_{230}) gebildet. Der Quotient A_{260}/A_{280} sollte $\sim 2,0$ betragen, A_{260}/A_{230} sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Abweichende Werte deuten auf eine Kontamination mit z.B. Kohlenhydraten oder Proteinen hin.

2.2.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde 1 µg RNA eingesetzt.

2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der enzymatischen Amplifikation von DNA mit einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Die drei Amplifikationsschritte Denaturierung, *annealing* und Elongation werden hierbei in mehreren Zyklen wiederholt, sodass sich die DNA-Menge exponentiell erhöht. Hierfür sind verschiedene Temperaturen notwendig: Bei 95 °C werden die DNA-Doppelstränge thermisch aufgetrennt (Denaturierung), sodass sich in der zweiten Phase bei ca. 60 °C die Primer anlagern können (*annealing*), welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt begrenzen. Die gewählte *annealing*-Temperatur ist dabei abhängig von der Sequenz der gewählten Primer. In der dritten Phase erzeugt die DNA-Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum von 72 °C ausgehend von den 3'-Enden der Primer Kopien der DNA (Elongation). Je nach Art der Analyse wird zwischen einer Endpunkt-PCR und einer *real-time* PCR unterschieden. Bei der Endpunkt-PCR erfolgt die Analyse der

Amplifikationsprodukte nach einer definierten Anzahl an Zyklen, während bei der *real-time* PCR der Fortschritt der Amplifikation nach jedem Zyklus erfasst wird.

2.2.3.4.1 Prä-Amplifikation

Eine Prä-Amplifikation kann zum Nachweis von Transkripten niedrig exprimierter Gene genutzt werden [116]. Dabei handelt es sich um eine Endpunkt-PCR, jedoch mit wesentlich weniger Zyklen und ohne Analyse der Amplifikationsprodukte. Diese werden anschließend einer *real-time* PCR zugeführt. Da das Gen für den Transkriptionsfaktor GRHL3 nur sehr niedrig exprimiert ist, wurde, um das Transkript in der semiquantitativen *real-time* PCR nachweisen zu können, zunächst eine Anreicherung mittels Prä-Amplifikation mit GRHL3-spezifischen Primern durchgeführt. Diese wurde mit der Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase und 1 µl cDNA als *template* durchgeführt (Reaktionsansatz siehe Tabelle 13). Die Primer wurden hierbei so gewählt, dass das entstehende DNA-Fragment die Zielsequenzen für die GRHL3 Primer der im Folgenden durchgeführten *real-time* PCR beinhaltete. Die Probe durchlief 15 Amplifikationszyklen in einem Thermocycler, wie in Tabelle 14 beschrieben.

Tabelle 13: Reaktionsansatz der GRHL3 Prä-Amplifikation

Komponente	Volumen (Gesamtvolumen 50 µl)
Nuklease-freies Wasser	25,5 µl
Q5® High GC Enhancer 5x	10 µl
Q5® Reaktionspuffer 5x	10 µl
Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	1 µl
hGRHL3 Ex04 for2 (10 µM)	1 µl
hGRHL3 Ex06 rev2 (10 µM)	1 µl
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
cDNA	1 µl

Tabelle 14: Temperatur-Protokoll der GRHL3 Prä-Amplifikation

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
<i>hot start</i>	94 °C	5 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 s	15x
<i>annealing</i>	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1x
<i>holding</i>	4 °C	∞	1x

2.2.3.4.2 Semiquantitative *real-time* PCR

Bei einer semiquantitativen *real-time* PCR wird die exponentielle Amplifikation der cDNA in Echtzeit aufgezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür die Inkorporation des Fluoreszenzfarbstoffs SYBRgreen genutzt, dessen Fluoreszenz sich nach Inkorporation in doppelsträngige DNA um bis zu 1000 x erhöht, so dass diese als Maß für die Menge an doppelsträngigem Amplifikationsprodukt genutzt werden kann. Hierfür wurde der 2x primaQUANT qPCR-CYBR-Green-MasterMix entsprechend den Herstellerangaben mit einem Rotor-Gene® Q Thermocycler verwendet. Zunächst wurde ein 1:1 Mix aus *forward* und *reverse* Primer erstellt und anschließend mit dem 2x primaQUANT qPCR-CYBR-Green-MasterMix kombiniert, wie in Tabelle 16 dargestellt. Jeweils 15 µl dieses Ansatzes wurde in ein 0,1 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und um 5 µl verdünnte cDNA ergänzt (Tabelle 16). Von allen Proben wurden Duplikate erstellt. Pro verwendetem Primerpaar diente ein Ansatz mit 5 µl Nuklease-freiem Wasser als Negativkontrolle. Das verwendete Temperatur-Protokoll ist in Tabelle 17 dargestellt. Das Fluoreszenzsignal wurde nach jedem Amplifikationszyklus aufgezeichnet, wobei die Stärke des Signals als Maß für die vorliegende DNA-Menge dient und damit Rückschlüsse auf die ursprüngliche Transkriptmenge zulässt. Für die semi-quantitative Auswertung wird der sogenannten Ct-Wert (*cycle threshold*) genutzt, der den Zyklus beschreibt, in dem das Signal erstmals einen definierten Schwellenwert (*threshold*) übersteigt. Als Referenz wird stets parallel mit der gleichen cDNA eine *real-time* PCR eines Transkripts durchgeführt, dessen Gen konstant exprimiert ist und durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird (ein sogenanntes *housekeeping*-Gen). Für die Versuche dieser Arbeit wurde dafür das Gen für das ribosomale Protein L32 (RPL32) verwendet.

Tabelle 15: In der semiquantitativen *real-time* PCR verwendete Primer und Größe der Amplifikationsprodukte

Gen	Primer	Größe der Amplifikationsprodukte
GRHL3	hGRHL3 Ex04 for3/ hGRHL3 Ex06 rev3	203 Basenpaare
RPL32	hmRPL32 Ex02 for1/ hmRPL32 Ex03 rev1	257 Basenpaare

Berechnet man die Differenz der Ct-Werte (ΔCt) des zu untersuchenden Transkripts und des *housekeeping*-Transkripts, sind damit Rückschlüsse auf die relative Genexpression und damit Vergleiche der Expression des Zielgens zwischen verschiedenen Proben möglich [117].

$$2^{-(\overline{Ct}_{\text{Zielgen}} - \overline{Ct}_{\text{RPL32}})} = \text{relative Transkriptmenge des Zielgens}$$

Die Daten aus dem PCR-Lauf wurden mit der Rotor-Gene® Q Software von Qiagen ausgewertet. Aus den Ct-Werten der experimentellen Duplikate wurde der Mittelwert gebildet, bei Abweichungen > 0,5 Zyklen wurde die PCR für diesen Ansatz wiederholt.

Um zu überprüfen, ob ein homogenes Amplifikationsprodukt entstanden war, wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Dabei wird die Temperatur in 0,2 °C-Schritten von 50 °C auf 95 °C erhöht, wodurch die DNA in Einzelstränge getrennt und der Fluoreszenzfarbstoff frei wird, was zu einer Erniedrigung der Fluoreszenz führt. Bei der Auftragung der Fluoreszenzänderung gegen die Temperatur erhält man eine Schmelzkurve, die – wenn nur ein Produkt entstanden war – einen definierten *peak* aufweist. Da dieser allerdings keinen Rückschluss auf die Größe des Amplifikationsprodukts zulässt, wurde das amplifizierte Produkt mittels Agarose-Gelelektrophorese hin überprüft (siehe unten).

Tabelle 16: Reaktionsansatz der semiquantitativen Echtzeit-PCR

Komponente	Volumen (Gesamtvolumen 20 µl)
2x primaQUANT qPCR-CYBR-Green-MasterMix	10 µl
Nuklease-freies Wasser	3 µl
<i>forward</i> Primer (10 µM)	1 µl
<i>reverse</i> Primer (10 µM)	1 µl
cDNA	5 µl Die präamplifizierte cDNA wurde vor Gebrauch 1:2,5 für GRHL3 und 1:37,5 für RPL32 verdünnt.

Tabelle 17: **Temperatur-Protokoll der semiquantitativen Echtzeit-PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
<i>hot start</i>	95 °C	7 min	1x
Denaturierung	95 °C	10 s	50x
<i>annealing</i>	60 °C	15 s	
Elongation	72 °C	20 s	

2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dazu, Nukleinsäurefragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, welche aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld wandern. Das Verfahren wurde sowohl zur Überprüfung der RNA-Integrität, als auch im Anschluss an eine semiquantitative Echtzeit-PCR zur Kontrolle der resultierenden Fragmentlänge angewendet.

Für die Gelelektrophorese von RNA wurde RNase-freies Wasser zur Herstellung von TAE und RNase-freier Agarose verwendet. Zur Anfertigung von 0,8 % (RNA-Isolierung) bzw. 2 % (*real-time* PCR) Agarose-Gelen wurde die benötigte Menge Agarose in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (Tabelle 18) durch Aufkochen in einer Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde diese in einen horizontalen Gelschlitten mit passenden Kämmen gegossen und der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid wurde in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und eingerührt. Das ausgehärtete Gel wurde mit 1x TAE bedeckt und die Kämmen vorsichtig entfernt. Vor dem Beladen des Gels wurden den Proben 1/5 ihres Volumens an 6x RNA- bzw. 6x DNA-Ladepuffer zugesetzt (Tabelle 18). Als Größenmarker diente ein parallel zu den Proben geladener Mix aus Nukleinsäurefragmenten definierter Größen, angepasst an die Länge der untersuchten Fragmente wurden zwei verschiedene Größenmarker verwendet (für Fragmente größer als 1000 Basenpaare die 1 kb Plus DNA Ladder von New England Biolabs, für Fragmente kleiner als 1000 Basenpaare die GeneRuler Low Range DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific). Für die Gelelektrophorese wurde eine Feldstärke von 4-7 V/cm angewendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde mithilfe eines UV-Transilluminators die RNA bzw. DNA anhand der Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht; zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert.

Tabelle 18: In der Agarose-Gelelektrophorese verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller
50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	2 M Tris Base 5 % (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,3 Der Puffer wurde vor Gebrauch auf 1x verdünnt.
6x DNA-Ladepuffer	30 % (v/v) Glycerin 60 mM Tris-HCl, pH 7,4 60 mM EDTA 0,05 % (w/v) Orange G 0,05 % (w/v) Xylencyanol FF
6x RNA-Ladepuffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.2.4 Statistische Auswertung

Von den Messergebnissen der biologischen Replikate wurde das arithmetische Mittel gebildet. Gegebenenfalls wurde der Mittelwert der unbehandelten Kontrolle zu 1 und die Mittelwerte der anderen Ansätze dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test bestätigt, die Homogenität der Varianzen mit dem Levene-Test. Für die statistischen Analysen wurde ein gepaarter t-Test verwendet, das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Beim Vergleich mehrerer Behandlungsgruppen wurde ein einseitiger ANOVA mit dem post-hoc Tukey LSD Test angewendet. Die Fehlerindikatoren in den Diagrammen beschreiben den Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM).

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Pflanzeninhaltsstoffen auf GRHL3

3.1.1 Einfluss von Curcumin auf GRHL3

Um zu untersuchen, ob Curcumin den Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ reguliert, wurden primäre humane EZ für 24 h mit 7,5 μ M Curcumin inkubiert wie in 2.2.1 beschrieben. Für diese Konzentration war zuvor ein promigratorischer Effekt auf Endothelzellen nachgewiesen worden [79], wie er bereits für GRHL3 beschrieben worden war [111, 112]. Die Kontrollen wurden mit DMSO behandelt, da Curcumin in DMSO gelöst war.

Um zunächst die Curcumin-Wirkung zu überprüfen, wurde die SOD2-Proteinmenge im Immunoblot bestimmt, da Curcumin über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 bekanntermaßen die *sod2*-Expression und Proteinmenge erhöht [68]. Dies ist auch in primären humanen EZ der Fall [79].

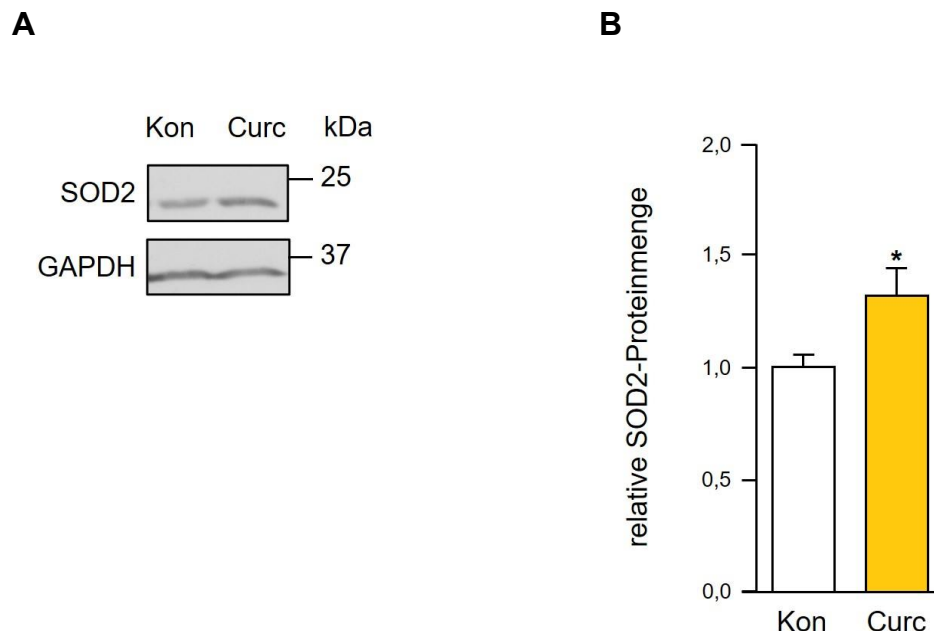


Abb. 3: **Nachweis der Curcumin-Wirkung anhand der SOD2-Proteinmenge.** Primäre humane Endothelzellen wurden für 24 h mit 7,5 μ M Curcumin (Curc) inkubiert oder als Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und SOD2 im Immunoblot nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung der SOD2-Proteinmengen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SEM (n=5; *p<0,05 vs Kon; einseitiger, gepaarter Student's t-Test).

Es zeigte sich eine ca. 1,3-fach erhöhte SOD2-Proteinmenge nach Curcumin-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Curcumin-Behandlung der EZ funktioniert hat.

Nachdem die Wirksamkeit von Curcumin in den mit ihm behandelten Zellen nachgewiesen worden war, wurde der Einfluss auf die Regulation von GRHL3 untersucht. Dazu wurde die GRHL3 Proteinmenge in den gleichen Zelllysaten mittels Immunoblot bestimmt.

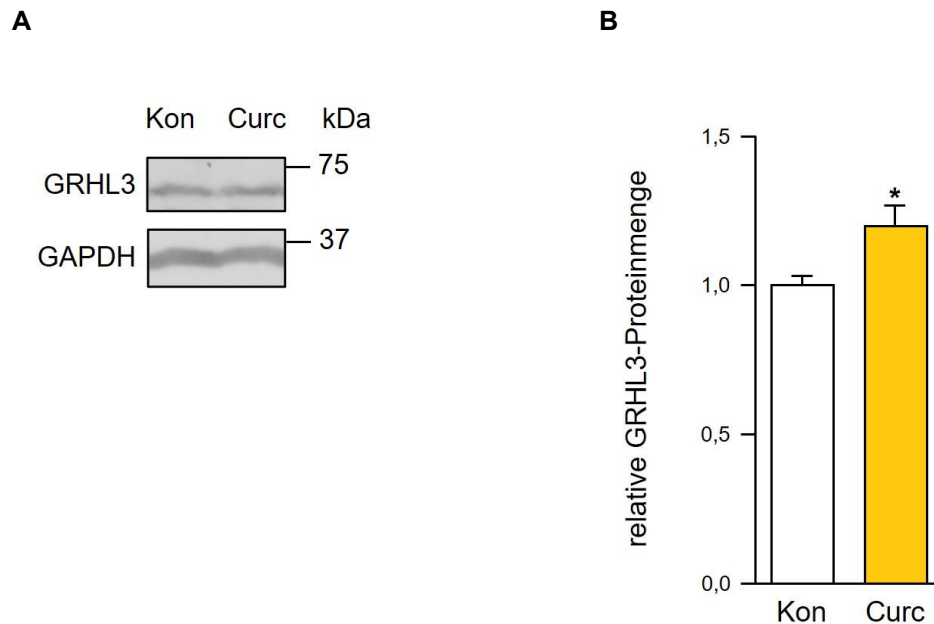


Abb. 4: **Curcumin erhöht die Grainyhead-like 3-Proteinmenge in Endothelzellen.** Endothelzellen wurden für 24 h mit 7,5 μ M Curcumin (Curc) inkubiert oder als Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und Grainyhead-like 3 (GRHL3) im Immunoblot nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung der GRHL3-Proteinmengen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SEM (n=5; *p<0,05 vs Kon; einseitiger, gepaarter Student's t-Test).

Auch bei GRHL3 kam es in den mit Curcumin behandelten EZ im Vergleich zu den Kontrollen zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinmenge (Abb. 4), was zeigt, dass Curcumin den Transkriptionsfaktor GRHL3 positiv reguliert.

3.1.2 Einfluss von Koffein auf GRHL3

Mit einer physiologisch relevanten Konzentration von 50 μ M Koffein war zuvor eine verstärkte Migration von EZ beobachtet worden [90]. Da auch GRHL3 promigratorisch wirkt [111, 112] könnte somit zumindest ein Teil dieses Effekts über GRHL3 vermittelt werden. Um zu untersuchen, ob Koffein den Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ reguliert,

wurden primäre humane EZ für 24 h mit 50 μ M Koffein inkubiert wie in 2.2.1 beschrieben. Nach der Zellernte wurde die *grhl3*-Transkriptmenge mittels semiquantitativer *real-time* PCR und die GHRL3-Proteinmenge mittels Immunoblot analysiert. Zunächst wurde wie im Fall von Curcumin die Koffein-Wirkung überprüft. Zuvor war von unserer Arbeitsgruppe gezeigt worden, dass Koffein das Verhältnis von an Serin 10 phosphoryliertem p27 (P-p27) zu unphosphoryliertem p27 zugunsten des phosphorylierten Proteins verschiebt [92]. Daher wurde dieses Verhältnis mittels Immunoblot bestimmt.

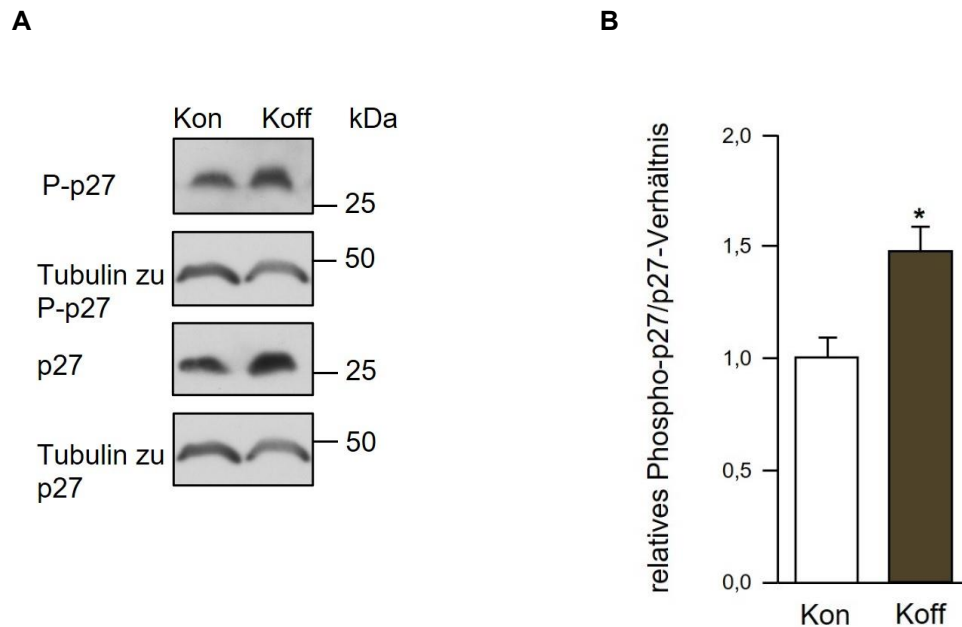


Abb. 5: Nachweis der Koffein-Wirkung anhand des erhöhten Phospho-p27/p27-Verhältnisses. Endothelzellen wurden für 24 h mit 50 μ M Koffein (Koff) inkubiert oder blieben unbehandelt als Kontrolle (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinmenge von an Serin 10 phosphoryliertem p27 (P-p27) und unphosphoryliertem p27 in separaten Immunoblots nachgewiesen; als Ladekontrolle diente jeweils Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung des P-p27 zu p27-Verhältnis bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SEM (n=5; *p<0,05 vs Kon; einseitiger, gepaarter Student's t-Test).

Wie erwartet kam es durch die Koffeinbehandlung zu einer ca. 1,5-fachen, signifikanten Erhöhung des Verhältnisses von P-p27 zu p27 (Abb. 5), was zeigt, dass die Koffein-Behandlung der EZ funktioniert hat.

Um im nächsten Schritt den Effekt von Koffein auf die *grhl3*-Transkriptmenge zu untersuchen, wurde eine semiquantitative *real-time* PCR für GRHL3 mit vorheriger Prä-Amplifikation durchgeführt wie in 2.2.3.4.1 und 2.2.3.4.2 beschrieben.

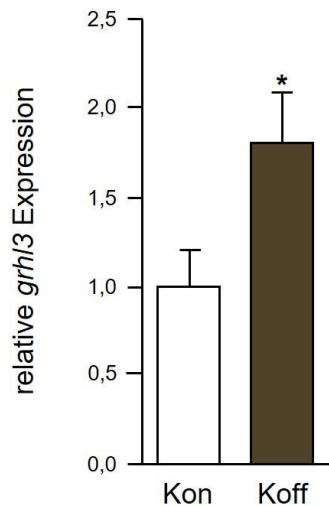
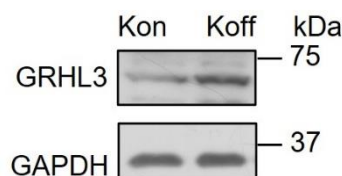


Abb. 6: **Koffein erhöht die *grainyhead-like 3*-Expression in Endothelzellen.** Endothelzellen wurden für 24 h mit 50 μ M Koffein (Koff) inkubiert oder blieben unbehandelt als Kontrolle (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die relativen *grainyhead-like 3* (*grhl3*)-Transkriptmengen in der semiquantitativen *real-time* PCR nachgewiesen. Gezeigt sind die relativen *grhl3*-Transkriptmengen bezogen auf das *housekeeping*-Gen ribosomales Protein L32 (RPL32). Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SEM (n=5; *p<0,05 vs Kon; einseitiger, gepaarter Student's t-Test).

Die Koffein-Behandlung erhöhte die *grhl3*-Transkriptmenge fast 2-fach (Abb. 6), woraus sich schließen lässt, dass Koffein die Expression von *grhl3* auf RNA-Ebene hochreguliert.

Um zu untersuchen, ob sich die Veränderung der Transkriptmenge auf dem Proteinlevel widerspiegelt, wurde ein Immunoblot durchgeführt.

A



B

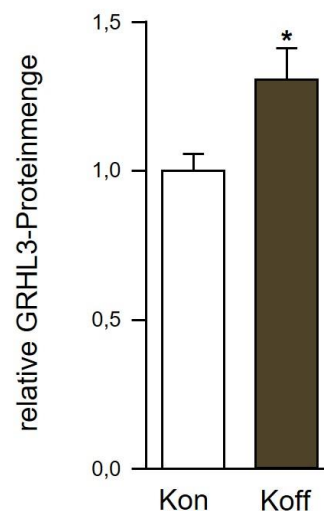


Abb. 7: **Koffein erhöht die Grainyhead-like 3-Proteinmenge in Endothelzellen.** Endothelzellen wurden für 24 h mit 50 μ M Koffein (Koff) inkubiert oder blieben unbehandelt als Kontrolle (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und Grainyhead-like 3 (GRHL3) im Immunoblot nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung der GRHL3-Proteinmengen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SEM (n=5; *p<0,05 vs Kon; einseitiger, gepaarter Student's t-Test).

Wie aus Abb. 7 zu erkennen ist, ist nach Koffeinbehandlung nicht nur die Transkript-, sondern auch die Proteinmenge von GRHL3 in EZ signifikant erhöht. Dies führt zu dem Schluss, dass Koffein die Menge des Transkriptionsfaktors GRHL3 in EZ über verstärkte Expression erhöht.

3.2 Regulation von GRHL3 in Stress-induzierter Seneszenz

Da Stress-induzierte Seneszenz Endothelzellfunktionen, die von GRHL3 positiv beeinflusst werden, wie z.B. Migration und NO-Bioverfügbarkeit, verschlechtert, stellte sich die Frage, wie sich die Seneszenzinduktion auf GRHL3 auswirkt. Um dies zu untersuchen, wurden EZ 2 Wochen lang analog dem in 3.3 (Abb. 9) beschriebenen Schema mit 50 μM H_2O_2 behandelt und die GRHL3-Proteinmenge anschließend mittels Immunoblot nachgewiesen.

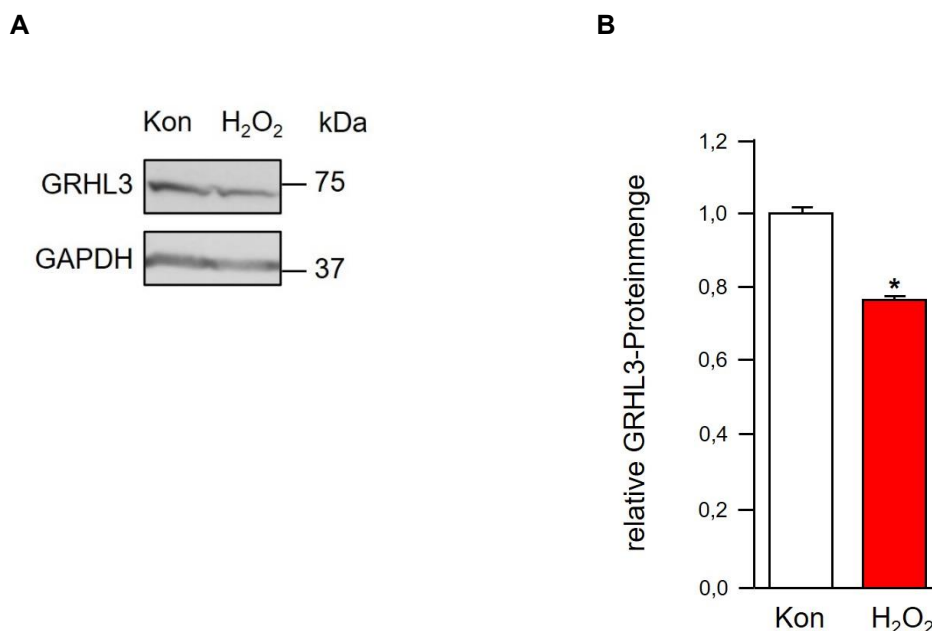


Abb. 8: **Grainyhead-like 3 ist in Stress-induzierter Seneszenz herunterreguliert.** Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen insgesamt fünfmal mit 50 μM H_2O_2 behandelt, um Seneszenz zu induzieren. Ein Ansatz blieb unbehandelt und diente als Kontrolle (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und Grainyhead-like 3 (GRHL3) im Immunoblot nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung der GRHL3-Proteinmengen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SEM (n=4; *p<0,05 vs Kon; einseitiger, gepaarter Student's t-Test).

Die H_2O_2 -Behandlung reduzierte die GRHL3-Proteinmenge auf ca. 80% der Menge in den unbehandelten Kontrollen (Abb. 8), was darauf schließen lässt, dass der Transkriptionsfaktor GRHL3 in Stress-induzierter Seneszenz herunterreguliert ist.

3.3 Einfluss von Koffein auf Stress-induzierte Seneszenz

Um den Einfluss von Koffein auf Stress-induzierte Seneszenz in EZ zu untersuchen, wurden primäre humane EZ über einen Zeitraum von 2 Wochen mehrfach mit H_2O_2 , mit H_2O_2 und Koffein und - als Kontrolle auf Langzeitwirkungen von Koffein - nur mit Koffein behandelt wie in Abb. 9 dargestellt. Als weitere Kontrolle wurden unbehandelte Zellen über den gesamten Zeitraum mitgeführt.

Da in diesem Ansatz keine akuten Effekte von Koffein auf EZ untersucht werden sollten, wurde im Unterschied zu den in 3.1.2 beschriebenen Experimenten eine niedrigere Koffein-Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ gewählt. Da unsere Arbeitsgruppe in vorherigen Experimenten eine Koffein-Konzentration von $30\text{-}50\ \mu\text{M}$ nach Einnahme von vier Tassen Kaffee im menschlichen Serum festgestellt hatte [90], entspricht die gewählte Konzentration in etwa der Serulkoffeinkonzentration nach einer Tasse Kaffee.

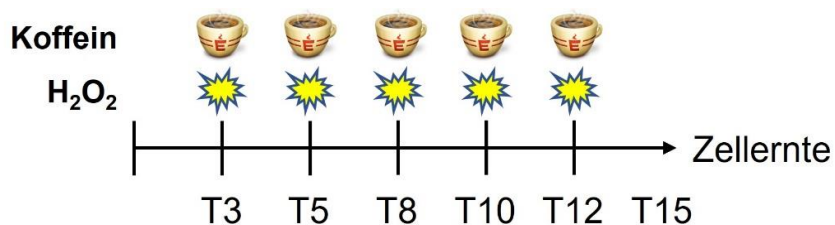


Abb. 9: **Behandlungsschema Koffein in Stress-induzierter Seneszenz.** Dargestellt ist die Behandlung mit H_2O_2 (gelbe Wolke) und Koffein (Kaffeetasse) am jeweiligen Tag (T) nach Ausbringen der Zellen. Die Zellen wurden jeweils mit $50\ \mu\text{M}$ H_2O_2 und/oder $10\ \mu\text{M}$ Koffein behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Die Zellernte erfolgte an Tag 15. Modifiziert nach: Merk, D., et al., Caffeine Inhibits Oxidative Stress- and Low Dose Endotoxemia-Induced Senescence-Role of Thioredoxin-1. Antioxidants (Basel), 2023. 12(6).

Um zu untersuchen, wie sich die Koffeinbehandlung auf die Seneszenzinduktion auswirkt, wurde die Proteinmenge des Seneszenzmarkers p21 im Immunoblot ermittelt.

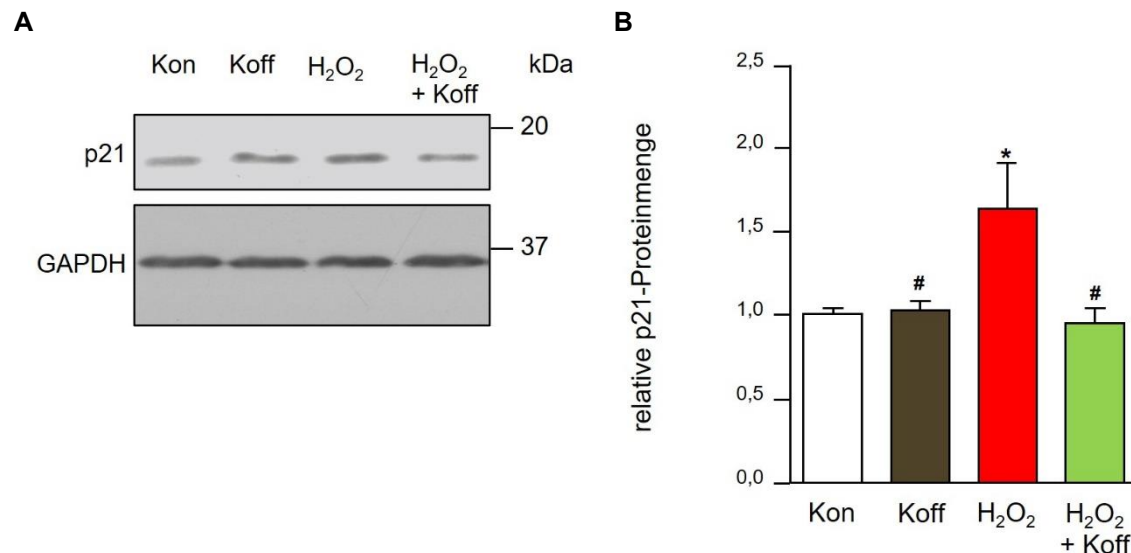


Abb. 10: **Koffein verhindert Stress-induzierte Seneszenz in Endothelzellen.** Primäre humane Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen insgesamt fünfmal mit 50 μ M H₂O₂ behandelt, um Seneszenz zu induzieren, in einem zweiten Ansatz wurden die Zellen zu den gleichen Zeitpunkten mit 10 μ M Koffein behandelt (H₂O₂+Koff). Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit 10 μ M Koffein behandelt worden waren (Koff) sowie gänzlich unbehandelte Zellen, die über den gleichen Zeitraum unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert wurden (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und p21 im Immunoblot nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung der p21-Proteinmengen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert $\pm$ SEM (n=4-5; *p<0,05 vs Kon, #p<0,05 vs. H₂O₂; one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD Test). Modifiziert nach: Merk, D., et al., Caffeine Inhibits Oxidative Stress- and Low Dose Endotoxemia-Induced Senescence-Role of Thioredoxin-1. Antioxidants (Basel), 2023. 12(6).

Hierbei zeigte sich, dass die alleinige Koffeinbehandlung die p21-Menge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nicht veränderte, wohingegen nach H₂O₂-Behandlung der erwartete Anstieg verzeichnet werden konnte. Interessanterweise entsprach die p21-Menge in den Zellen, die gleichzeitig mit H₂O₂ und Koffein behandelt worden, dem der unbehandelten Kontrollen (Abb. 10). Dies zeigt eindeutig, dass Koffein selbst keinen Einfluss auf den Zellzyklusinhibitor p21 hat, jedoch dessen Hochregulation durch Langzeitbehandlung mit H₂O₂ entgegenwirkt und damit Stress-induzierte Seneszenz verhindern kann [118].

Zusätzlich zu den Immunoblots, mit denen nur die Gesamtmenge eines Proteins in Zelllysaten untersucht werden kann, wurden Immunfluoreszenzfärbungen der behandelten Zellen angefertigt. Mit dieser Technik kann die intrazelluläre Lokalisation von Protein dargestellt werden, was im Fall von p21 von Bedeutung ist, da die Funktion als Zellzyklusinhibitor an die Lokalisation im Zellkern gebunden ist.

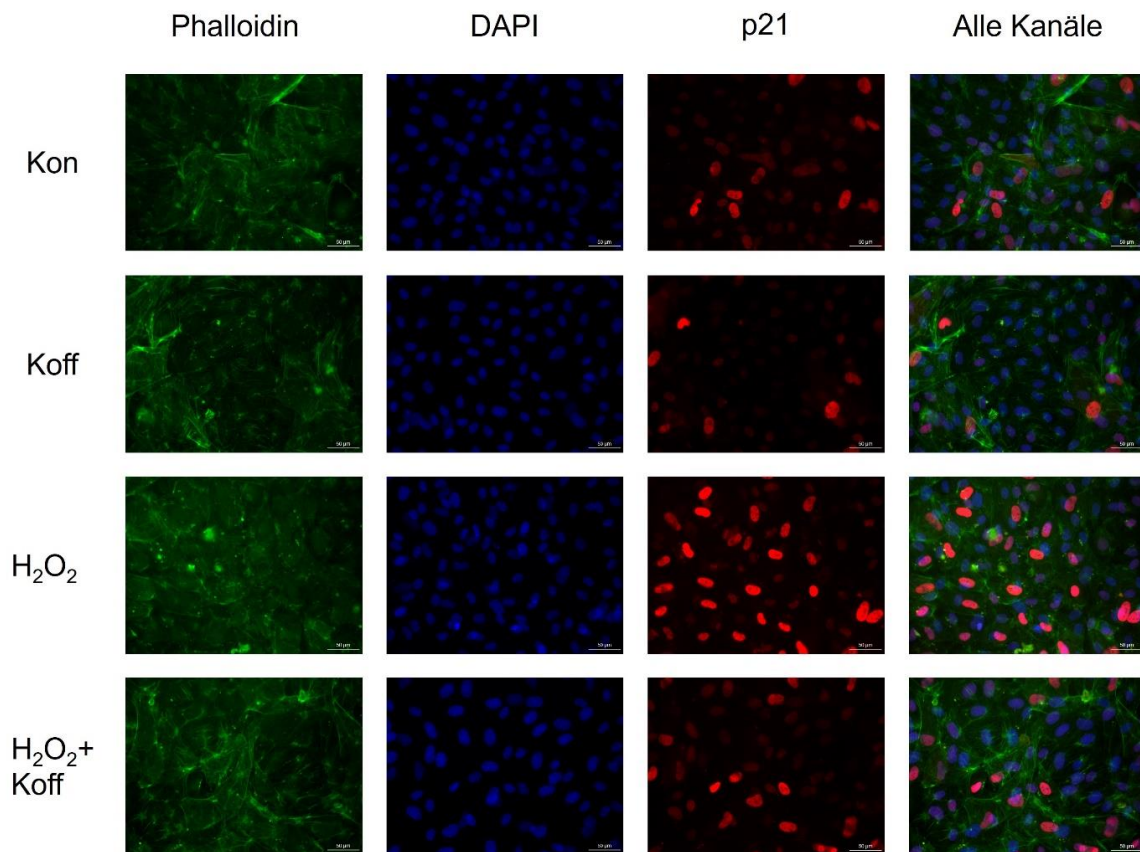


Abb. 11: **Koffein verhindert Stress-induzierte Seneszenz in Endothelzellen.** Primäre humane Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen insgesamt fünfmal mit 50 μM H₂O₂ behandelt, um Seneszenz zu induzieren, in einem zweiten Ansatz wurden die Zellen zu den gleichen Zeitpunkten mit 10 μM Koffein behandelt (H₂O₂+Koff). Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit 10 μM Koffein behandelt worden waren (Koff) sowie gänzlich unbehandelte Zellen, die über den gleichen Zeitraum unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert wurden (Kon). Zur Färbung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für p21 (rot) durchgeführt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit Fluorophor-gekoppeltem Phalloidin (grün), die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Bilder der einzelnen Farbkanäle wurden mit einem Immunfluoreszenzmikroskop aufgenommen, die Überlagerung der drei Farben ist mit Alle Kanäle bezeichnet. 400x Vergrößerung, Maßstab 50 μm . Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der unterschiedlichen Behandlungen. Modifiziert nach: Merk, D., et al., Caffeine Inhibits Oxidative Stress- and Low Dose Endotoxemia-Induced Senescence-Role of Thioredoxin-1. Antioxidants (Basel), 2023. 12(6).

Abb. 11 zeigt, dass nach H₂O₂-Behandlung als Zeichen der Seneszenzinduktion deutlich mehr p21-positive Zellkerne als in den unbehandelten Kontrollen vorhanden waren. Bei zusätzlicher Koffein-Behandlung entsprach die Zahl der p21-positive Zellkerne in etwa wieder der in den unbehandelten Zellen. Die alleinige Behandlung mit Koffein hatte keinen Effekt auf p21. Dies bestätigt das Ergebnis aus den Immunoblots und untermauert damit, dass Koffein stressinduzierte Seneszenz verhindern kann [118].

In seneszenten EZ ist die NO-Produktion durch eine Verringerung der eNOS-Menge eingeschränkt. Insofern stellte sich die Frage, ob Koffein in dem Modell der Stress-

induzierten Seneszenz nicht nur die Akkumulation von p21 im Zellkern und damit einen Zellzyklusarrest, sondern auch die Herunterregulation von eNOS verhindert. Um dem nachzugehen, wurde in dem vorher beschriebenen Modell der gleichzeitigen Behandlung mit H₂O₂ und Koffein auch die eNOS-Proteinmenge mittels Immunoblot analysiert. Diese Arbeiten wurden gemeinsam mit Herrn Jan Greulich, MSc durchgeführt.

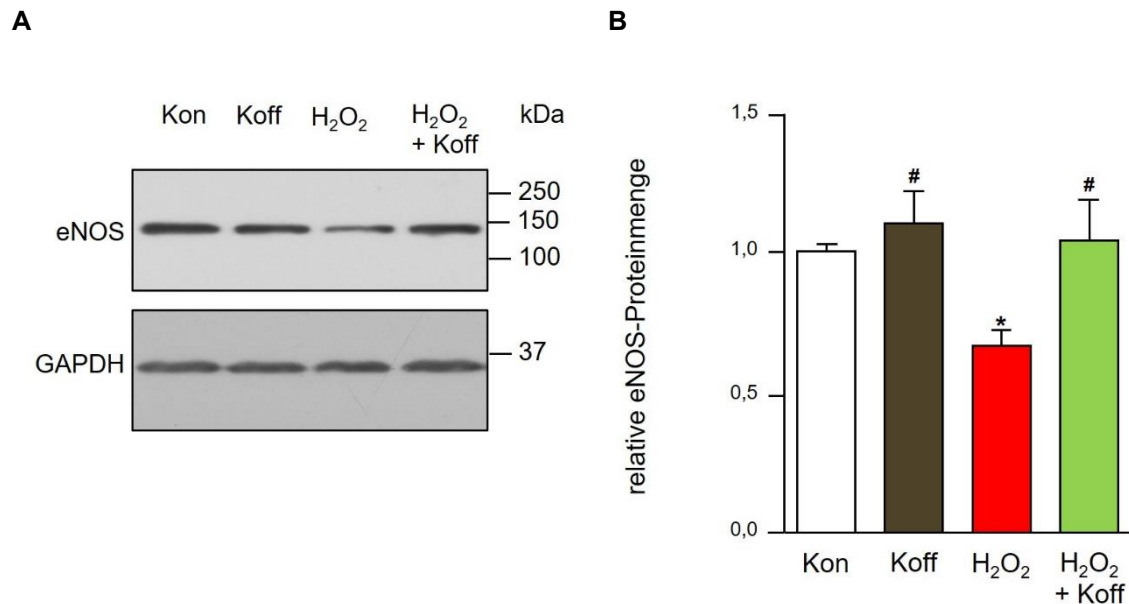


Abb. 12: **Koffein erhält die eNOS-Proteinmenge bei Langzeitbehandlung mit H₂O₂.** Primäre humane Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen insgesamt fünfmal mit 50 µM H₂O₂ behandelt, um Seneszenz zu induzieren, in einem zweiten Ansatz wurden die Zellen zu den gleichen Zeitpunkten mit 10 µM Koffein behandelt (H₂O₂+Koff). Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit 10 µM Koffein behandelt worden waren (Koff) sowie gänzlich unbehandelte Zellen, die über den gleichen Zeitraum unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert wurden (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und eNOS im Immunoblot nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung der eNOS-Proteinmengen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert ± SEM (n=4-5; *p<0,05 vs Kon, #p<0,05 vs. H₂O₂; one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD Test). Modifiziert nach: Merk, D., et al., Caffeine Inhibits Oxidative Stress- and Low Dose Endotoxemia-Induced Senescence-Role of Thioredoxin-1. Antioxidants (Basel), 2023. 12(6).

Bei alleiniger H₂O₂-Behandlung war die eNOS-Proteinmenge, wie für seneszente EZ erwartet, reduziert. Dies wurde durch die gleichzeitige Gabe von Koffein verhindert; Koffein alleine hatte keinen signifikanten Effekt auf eNOS (Abb.12). Somit kann Koffein nicht nur den Seneszenz-assoziierten Zellzyklusarrest verhindern, sondern erhält auch essenzielle Endothelzell-spezifische Funktionen [118].

Die bis dahin erhobenen Daten zeigten, dass Koffein das Auftreten Stress-induzierter Seneszenz in Endothelzellen verhindert und außerdem spezifische Funktionen der Zellen,

wie z.B. die Kapazität zur NO-Produktion, erhält. Da der Transkriptionsfaktor GRHL3 ebenso wie eNOS in seneszenten EZ herunterreguliert ist, seine Expression und Proteinmenge bei kurzzeitiger Koffeinbehandlung aber ansteigt, ergab sich die Frage, ob Koffein auch im Seneszenzmodell einen Einfluss auf GRHL3 hat. Um den Effekt von Koffein auf die Herunterregulation von GRHL3 in stressinduzierter Seneszenz zu untersuchen, wurden EZ wie oben zuvor beschrieben mit H₂O₂ und/oder Koffein behandelt und die GRHL3-Proteinmenge mittels Immunoblot nachgewiesen.

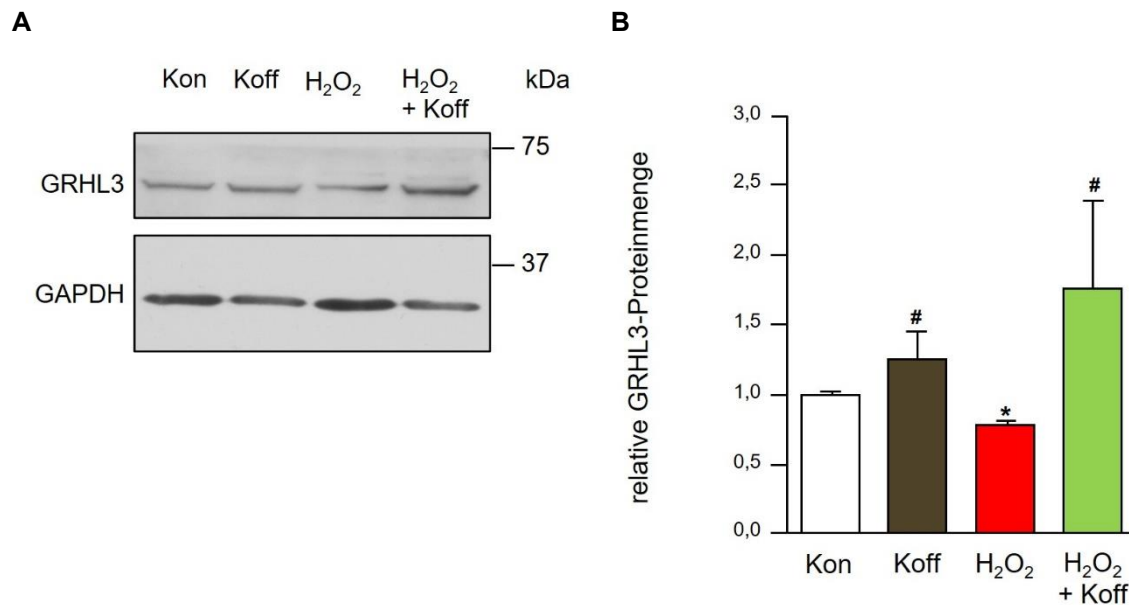


Abb. 13: Koffein erhält die Grainyhead-like 3 Proteinmengen bei Langzeitbehandlung mit H₂O₂. Primäre humane Endothelzellen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen insgesamt fünfmal mit 50 µM H₂O₂ behandelt, um Seneszenz zu induzieren, in einem zweiten Ansatz wurden die Zellen zu den gleichen Zeitpunkten mit 10 µM Koffein behandelt (H₂O₂+Koff). Als Kontrollen dienten Zellen, die ausschließlich mit 10 µM Koffein behandelt worden waren (Koff) sowie gänzlich unbehandelte Zellen, die über den gleichen Zeitraum unter ansonsten identischen Bedingungen kultiviert wurden (Kon). Anschließend wurden die Zellen lysiert und Grainyhead-like 3 (GRHL3) im Immunoblot nachgewiesen; als Ladekontrolle diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(A)** Repräsentativer Immunoblot: Die Zahlen geben das Molekulargewicht der verwendeten Markerproteine an. **(B)** Semiquantitative Auswertung der GRHL3-Proteinmengen bezogen auf die Ladekontrolle GAPDH. Der Mittelwert für die Kontrollen wurde zu eins gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert ± SEM (n=4-5; *p<0,05 vs Kon, #p<0,05 vs. H₂O₂; one-way ANOVA mit post-hoc Tukey LSD Test).

Wie schon zuvor nachgewiesen, führte die zweiwöchige Behandlung mit H₂O₂ zu einer Reduktion der GRHL3-Menge. Koffein alleine hatte keinen signifikanten Effekt, verhinderte aber bei gleichzeitiger Gabe mit H₂O₂ die Verringerung der GRHL3-Menge (Abb. 13). Daraus kann geschlossen werden, dass Koffein auch über den Erhalt von GRHL3 dem durch H₂O₂ induzierten Funktionsverlust von EZ entgegenwirkt.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind erstens, dass Curcumin und Koffein den Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ hochregulieren, zweitens, dass GRHL3 in Stress-induzierter EZ-Seneszenz herunterreguliert ist und drittens, dass Koffein stressinduzierte EZ-Seneszenz verhindert, wobei die eNOS- und GRHL3-Proteinmengen durch Koffeinbehandlung erhalten bleiben.

4.2 Curcumin und GRHL3

Der Pflanzeninhaltsstoff Curcumin wirkt sich positiv auf das kardiovaskuläre System aus. Insbesondere zeigen viele Studien, dass Curcumin die Endothelfunktion verbessert [69-75, 115]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Curcumin den Transkriptionsfaktor GRHL3 hochreguliert. GRHL3 nimmt eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der EZ-Funktion ein, indem er die NO-Produktion von EZ fördert [111]. Fang et al. [71] und Fleenor et al. [72] wiesen eine verbesserte ACh-induzierte EDD nach Gabe von Curcumin bei jungen bzw. alten Mäusen nach. Oliver et al. [74] beobachteten eine verbesserte FMD bei jungen gesunden Männern nach 8-wöchiger Einnahme von Curcumin. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Santos-Parker et al. [75], die nach Einnahme von Curcumin eine verbesserte ACh-induzierte EDD bei mittelalten bis alten Probanden beobachteten. Demnach könnte Curcumin die NO-Produktion von EZ durch Hochregulation von GRHL3 steigern. Dies würde einen neuen Mechanismus aufzeigen, wie es zu einer verbesserten Endothelfunktion kommt.

Curcumin ist dafür bekannt, verschiedene Transkriptionsfaktoren zu regulieren [119]. So verringert Curcumin die Expression des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B, während es den antioxidativen Transkriptionsfaktor NRF2 hochreguliert [68]. GRHL3 ist nun ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch Curcumin hochreguliert wird.

Im Gegensatz zu Studien mit protektivem Effekt stehen Untersuchungen, die einen schädlichen Einfluss von Curcumin auf EZ beschreiben. Beispielsweise beobachteten Liu et al. [76] eine Inhibition der EZ-Proliferation nach Behandlung mit über 20 μ M eines Curcumin-Analogons, die sie auf die Induktion von Zelltod in EZ zurückführten. Hingegen wiesen Grabowska et al. [77] schon bei einer Curcumin-Konzentration von 2,5 bis 5 μ M eine Inhibition der EZ-Proliferation und erhöhte Seneszenzmarker in EZ nach, während

Curcumin-Konzentrationen über 10 μM zytotoxisch waren. Die erhöhten Seneszenzmarker stehen im Kontrast zu einer Studie von Sun et al. [120], die zeigt, dass Curcumin H_2O_2 -induzierte Seneszenz inhibieren kann. Vyas et al. [78] beobachteten eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation von EPZ durch Behandlung mit 1 bis 50 μM Curcumin. Hingegen beobachteten Ouyang et al. [70], dass Curcumin-Konzentrationen von 50 μM in EZ den oxidativen Stress unter H_2O_2 -Behandlung verbessern. Um diesen widersprüchlichen Studien zu begegnen, wurde zunächst die Curcuminkonzentration in unserem Primärzellsystem ermittelt, die keinen Einfluss auf die Anzahl lebender EZ hatte. Dabei ergab sich bei 24 stündiger Behandlung, dass Curcuminkonzentrationen von 5 und 7,5 μM keinen Einfluss auf die Anzahl lebender EZ hatten, während Konzentrationen von 10 und 20 μM zu vermehrtem Zelltod von EZ führten [121]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dann in dieser Arbeit für die Versuche eine Curcumin-Konzentration von 7,5 μM verwendet, so dass eine Induktion von Zelltod ausgeschlossen war.

Diese oben beschriebene vermeintlich widersprüchliche Studienlage könnte teilweise durch die schlechte Wasserlöslichkeit von Curcumin erklärt werden [80]. Da Curcumin aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften im wässrigen Kulturmedium schlecht löslich ist [122], könnten sich die effektiven Curcuminkonzentrationen und damit -wirkungen in den oben genannten Studien bei gleicher eingesetzter Konzentration stark voneinander unterscheiden. Dies könnte der Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit der Studien sein. In der vorliegenden Arbeit wurde für jedes biologische Replikat die Wirkung von Curcumin durch die Hochregulation der SOD2-Proteinmenge nachgewiesen. SOD2 ist ein Zielgen des Transkriptionsfaktors NRF2, der nachweislich durch Curcumin-Gabe in den Zellkern von EZ transloziert [79].

Ein weiterer Grund für die heterogene Studienlage könnte eine hormetische Wirkweise von Curcumin sein [123]. Hormesis bedeutet, dass eine Substanz (meist ein Gift) ein biphasisches Wirkprofil hat, sodass sie in niedrigen Konzentrationen eine positive Wirkung und in hohen Konzentrationen eine negative Wirkung besitzt [123]. Mehrere Studien legen eine hormetische Wirkweise von Curcumin nahe: Lima et al. [124] konnten zeigen, dass Curcumin in niedrigen Konzentrationen unter 20 μM milden oxidativen Stress in Fibroblasten auslöst und vermutlich dadurch eine protektive, antioxidative Antwort hervorruft. Im Gegensatz dazu führte Curcumin in hohen Konzentrationen (30 μM) zu vermehrtem Zelltod. Außerdem scheint Curcumin laut Studien von Grabowska et al. und Son et al. die Zellproliferation hormetisch zu regulieren [77, 125]. Insofern steht der in

anderen Studien beobachtete schädliche Einfluss von Curcumin auf EZ nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da die Curcumin-Wirkungen konzentrationsabhängig sind. Auch die Hochregulation von GRHL3 durch Curcumin und damit der Einfluss auf die EZ-Funktion folgt einem hormetischen Prinzip: Niedrige Curcuminkonzentrationen erhöhen die GRHL3-Proteinmenge und verbessern somit mutmaßlich die EZ-Funktion, während hohe Konzentrationen toxisch auf EZ wirken.

Beim Menschen ist die wirksame Curcumin-Konzentration bisher nicht bekannt und die Bioverfügbarkeit von Curcumin sehr eingeschränkt und interindividuell verschieden. Ein Review von Dei Cas et al. [80] zeigt, dass in verschiedenen Studien nach Einnahme von Curcumin eine große Bandbreite an Curcumin-Konzentrationen im Serum gemessen wurde. Die Curcumin-Konzentrationen reichten von 1 bis 3200 ng/ml bei Curcumin-Dosen von 2 bis 10 g, zum Teil war Curcumin im Serum überhaupt nicht nachweisbar. Dies hängt mit der eingeschränkten Bioverfügbarkeit von Curcumin zusammen: Zum einen wird Curcumin durch seine lipophilen Eigenschaften im Gastrointestinaltrakt schlecht resorbiert [80]. Zum anderen wird Curcumin im menschlichen Organismus sehr schnell metabolisiert [80]. Die Metabolisierung bei Menschen ist dabei wesentlich stärker als die bei Nagetieren, weshalb die Relevanz von *in vivo* Curcumin-Studien mit Mäusen oder Ratten unklar ist [126]. Jedoch werden zunehmend neue, besser bioverfügbare Curcumin-Formulierungen entwickelt, in denen Curcumin z. B. in Form von Liposomen, Mizellen, Curcumin-Nanopartikeln oder gebunden an Matrizen wie Lecithin verabreicht wird [126]. Viele davon zeigen in pharmakologischen Studien eine deutlich bessere gastrointestinale Absorption als freies Curcumin [126]. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Curcumin den vasoprotektiven Transkriptionsfaktor GRHL3 hochreguliert. Klinische Studien mit neuen Curcumin-Formulierungen konnten einen protektiven Effekt von Curcumin auf die EZ-Funktion nachweisen [74, 75]. Daher ist es plausibel, dass der in der vorliegenden Arbeit *ex vivo* gefundene Wirkmechanismus von Curcumin auch im Menschen existiert. Durch besser bioverfügbare Curcumin-Formen könnten ausreichend hohe Serumkonzentrationen erzielt werden, um diese Wirkung von Curcumin im menschlichen Organismus zu ermöglichen. Hierzu werden weitere *in vivo* und pharmakologische Studien benötigt.

4.3 Koffein und GRHL3

Der Pflanzeninhaltsstoff Koffein ist in großen epidemiologischen Studien mit einer reduzierten kardiovaskulären Mortalität assoziiert [81, 82]. Mehrere Studien zeigen, dass Koffein die EZ-Funktion verbessert [90, 91, 93, 94]. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen,

dass Koffein den Transkriptionsfaktor GRHL3 hochreguliert. GRHL3 nimmt eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der EZ-Funktion ein, indem er die NO-Produktion von EZ fördert. Die NO-abhängige EZ-Migration ist von GRHL3 abhängig [111]. Das Ergebnis dieser Arbeit stimmt somit mit vorherigen Studien überein: In klinischen Studien verbesserte Koffein die NO-Produktion von EZ sowohl bei Gesunden [93], als auch bei Probanden mit kardiovaskulären Erkrankungen [94]. In Studien unserer Arbeitsgruppe [90] und von Wang et al. [91] verbesserte Koffein die EZ-Migration *ex vivo*. Die in den Studien beobachtete Verbesserung der EZ-Funktion durch Koffein ist vermutlich auf eine Hochregulation von GRHL3 zurückzuführen.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit stehen Studien, die einen negativen Einfluss von Koffein auf EZ beschreiben. Matsuoka et al. [127] und Li et al. [128] beobachteten, dass Koffein in EZ Apoptose induziert. Jedoch wurden in diesen Studien hohe, unphysiologische Koffein-Konzentrationen von 100 bis 1000 μM eingesetzt. Koffein-Konzentrationen über 500 μM sind für Menschen letal [97]. In Konzentrationen über 100 μM wirkt Koffein über Calcium-Freisetzung, Inhibition von PDE und Antagonisierung von Adenosin-Rezeptoren [92, 95, 96]. Es konnte gezeigt werden, dass die physiologische Koffein-Serumkonzentration beim Menschen nach Einnahme von vier Tassen Kaffee ca. 20 bis 30 μM beträgt und 50 μM Koffein die EZ-Migration *ex vivo* über die mitochondriale Translokation von p27 verbessert [90, 92]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit maximal 50 μM Koffein eingesetzt. Ähnlich wie bei Curcumin folgt die Koffeinwirkung also einem hormetischen Prinzip. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit niedrigen, protektiven Koffeinkonzentrationen gearbeitet, somit stehen die Ergebnisse nicht im Widerspruch zu oben genannten Studien.

Unsere Arbeitsgruppe hat einen neuen Wirkmechanismus von Koffein gefunden: Koffein in physiologischen Konzentrationen führt zur Phosphorylierung und mitochondrialen Translokation des Zellzyklusinhibitors p27, was eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion und damit der EZ-Migration bewirkt [92]. Dabei war die Koffein-induzierte EZ-Migration von p27 abhängig [92]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Koffein den Transkriptionsfaktor GRHL3 hochreguliert. GRHL3 ist entscheidend für die EZ-Migration [111]. Daher könnte vermutet werden, dass GRHL3 ein Teil des von Koffein aktivierten p27-Signalwegs ist. Etwa wäre es vorstellbar, dass es durch die Hochregulation des Transkriptionsfaktors GRHL3 über bisher unbekannte Signalwege zu einer vermehrten Phosphorylierung von p27 kommt. Da GRHL3 per se keine Kinase ist und auch keine intrinsische Kinase-Aktivität hat, müssen hier zwischengeschaltete Mechanismen aktiviert

werden. Da GRHL3 auch eine extranukleäre Funktion besitzt [114], könnte GRHL3 auch außerhalb des Zellkerns direkt mit p27 interagieren. Jedoch wäre es auch möglich, dass die GRHL3-Hochregulation und die p27-Translokation unabhängige Signalwege darstellen. Somit könnte Koffein über zwei verschiedene Mechanismen die EZ-Migration erhöhen. Dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.4 GRHL3 in EZ-Seneszenz

Seneszente EZ sind in ihrer Funktion eingeschränkt. Sie weisen eine verringerte eNOS-Proteinmenge und -Aktivierung und dadurch eine eingeschränkte NO-Produktion auf [56]. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ-Seneszenz herunterreguliert ist. GRHL3 bewirkt eine aktivierende Phosphorylierung von eNOS [111] und interagiert außerhalb des Zellkerns direkt mit dem Enzym [114]. Deshalb könnte vermutet werden, dass die eingeschränkte Funktion seneszenten EZ auf die Herunterregulation von GRHL3 zurückzuführen ist, da eNOS weniger aktiviert werden könnte und ein potenzieller Schutzmechanismus, den die GRHL3-eNOS Interaktion für die eNOS-Proteinmenge darstellen könnte, verloren gehen würde. Ob eine Überexpression von GRHL3 die Menge an eNOS und die EZ-Funktion in Seneszenz bewahren kann, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.5 Koffein und EZ-Seneszenz

Kaffeeconsum ist insbesondere bei Älteren mit einer verringerten kardiovaskulären Mortalität assoziiert, wie epidemiologische Studien zeigen [83-86]. Im Alter akkumulieren seneszente Zellen in verschiedenen Geweben, unter anderem in den Blutgefäßen, und tragen zur Entstehung degenerativer Erkrankungen wie der Atherosklerose bei [45]. So konnten Minamino et al. [55] eine Häufung seneszenten EZ in atherosklerotischen Plaques nachweisen. EZ-Seneszenz führt zu endothelialer Dysfunktion, da seneszente EZ ihre ursprüngliche Funktion verlieren [54]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Koffein die EZ-Seneszenz verhindern kann. Der Seneszenzmarker p21 war nach Koffein-Behandlung zusätzlich zur Behandlung mit H₂O₂ signifikant reduziert im Vergleich zu alleiniger H₂O₂-Behandlung. Des Weiteren verringerte sich die eNOS-Proteinmenge nach Koffein Gabe und H₂O₂-Behandlung im Gegensatz zu einer alleinigen Behandlung mit H₂O₂ nicht. Somit könnte das in Kaffee enthaltene Koffein die Akkumulation seneszenten EZ in Blutgefäßen hinauszögern und dadurch zu der beobachteten reduzierten kardiovaskulären Mortalität bei Kaffeeconsum beitragen.

Da Koffein ebenfalls die GRHL3-Proteinmenge nach H₂O₂-Behandlung bewahren konnte und GRHL3 die EZ-Funktion verbessert [111], liegt es nahe zu vermuten, dass Koffein Seneszenz über die Hochregulation von GRHL3 verhindert. Dies müsste in einem GRHL3-*knockdown*- Versuch überprüft werden.

Es ist anzumerken, dass sich die genannten epidemiologischen Studien auf Kaffeekonsum beziehen, und nicht auf die Einnahme von Koffein allein. Freedman et al. [81] und Gunter et al. [82] beobachteten keinen Unterschied in der Mortalität zwischen Konsum von koffeiniertem und dekoffeiniertem Kaffee. Jedoch wurde bei Gunter et al. nach eigener Aussage nicht in allen Studienzentren der Konsum von dekoffeiniertem Kaffee abgefragt. Da Kaffee neben Koffein noch viele weitere Stoffe enthält, könnte die Assoziation von Kaffeekonsum zu reduzierter kardiovaskulärer Mortalität auch auf andere Substanzen zurückzuführen sein: Beispielsweise ist Kaffee die Hauptquelle für Antioxidanzien in der norwegischen Küche [129]. Allerdings sprechen für Koffein als gefäßprotektive Substanz in Kaffee klinische Studien, in welchen reines Koffein in Tablettenform verabreicht wurde: Umemura et al. [93] und Shechter et al. [94] konnten nach Einnahme von 300 bzw. 200 mg Koffein eine verbesserte ACh-induzierte EDD bzw. FMD bei Probanden ohne bzw. mit kardiovaskulären Erkrankungen nachweisen. Die vorliegende Arbeit stützt ebenfalls die These, dass Koffein für die positiven Assoziationen von Kaffee verantwortlich ist, da Koffein den vasoprotektiven Transkriptionsfaktor GRHL3 hochreguliert und EZ-Seneszenz verhindert.

In Zusammenarbeit mit Dennis Merk und Jan Greulich konnten wir nicht nur zeigen, dass Koffein die H₂O₂-induzierte Seneszenz inhibiert, sondern auch die durch niedrig dosiertes Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien, induzierte Seneszenz [118]. Zuvor hatten Cani et al. [130] gezeigt, dass eine fettreiche Ernährung niedrige LPS-Konzentrationen im Blut hervorruft (eine sogenannte *low dose endotoxemia*), welche zu Übergewicht und Insulinresistenz führt. Koffein könnte also durch Verhinderung von Seneszenz neben endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose auch auf weitere Faktoren des metabolischen Syndroms einen protektiven Einfluss haben. In dem Zusammenhang konnte auch nachgewiesen werden, dass das antioxidative Enzym Thioredoxin-1 auf Proteinebene in seneszenten EZ herunterreguliert ist. Dieser Effekt konnte durch Koffeinbehandlung verhindert werden [118]. Dies verdeutlicht die Bedeutung von ROS und oxidativem Stress bei der Entstehung von EZ-Seneszenz. Weiterhin konnte auch bei der EZ-Seneszenz mitochondriales p27 als *downstream* Effektor von Koffein

identifiziert werden. In Zellen mit lentiviral transduziertem mitochondrial lokalisiertem p27 fand keine Seneszenz-Induktion durch LPS statt [118]. Zuvor hatte unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass Koffein zur Phosphorylierung und mitochondrialen Translokation des Zellzyklusinhibitors p27 führt, was eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion und damit der EZ-Migration bewirkt [92]. Ob GRHL3 ebenfalls Teil dieses Signalwegs ist, sollte in weiteren Studien untersucht werden. Vor allem aber konnte nachgewiesen werden, dass eine einzige Koffeinbehandlung mit 50 μ M nach zwölf tägiger LPS-Behandlung das Auftreten von EZ-Seneszenz verhindern kann [118]. Dies lässt vermuten, dass Koffein bei der Inhibition von EZ-Seneszenz nicht nur eine präventive, sondern auch eine therapeutische Wirkung besitzt.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann keine definitive Aussage darüber getroffen werden, auf welche Weise Koffein EZ-Seneszenz verringert.

Erstens könnte Koffein die Entstehung von Seneszenz durch Hochregulation protektiver Faktoren, z.B. antioxidativer Systeme oder eNOS, oder durch Eingreifen in den Zellzyklus inhibieren. Zweitens könnte Koffein bereits bestehende Seneszenz rückgängig machen. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass Koffein die Entstehung von Seneszenz verhindert. Vasa et al. [131] konnten zeigen, dass NO die Entstehung von EZ-Seneszenz hinauszögern kann. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Koffein den Transkriptionsfaktor GRHL3 hochreguliert, der die NO-Produktion in EZ steigert [111]. Daher kann vermutet werden, dass Koffein durch eine Erhöhung der NO-Produktion EZ-Seneszenz verhindern kann. Li et al. [100] beobachteten, dass niedrige Koffeinkonzentrationen <10 μ M Stress-induzierte Seneszenz in Hautzellen durch Aktivierung von Autophagie und Reduzierung von ROS inhibieren. Dies stimmt mit neueren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein, dass Koffein die Herunterregulation des antioxidativen Enzyms Thioredoxin-1 in EZ-Seneszenz verhindert [118]. Somit könnte die Reduktion von ROS ebenfalls zum Verhindern von Seneszenz durch Koffein beitragen. Des Weiteren konnten Zhan et al. [99] zeigen, dass Koffein in hohen Konzentrationen H₂O₂-induzierte Seneszenz in EZ verhindert durch Inhibition von ATM, einem wichtigen Mediator der DNA-Schadensantwort *upstream* der Zellzyklusinhibitoren p53 und p21. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Koffein die Phosphorylierung und mitochondriale Translokation des Zellzyklusinhibitors p27 bewirkt [92] und, in einer neueren Studie, dass die Re-Expression von mitochondrialem p27 EZ-Seneszenz verhindert [118]. Über diese Mechanismen könnte Koffein Seneszenz verhindern.

Die zweite Möglichkeit wäre, dass Koffein Seneszenz rückgängig machen kann. Obwohl lange angenommen wurde, dass Seneszenz irreversibel ist, mehren sich die Hinweise, dass insbesondere Tumorzellen unter bestimmten Umständen aus der Seneszenz ausbrechen können [132]. Patel et al. [133] konnten zeigen, dass seneszente Tumorzellen wieder in den Zellzyklus eintreten können. Daran beteiligt war eine Reaktivierung der Telomerase-reverse-Transkriptase (TERT), der katalytischen Untereinheit der Telomerase [134]. Tao et al. [98] konnten zeigen, dass Koffein die TERT-Expression in HeLa-Zellen erhöht. Allerdings wurde hier mit unphysiologischen Koffein-Konzentrationen von 0,5 und 1 mM gearbeitet. Vasa et al. [131] konnten nachweisen, dass NO die TERT-Expression in EZ erhöht, was die Entstehung von EZ-Seneszenz hinauszögerte. Ob EZ dadurch aus bestehender Seneszenz ausbrechen können, wurde jedoch nicht untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass eine einmalige Koffeinbehandlung EZ-Seneszenz nach zweiwöchiger Induktion verhindert [118]. Daher kann vermutet werden, dass Koffein in physiologischen Konzentrationen Seneszenz rückgängig machen kann. Diese beiden hier diskutierten Möglichkeiten sollten in weiteren Studien näher untersucht werden.

4.6 Ausblick

In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob die von Curcumin und Koffein hervorgerufene Steigerung der NO-Produktion von EZ, die in anderen Studien beschrieben wurde, in diesem Zellmodell ebenfalls nachzuweisen ist und ob diese dann von GRHL3 abhängig ist. Außerdem sollte untersucht werden, ob GRHL3 für die Seneszenz-inhibierende Wirkung von Koffein notwendig ist. Dafür sollten GRHL3-*knockdown*-Versuche erfolgen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von GRHL3 Seneszenz oder den Verlust der EZ-Funktion in Seneszenz verhindern kann. Ebenfalls sollten die Signalkaskaden von Koffein und Curcumin weiter erforscht werden. Insbesondere der Frage, auf welche Weise Koffein EZ-Seneszenz reduziert, sollte nachgegangen werden, um das präventive bzw. therapeutische Potenzial von Koffein besser einschätzen zu können.

Derzeit existiert für kardiovaskuläre Erkrankungen keine kausale Therapie. Daher kommt der primären und sekundären Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und Ereignisse eine besondere Rolle zu. Hierfür etablierte Medikamente sind Statine zur Senkung des LDL-Cholesterins, ASS zur Thrombozytenaggregationshemmung und Blutdrucksenker [8]. Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen müssen meist viele verschiedene Medikamente einnehmen, was zu einer schlechten Therapieadhärenz führt: Wie zwei

Metaanalysen zeigen, nehmen nur ca. 60 % der Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ihre Medikamente nach Vorschrift ein [135, 136]. Nach einer Berechnung von Chowdhury et al. [136] sind in Europa ca. 9 % aller kardiovaskulärer Ereignisse auf schlechte Adhärenz zurückzuführen. Daher ist es umso wichtiger, einen gesunden Lebensstil in der Gesellschaft zu verankern, der zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt. Die Leitlinie des American College of Cardiology und der American Heart Association zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen von 2019 [137] empfiehlt als wichtigste Maßnahme einen gesunden Lebensstil. Neben regelmäßiger körperlicher Aktivität und Rauchstopp empfiehlt die Leitlinie eine gesunde Ernährung, die sich vor allem aus Gemüse, Obst, Nüssen, Vollkornprodukten, Fisch und magerem Fleisch zusammensetzen soll. Schon lange ist bekannt, dass bestimmte Ernährungsformen wie die mediterrane Ernährung sich positiv auf das kardiovaskuläre Risiko auswirken [138]. Charakteristika einer mediterranen Ernährung sind Olivenöl als hauptsächliche Fettquelle, viele pflanzliche und wenig tierische Produkte sowie moderater Rotweinkonsum [138].

Die vorliegende Arbeit unterstützt die These, dass Kaffeeconsum bzw. die Einnahme von koffeinhaltigen Produkten ebenfalls zu einer gesunden Ernährung gehört. Außerdem liefert die vorliegende Arbeit Hinweise auf potenzielle positive Effekte durch die Einnahme von Curcumin. Dies sollte jedoch an Tier und Mensch weiter untersucht werden, bevor Ernährungsempfehlungen ausgesprochen werden können.

4.8 Schlussfolgerungen

Zusammengefasst lässt sich aus der vorliegenden Arbeit erstens schließen, dass Curcumin und Koffein jeweils den vasoprotektiven Transkriptionsfaktor GRHL3 in EZ hochregulieren, sodass von einem positiven Einfluss der Pflanzeninhaltsstoffe auf die EZ-Funktion auszugehen ist. Zweitens konnte gezeigt werden, dass GRHL3 in Stress-induzierter EZ-Seneszenz herunterreguliert ist, was die Schlüsselrolle des Transkriptionsfaktors für die Aufrechterhaltung der EZ-Funktion verdeutlicht. Drittens kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass Koffein Stress-induzierte EZ-Seneszenz verhindert, was zumindest teilweise die in epidemiologischen Studien beobachtete positive Korrelation von Kaffeekonsum und niedriger kardiovaskulärer Mortalität bei älteren Menschen [83-86] erklären könnte. Dadurch könnte Koffein zu einem potenziell vielversprechenden Wirkstoff auf dem Gebiet der Seneszenz- und Alterungsforschung werden. Insgesamt könnten die Pflanzeninhaltsstoffe Curcumin und Koffein in Zukunft somit eine neue Möglichkeit der Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

5. Literaturverzeichnis

1. WHO, *Fact sheet Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2021: p. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)), 30.03.2022.
2. Timmis, A., et al., *European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019*. Eur Heart J, 2020. **41**(1): p. 12-85.
3. Wilkins, E., et al., *European Cardiovascular Disease Statistics*. European Heart Network, Brussels, 2017.
4. Statistisches Bundesamt, *Ausblick auf die Bevölkerungsentwicklung in Deutschland und den Bundesländern nach dem Corona-Jahr 2020*. 2021.
5. North, B.J. and D.A. Sinclair, *The intersection between aging and cardiovascular disease*. Circ Res, 2012. **110**(8): p. 1097-108.
6. Libby, P., *The changing landscape of atherosclerosis*. Nature, 2021. **592**(7855): p. 524-533.
7. Gimbrone, M.A., Jr. and G. García-Cardena, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 620-36.
8. Visseren, F.L.J., et al., *2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice*. Eur Heart J, 2021. **42**(34): p. 3227-3337.
9. Lichtenstein, A.H., et al., *2021 Dietary Guidance to Improve Cardiovascular Health: A Scientific Statement From the American Heart Association*. Circulation, 2021. **144**(23): p. e472-e487.
10. Farrokh, S., et al., *Critical regulators of endothelial cell functions: for a change being alternative*. Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(14): p. 1212-29.
11. Gross, P.L. and W.C. Aird, *The endothelium and thrombosis*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26**(5): p. 463-78.
12. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 803-15.
13. Panieri, E. and M.M. Santoro, *ROS signaling and redox biology in endothelial cells*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(17): p. 3281-303.
14. Pfeifer, A., et al., *Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice*. Embo j, 1998. **17**(11): p. 3045-51.
15. Morbidelli, L., S. Donnini, and M. Ziche, *Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(7): p. 521-30.
16. Haendeler, J., et al., *Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity*. Nitric Oxide, 1997. **1**(4): p. 282-93.
17. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.
18. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 60-8.
19. Celermajer, D.S., et al., *Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction*. J Am Coll Cardiol, 1994. **24**(6): p. 1468-74.
20. Alley, H., et al., *Ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery in clinical research*. J Vis Exp, 2014(92): p. e52070.
21. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.

22. Wilson, C., M.D. Lee, and J.G. McCarron, *Acetylcholine released by endothelial cells facilitates flow-mediated dilatation*. J Physiol, 2016. **594**(24): p. 7267-7307.
23. Stuehr, D.J., *Structure-function aspects in the nitric oxide synthases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 339-59.
24. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(1): p. R1-12.
25. Alp, N.J. and K.M. Channon, *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(3): p. 413-20.
26. Vásquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
27. Donato, A.J., et al., *Cellular and molecular biology of aging endothelial cells*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **89**(Pt B): p. 122-35.
28. Hoffmann, J., et al., *Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide*. Circ Res, 2001. **89**(8): p. 709-15.
29. Celermajer, D.S., et al., *Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women*. J Am Coll Cardiol, 1994. **24**(2): p. 471-6.
30. Madamanchi, N.R. and M.S. Runge, *Redox signaling in cardiovascular health and disease*. Free Radic Biol Med, 2013. **61**: p. 473-501.
31. Yamawaki, H., J. Haendeler, and B.C. Berk, *Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis*. Circ Res, 2003. **93**(11): p. 1029-33.
32. Torzewski, M., et al., *Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 850-7.
33. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1583-606.
34. Gorgoulis, V., et al., *Cellular Senescence: Defining a Path Forward*. Cell, 2019. **179**(4): p. 813-827.
35. Muñoz-Espín, D. and M. Serrano, *Cellular senescence: from physiology to pathology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 482-96.
36. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
37. Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
38. Dumont, P., et al., *Appearance of biomarkers of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1alpha and TNF-alpha: senescence associated beta-galactosidase activity and morphotype transition*. J Anat, 2000. **197** Pt 4(Pt 4): p. 529-37.
39. Moiseeva, O., et al., *Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(16): p. 4495-507.
40. Acosta, J.C., et al., *A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(8): p. 978-90.
41. Höhn, A., et al., *Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence*. Redox Biol, 2017. **11**: p. 482-501.
42. Ogrodnik, M., *Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo*. Aging Cell, 2021. **20**(4): p. e13338.
43. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 701-4.

44. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 20): p. 3613-22.
45. McHugh, D. and J. Gil, *Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues*. J Cell Biol, 2018. **217**(1): p. 65-77.
46. Storer, M., et al., *Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1119-30.
47. Muñoz-Espín, D., et al., *Programmed cell senescence during mammalian embryonic development*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1104-18.
48. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
49. Demaria, M., et al., *An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA*. Dev Cell, 2014. **31**(6): p. 722-33.
50. Palmer, A.K., et al., *Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes*. Diabetologia, 2019. **62**(10): p. 1835-1841.
51. Melk, A., et al., *Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney*. Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 510-20.
52. Sousa-Victor, P., et al., *Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence*. Nature, 2014. **506**(7488): p. 316-21.
53. Minamino, T. and I. Komuro, *Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 15-26.
54. Jia, G., et al., *Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(7): p. 1802-1809.
55. Minamino, T., et al., *Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction*. Circulation, 2002. **105**(13): p. 1541-4.
56. Matsushita, H., et al., *eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 793-8.
57. Ammon, H.P. and M.A. Wahl, *Pharmacology of Curcuma longa*. Planta Med, 1991. **57**(1): p. 1-7.
58. Aggarwal, B.B. and K.B. Harikumar, *Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(1): p. 40-59.
59. Tang, M. and C. Taghibiglou, *The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2017. **58**(4): p. 1003-1016.
60. Ghanaatian, N., et al., *Curcumin as a therapeutic candidate for multiple sclerosis: Molecular mechanisms and targets*. J Cell Physiol, 2019. **234**(8): p. 12237-12248.
61. Ram, A., M. Das, and B. Ghosh, *Curcumin attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in sensitized guinea pigs*. Biol Pharm Bull, 2003. **26**(7): p. 1021-4.
62. Pourhabibi-Zarandi, F., S. Shojaei-Zarghani, and M. Rafrat, *Curcumin and rheumatoid arthritis: A systematic review of literature*. Int J Clin Pract, 2021. **75**(10): p. e14280.
63. Kumar, S., et al., *Curcumin for maintenance of remission in ulcerative colitis*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **10**: p. Cd008424.
64. Marton, L.T., et al., *The Effects of Curcumin on Diabetes Mellitus: A Systematic Review*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 669448.
65. Cox, F.F., et al., *Protective Effects of Curcumin in Cardiovascular Diseases-Impact on Oxidative Stress and Mitochondria*. Cells, 2022. **11**(3).

66. Schraufstatter, E. and H. Bernt, *Antibacterial action of curcumin and related compounds*. Nature, 1949. **164**(4167): p. 456.
67. Giordano, A. and G. Tommonaro, *Curcumin and Cancer*. Nutrients, 2019. **11**(10).
68. Pourbagher-Shahri, A.M., et al., *Curcumin and cardiovascular diseases: Focus on cellular targets and cascades*. Biomed Pharmacother, 2021. **136**: p. 111214.
69. Kadam, S., et al., *Curcumin reverses diabetes-induced endothelial progenitor cell dysfunction by enhancing MnSOD expression and activity in vitro and in vivo*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(7): p. 1594-1607.
70. Ouyang, J., et al., *Curcumin Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells against H2O2-Induced Cell Injury*. Pain Res Manag, 2019. **2019**: p. 3173149.
71. Fang, X.D., et al., *Curcumin ameliorates high glucose-induced acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(12): p. 1177-82.
72. Fleenor, B.S., et al., *Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging*. Exp Gerontol, 2013. **48**(2): p. 269-76.
73. You, J., et al., *Curcumin induces therapeutic angiogenesis in a diabetic mouse hindlimb ischemia model via modulating the function of endothelial progenitor cells*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 182.
74. Oliver, J.M., et al., *Novel Form of Curcumin Improves Endothelial Function in Young, Healthy Individuals: A Double-Blind Placebo Controlled Study*. J Nutr Metab, 2016. **2016**: p. 1089653.
75. Santos-Parker, J.R., et al., *Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress*. Aging (Albany NY), 2017. **9**(1): p. 187-208.
76. Liu, B., et al., *Monocarbonyl curcumin analog A2 potently inhibits angiogenesis by inducing ROS-dependent endothelial cell death*. Acta Pharmacol Sin, 2019. **40**(11): p. 1412-1423.
77. Grabowska, W., et al., *Curcumin induces senescence of primary human cells building the vasculature in a DNA damage and ATM-independent manner*. Age (Dordr), 2015. **37**(1): p. 9744.
78. Vyas, D., et al., *To study the effect of curcumin on the growth properties of circulating endothelial progenitor cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2015. **51**(5): p. 488-94.
79. Brinkmann, V., et al., *Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent and -Independent Pathways Mediate Curcumin Anti-Aging Effects*. Antioxidants (Basel), 2022. **11**(4).
80. Dei Cas, M. and R. Ghidoni, *Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential*. Nutrients, 2019. **11**(9).
81. Freedman, N.D., et al., *Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality*. N Engl J Med, 2012. **366**(20): p. 1891-904.
82. Gunter, M.J., et al., *Coffee Drinking and Mortality in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study*. Ann Intern Med, 2017. **167**(4): p. 236-247.
83. Greenberg, J.A., et al., *Caffeinated beverage intake and the risk of heart disease mortality in the elderly: a prospective analysis*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(2): p. 392-8.
84. Paganini-Hill, A., C.H. Kawas, and M.M. Corrada, *Non-alcoholic beverage and caffeine consumption and mortality: the Leisure World Cohort Study*. Prev Med, 2007. **44**(4): p. 305-10.
85. Greenberg, J.A., G. Chow, and R.C. Ziegelstein, *Caffeinated coffee consumption, cardiovascular disease, and heart valve disease in the elderly (from the Framingham Study)*. Am J Cardiol, 2008. **102**(11): p. 1502-8.

86. Andersen, L.F., et al., *Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(5): p. 1039-46.
87. van Dongen, L.H., et al., *Coffee consumption after myocardial infarction and risk of cardiovascular mortality: a prospective analysis in the Alpha Omega Cohort*. Am J Clin Nutr, 2017. **106**(4): p. 1113-1120.
88. Di Maso, M., et al., *Caffeinated Coffee Consumption and Health Outcomes in the US Population: A Dose-Response Meta-Analysis and Estimation of Disease Cases and Deaths Avoided*. Adv Nutr, 2021. **12**(4): p. 1160-1176.
89. Kim, Y., Y. Je, and E. Giovannucci, *Coffee consumption and all-cause and cause-specific mortality: a meta-analysis by potential modifiers*. Eur J Epidemiol, 2019. **34**(8): p. 731-752.
90. Spyridopoulos, I., et al., *Caffeine enhances endothelial repair by an AMPK-dependent mechanism*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): p. 1967-74.
91. Wang, L.T., et al., *Caffeine promotes angiogenesis through modulating endothelial mitochondrial dynamics*. Acta Pharmacol Sin, 2021. **42**(12): p. 2033-2045.
92. Ale-Agha, N., et al., *CDKN1B/p27 is localized in mitochondria and improves respiration-dependent processes in the cardiovascular system-New mode of action for caffeine*. PLoS Biol, 2018. **16**(6): p. e2004408.
93. Umemura, T., et al., *Effects of acute administration of caffeine on vascular function*. Am J Cardiol, 2006. **98**(11): p. 1538-41.
94. Shechter, M., et al., *Impact of acute caffeine ingestion on endothelial function in subjects with and without coronary artery disease*. Am J Cardiol, 2011. **107**(9): p. 1255-61.
95. Daly, J.W., *Caffeine analogs: biomedical impact*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(16): p. 2153-69.
96. Fisone, G., A. Borgkvist, and A. Usiello, *Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(7-8): p. 857-72.
97. Banerjee, P., et al., *Fatal caffeine intoxication: a series of eight cases from 1999 to 2009*. J Forensic Sci, 2014. **59**(3): p. 865-8.
98. Tao, L., et al., *Caffeine promotes the expression of telomerase reverse transcriptase to regulate cellular senescence and aging*. Food Funct, 2021. **12**(7): p. 2914-2924.
99. Zhan, H., et al., *Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29662-70.
100. Li, Y.F., et al., *Caffeine Protects Skin from Oxidative Stress-Induced Senescence through the Activation of Autophagy*. Theranostics, 2018. **8**(20): p. 5713-5730.
101. Roeder, R.G., *Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(4): p. 909-15.
102. Ting, S.B., et al., *The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 953-62.
103. Wilanowski, T., et al., *A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to Drosophila grainyhead*. Mech Dev, 2002. **114**(1-2): p. 37-50.
104. Bray, S.J. and F.C. Kafatos, *Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in Drosophila*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1672-83.
105. Uv, A.E., C.R. Thompson, and S.J. Bray, *The Drosophila tissue-specific factor Grainyhead contains novel DNA-binding and dimerization domains which are conserved in the human protein CP2*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 4020-31.

106. Ting, S.B., et al., *Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor Grhl-3*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1513-9.
107. Carpinelli, M.R., et al., *Grainyhead-like Transcription Factors in Craniofacial Development*. J Dent Res, 2017. **96**(11): p. 1200-1209.
108. Ting, S.B., et al., *A homolog of Drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice*. Science, 2005. **308**(5720): p. 411-3.
109. Hislop, N.R., et al., *Grhl3 and Lmo4 play coordinate roles in epidermal migration*. Dev Biol, 2008. **321**(1): p. 263-72.
110. Caddy, J., et al., *Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway*. Dev Cell, 2010. **19**(1): p. 138-47.
111. Lukosz, M., et al., *The transcription factor Grainyhead like 3 (GRHL3) affects endothelial cell apoptosis and migration in a NO-dependent manner*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **412**(4): p. 648-53.
112. Guardiola-Serrano, F., et al., *Gene trapping identifies a putative tumor suppressor and a new inducer of cell migration*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **376**(4): p. 748-52.
113. Haendeler, J., et al., *Two isoforms of Sister-Of-Mammalian Grainyhead have opposing functions in endothelial cells and in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(7): p. 1639-46.
114. Jander, K., et al., *Extra-Nuclear Functions of the Transcription Factor Grainyhead-Like 3 in the Endothelium-Interaction with Endothelial Nitric Oxide Synthase*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(3).
115. Alidadi, M., et al., *The Effect of Curcumin Supplementation on Pulse Wave Velocity in Patients with Metabolic Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. Adv Exp Med Biol, 2021. **1308**: p. 1-11.
116. Kroneis, T., et al., *Global preamplification simplifies targeted mRNA quantification*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45219.
117. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
118. Merk, D., et al., *Caffeine Inhibits Oxidative Stress- and Low Dose Endotoxemia-Induced Senescence-Role of Thioredoxin-1*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(6).
119. Shishodia, S., *Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression*. Biofactors, 2013. **39**(1): p. 37-55.
120. Sun, Y., et al., *Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Premature Senescence via the Activation of SIRT1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. Biol Pharm Bull, 2015. **38**(8): p. 1134-41.
121. Cox, F.F., *Effects of curcumin on endothelial cells*. 2021.
122. Truzzi, F., et al., *An Overview on Dietary Polyphenols and Their Biopharmaceutical Classification System (BCS)*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
123. Moghaddam, N.S.A., et al., *Hormetic effects of curcumin: What is the evidence?* J Cell Physiol, 2019. **234**(7): p. 10060-10071.
124. Lima, C.F., C. Pereira-Wilson, and S.I. Rattan, *Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: relevance for anti-aging intervention*. Mol Nutr Food Res, 2011. **55**(3): p. 430-42.
125. Son, S., et al., *Curcumin Stimulates Proliferation of Spinal Cord Neural Progenitor Cells via a Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway*. J Korean Neurosurg Soc, 2014. **56**(1): p. 1-4.
126. Stohs, S.J., et al., *Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review*. Molecules, 2020. **25**(6).
127. Matsuoka, S., et al., *Caffeine induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells through the caspase-9 pathway*. Gynecol Endocrinol, 2006. **22**(1): p. 48-53.

128. Li, H., et al., *Caffeine-induced endothelial cell death and the inhibition of angiogenesis*. Anat Cell Biol, 2013. **46**(1): p. 57-67.
129. Svilaas, A., et al., *Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans*. J Nutr, 2004. **134**(3): p. 562-7.
130. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
131. Vasa, M., et al., *Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence*. Circ Res, 2000. **87**(7): p. 540-2.
132. Saleh, T., L. Tyutyunyk-Massey, and D.A. Gewirtz, *Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy*. Cancer Res, 2019. **79**(6): p. 1044-1046.
133. Patel, P.L., et al., *Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(34): p. E5024-33.
134. Zvereva, M.I., D.M. Shcherbakova, and O.A. Dontsova, *Telomerase: structure, functions, and activity regulation*. Biochemistry (Mosc), 2010. **75**(13): p. 1563-83.
135. Naderi, S.H., J.P. Bestwick, and D.S. Wald, *Adherence to drugs that prevent cardiovascular disease: meta-analysis on 376,162 patients*. Am J Med, 2012. **125**(9): p. 882-7.e1.
136. Chowdhury, R., et al., *Adherence to cardiovascular therapy: a meta-analysis of prevalence and clinical consequences*. Eur Heart J, 2013. **34**(38): p. 2940-8.
137. Arnett, D.K., et al., *2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2019. **74**(10): p. 1376-1414.
138. Salas-Salvadó, J., et al., *Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease Prevention: What Do We Know?* Prog Cardiovasc Dis, 2018. **61**(1): p. 62-67.

Danksagung

Ich danke zuerst meinen Doktoreltern Prof. Dr. Yogi Altschmied und Prof. Dr. Jojo Haendeler für das spannende Thema und die großartige Betreuung. Beide waren bei Fragen oder Problemen immer für mich ansprechbar. Außerdem haben sie sich stets für eine Arbeitsatmosphäre eingesetzt, in der sich jeder auf jeden verlassen kann. Ich weiß, dass das nicht selbstverständlich ist, und bin sehr froh, meine Doktorarbeit in dieser Arbeitsgruppe gemacht zu haben!

Dementsprechend bedanke ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die Hilfe, Unterstützung, die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und nicht zuletzt für die gute Stimmung im Labor und Büro. Danke an Jan, Nilo, Philipp, Olaf, Flo, Fiona, Dennis und Nadine!

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Zum Schluss danke ich meiner Familie und meinem Freund Timo, die mich immer unterstützen, motivieren und ein offenes Ohr für mich haben.