

Aus dem Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Der Einfluss von Pflanzeninhaltsstoffen auf das Endothel und  
die Adipozytendifferenzierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizinwissenschaften (Dr. rer. med.)  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Fiona Frederike Cox  
(2026)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Gutachter/innen: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler,  
Univ.-Prof. Dr. med. Maria Grandoch

*Für meine geliebte Familie*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Cox, 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

Merk, D. \*, Cox, F. \*, Jakobs, P., Prömel, S., Altschmied, J., Haendeler, J., (2024) Dose-Dependent Effects of Lipopolysaccharide on the Endothelium—Sepsis versus Metabolic Endotoxemia-Induced Cellular Senescence. *Antioxidants*, (13, 4), 443

Jakobs, P. \*, Rafflenbeul, A. \*, Post, W.B. \*, Ale-Agha, N., Groß, V.E., Pick, S., Dolata, S., Cox, F., von Ameln, F., Eckermann, O., Altschmied, J., Prömel, S., Haendeler, J., (2024) The Adhesion GPCR ADGRL2/LPHN2 Can Protect Against Cellular and Organismal Dysfunction. *Cells*, (13, 22), 1826

## I. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit und eng mit endothelialer Dysfunktion, oxidativem Stress und zellulärer Seneszenz verknüpft. Der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) steuert die Expression zahlreicher antioxidativer und zellprotektiver Enzyme und trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung der endothelialen Redoxhomöostase bei. Perivaskuläres Fettgewebe wirkt über vasoaktive und inflammatorische Mediatoren zusätzlich auf die Gefäßfunktion ein. Pflanzliche Inhaltsstoffe wie Curcumin und Koffein rücken zunehmend in den Fokus, da klinische, experimentelle und epidemiologische Studien auf kardioprotektive Effekte hindeuten, deren molekulare Mechanismen jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Curcumin und Koffein auf die Nrf2-Aktivierung in Endothelzellen, auf die vorzeitige, Stress-induzierte Endothelzellseneszenz sowie auf die Adipogenese untersucht. Hierzu wurde ein Nrf2-spezifisches Luziferase-Reportersystem mit intakten und mutierten, multimerisierten Nrf2-Bindungsstellen konstruiert und in primären humanen Endothelzellen funktionell validiert. Anschließend wurden Kurzzeitexperimente mit Curcumin und Koffein zur Analyse der Nrf2-Aktivität und Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD)-Expression durchgeführt, gefolgt von Langzeitmodellen einer vorzeitigen, Stress-induzierten Seneszenz durch wiederholte Wasserstoffperoxid-Exposition oder niedrig-Dosis Endotoxämie. Ergänzend wurde in einer Pilotstudie in einem 3T3-L1-Zellmodell der Einfluss beider Substanzen auf die Adipogenese und die Expression adipogener und thermogener Marker geprüft.

Die Ergebnisse zeigen, dass Curcumin in Kurzzeitexperimenten in Endothelzellen eine ausgeprägte Nrf2-abhängige Aktivierung mit deutlicher Steigerung der Reporteraktivität und einer Hochregulation der MnSOD-Proteinmenge auslöst, während Koffein keinen Einfluss auf diese Parameter hat. In den Seneszenzmodellen führten oxidativer Stress und niedrig-Dosis Endotoxämie zu einem Anstieg von p21 und einer Abnahme der endothelialen NO-Synthase. Curcumin zeigte hierbei nur auf Einzelzellebene protektive Effekte, wohingegen Koffein die p21-Zunahme abschwächte und den Verlust von eNOS verringerte. Im Adipozytenmodell wurden eine erfolgreiche Differenzierung und eine Modulation adipogener und thermogener Marker beobachtet. Einzelne Curcumin- und Koffeinkonzentrationen beeinflussten ausgewählte Marker in differenzierten und undifferenzierten Zellen, diese Effekte sind jedoch nur vorläufige Beobachtungen und müssen in zukünftigen Studien bestätigt werden.

Insgesamt deutet die Arbeit darauf hin, dass Curcumin kurzzeitig vor allem über eine Aktivierung des Nrf2-Signalwegs und die Induktion antioxidativer Enzyme wirkt, während Koffein in beiden Modellen der vorzeitigen, Stress-induzierten Endothelzellseneszenz protektive Eigenschaften entfaltet. Beide Substanzen beeinflussen zudem adipogene und thermogene Marker im Adipozytenmodell und verknüpfen damit vaskuläre und metabolische Aspekte. Es sind jedoch weiterführende Studien notwendig, um ihr Potenzial in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen zu bewerten.

## II. Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and are closely linked to endothelial dysfunction, oxidative stress, and cellular senescence. The transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) controls the expression of numerous antioxidant and cell-protective enzymes and contributes significantly to maintaining endothelial redox homeostasis. Perivascular adipose tissue additionally affects vascular function via vasoactive and inflammatory mediators. Plant-derived natural compounds such as curcumin and caffeine are increasingly coming into focus, as clinical, experimental, and epidemiological studies suggest cardioprotective effects, although the molecular mechanisms involved are not yet fully understood.

This dissertation examined the effects of curcumin and caffeine on Nrf2 activation in endothelial cells, on premature, stress-induced endothelial cell senescence, and on adipogenesis. For this purpose, an Nrf2-specific luciferase reporter system with intact and mutated, multimerized Nrf2 binding sites was constructed and functionally validated in primary human endothelial cells. Short-term experiments with curcumin and caffeine were then conducted to analyze Nrf2 activity and manganese superoxide dismutase (MnSOD) expression, followed by long-term models of premature, stress-induced senescence through repeated hydrogen peroxide exposure or low-dose endotoxemia. In addition, a pilot study in a 3T3-L1 cell model examined the influence of both compounds on adipogenesis and the expression of adipogenic and thermogenic markers.

The results show that short-term curcumin exposure induces significant Nrf2-dependent activation in endothelial cells, with a marked increase in reporter gene activity and upregulation of MnSOD protein levels, whereas caffeine has no effect on these parameters. In the senescence models, oxidative stress and low-dose endotoxemia led to an increase in p21 and a decrease in endothelial NO synthase. Curcumin showed protective effects only at the single-cell level, whereas caffeine attenuated the increase in p21 and reduced the loss of eNOS. In the adipocyte model, successful differentiation and modulation of adipogenic and thermogenic markers were observed. Individual curcumin and caffeine concentrations influenced selected markers in differentiated and undifferentiated cells, but these effects are only preliminary observations and need to be confirmed in future studies.

Overall, the dissertation shows that curcumin mainly works short-term by activating the Nrf2 pathway and inducing antioxidant enzymes, while caffeine has protective properties in both models of premature, stress-induced endothelial cell senescence. Both compounds also affect adipogenic and thermogenic markers in the adipocyte model, linking vascular and metabolic aspects. However, further studies are needed to evaluate their potential in the prevention of cardiovascular diseases.

## III. Abkürzungsverzeichnis

| Kürzel                       | Bezeichnung   |
|------------------------------|---|
| (v/v)                        | <i>volume per volume</i>                              |
| (w/v)                        | <i>weight per volume</i>                              |
| µg                           | Mikrogramm  |
| µl                           | Mikroliter  |
| µM                           | Mikromolar  |
| µm                           | Mikrometer  |
| %                            | Prozent   |
| •O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Superoxidanion  |
| •OH                          | Hydroxylradikal                                       |
| °C                           | Grad Celsius  |
| <b>ADGRL2/LPHN2</b>          | Adhäsions-G-Protein-gekoppelte Rezeptor Latrophilin-2 |
| <b>AMP</b>                   | Adenosinmonophosphat                                  |
| <b>AMPK</b>                  | AMP-aktivierte Proteinkinase                          |
| <b>ANOVA</b>                 | <i>analysis of variance</i>                           |
| <b>AP-1</b>                  | Aktivator-Protein 1                                   |
| <b>APS</b>                   | Ammoniumpersulfat                                     |
| <b>aPWV</b>                  | <i>aortic pulse wave velocity</i>                     |
| <b>ARE</b>                   | <i>antioxidative response element</i>                 |
| <b>ASK1</b>                  | Apoptose-Signal regulierende Kinase 1                 |
| <b>ATP</b>                   | Adenosintriphosphat                                   |
| <b>BAT</b>                   | <i>brown adipose tissue</i>                           |
| <b>BH<sub>4</sub></b>        | Tetrahydrobiopterin                                   |
| <b>BLAST</b>                 | Basic Local Alignment Search Tool                     |
| <b>bp</b>                    | Basenpaar   |
| <b>BSA</b>                   | <i>bovine serum albumin</i>                           |
| <b>CDK</b>                   | cyclinabhängiger Kinasen                              |
| <b>cDNA</b>                  | <i>complementary DNA</i>                              |
| <b>Cidea</b>                 | <i>cell death inducing DFFA like effector A</i>       |
| <b>CO<sub>2</sub></b>        | Kohlenstoffdioxid                                     |
| <b>COX</b>                   | Cyclooxygenase  |
| <b>CRP</b>                   | C-reaktives Protein                                   |
| <b>C<sub>t</sub></b>         | Schwellenzyklus                                       |
| <b>Cul3</b>                  | Cullin-3  |
| <b>Curc</b>                  | Curcumin  |
| <b>DAPI</b>                  | 4',6-Diamidino-2-Phenylindol                          |
| <b>DMEM</b>                  | <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>               |
| <b>DMSO</b>                  | Dimethylsulfoxid                                      |
| <b>DNA</b>                   | <i>deoxy ribonucleic acid</i>                         |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>DTT</b>                        | Dithiothreitol  |
| <b><i>E.coli</i></b>              | <i>Escherichia coli</i>   |
| <b>EBM</b>                        | Endotheliales Basalmedium   |
| <b>EDTA</b>                       | Ethylendiamintetraacetat  |
| <b>EGF</b>                        | <i>epidermal growth factor</i>                                      |
| <b>eNOS</b>                       | endotheliale NO-Synthase  |
| <b>EPIC</b>                       | <i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i> |
| <b>EZ</b>                         | Endothelzelle   |
| <b>FBS</b>                        | Fötale Kälberserum  |
| <b>FDA</b>                        | <i>Food and Drug Administration</i>                                 |
| <b>FMD</b>                        | <i>flow mediated dilation</i>                                       |
| <b>G</b>                          | Guanin  |
| <b>gDNA</b>                       | genomic DNA   |
| <b>GOI</b>                        | Gen von Interesse   |
| <b>GPx</b>                        | Glutathionperoxidase  |
| <b>GR</b>                         | Glutathion-Reduktase  |
| <b>GST</b>                        | Glutathion-S-Transferase  |
| <b>GSTa1</b>                      | Glutathion-S-Transferase, alpha 1 (Ya)                              |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Wasserstoffperoxid  |
| <b>HCl</b>                        | Chlorwasserstoff  |
| <b>HRP</b>                        | <i>horseradish peroxidase</i>                                       |
| <b>HUVEC</b>                      | Humane Nabelvenen-Endothelzellen                                    |
| <b>IB</b>                         | Immunoblot  |
| <b>IBMX</b>                       | 3-isobutyl-1-methylxanthine   |
| <b>ICAM-1</b>                     | <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>                            |
| <b>IF</b>                         | Immunfluoreszenzfärbung   |
| <b>IL-6</b>                       | Interleukin-6   |
| <b>KCl</b>                        | Kaliumchlorid   |
| <b>kDa</b>                        | Kilodalton  |
| <b>Keap1</b>                      | Kelch-like ECH-assoziierte Protein 1                                |
| <b>KOAc</b>                       | Kaliumacetat  |
| <b>Koff</b>                       | Koffein   |
| <b>Ktrl</b>                       | Kontrolle   |
| <b>LB</b>                         | <i>Lysogeny Broth</i>   |
| <b>LPS</b>                        | Lipopolysaccharid   |
| <b>LR</b>                         | <i>Low Range</i>  |
| <b>Mg<sup>2+</sup></b>            | Magnesium   |
| <b>MnSOD</b>                      | Mangan-Superoxid-Dismutase  |
| <b>MP</b>                         | Magermilchpulver  |
| <b>mtROS</b>                      | mitochondriales ROS   |
| <b>NaCl</b>                       | Natriumchlorid  |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>NADPH</b>           | Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat                                     |
| <b>NF-κB</b>           | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>     |
| <b>NIH–AARP</b>        | <i>National Institutes of Health–AARP Diet and Health</i>                   |
| <b>NLS</b>             | <i>nuclear localisation signal</i>  |
| <b>NO</b>              | Stickstoffmonoxid   |
| <b>NOX</b>             | Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat Oxidasen                            |
| <b>NQO1</b>            | NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1   |
| <b>Nrf2</b>            | <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>                          |
| <b>NZS</b>             | Normales Ziegenserum  |
| <b>O<sub>2</sub></b>   | Sauerstoff  |
| <b>P-Selektin</b>      | <i>Platelet selectin</i>  |
| <b>PBS</b>             | Phosphatgepufferte Salzlösung   |
| <b>PFA</b>             | Paraformaldehyd   |
| <b>Pgc1α</b>           | <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha</i> |
| <b>PGE<sub>2</sub></b> | Prostaglandin E <sub>2</sub>  |
| <b>PGI<sub>2</sub></b> | Prostacyclin  |
| <b>PKCδ</b>            | Protein Kinase C Delta  |
| <b>Ppary</b>           | <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>                     |
| <b>PP<sub>i</sub></b>  | anorganisches Pyrophosphat  |
| <b>PVAT</b>            | <i>perivascular adipose tissue</i>  |
| <b>PVDF</b>            | Polyvinyliden fluorid   |
| <b>qRT-PCR</b>         | Semi-quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion                        |
| <b>Rb</b>              | Retinoblastom   |
| <b>Ref-1</b>           | Redoxfaktor 1   |
| <b>RIPA</b>            | <i>radio-immunoprecipitation assay</i>                                      |
| <b>RLB</b>             | <i>Reporter Lysis Buffer</i>  |
| <b>RLU</b>             | <i>Relative Light Unit</i>  |
| <b>RNA</b>             | <i>ribonucleic acid</i>   |
| <b>ROS</b>             | reaktive Sauerstoffspezies  |
| <b>RPL32</b>           | <i>Large Ribosomal Subunit Protein EL32</i>                                 |
| <b>RT</b>              | Raumtemperatur  |
| <b>SA-β-Gal</b>        | Seneszenz-assoziierten Beta-Galaktosidase                                   |
| <b>SASP</b>            | <i>senescence-associated secretory phenotype</i>                            |
| <b>SDS</b>             | Natriumdodecylsulfat  |
| <b>SDS-PAGE</b>        | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                        |
| <b>sMaf</b>            | <i>small musculoaponeurotic fibrosarcoma protein</i>                        |
| <b>SOD</b>             | Superoxiddismutase  |
| <b>TAE</b>             | TRIS-Acetat-EDTA  |
| <b>tBHQ</b>            | tert-Butylhydrochinon   |
| <b>TEMED</b>           | Tetramethylethylendiamin  |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tumornekrosefaktor $\alpha$                 |
| <b>Trx</b>                     | Thioredoxin                                 |
| <b>TrxR</b>                    | Thioredoxin-Reduktase                       |
| <b>u.a.</b>                    | <i>unter anderem</i>                        |
| <b>UCP</b>                     | <i>Uncoupling protein</i>                   |
| <b>UpM</b>                     | Umdrehungen pro Minute                      |
| <b>VCAM-1</b>                  | <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>    |
| <b>VEGF-A</b>                  | <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> |
| <b>WHO</b>                     | <i>World Health Organization</i>            |

|                               |  |        |
|-------------------------------|--|--------|
| <b>IV. Inhaltsverzeichnis</b> |  |        |
| I.                            | ZUSAMMENFASSUNG  | I      |
| II.                           | SUMMARY  | II     |
| III.                          | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS  | III    |
| IV.                           | INHALTSVERZEICHNIS   | VII    |
| 1.                            | EINLEITUNG   | - 1 -  |
| 1.1                           | <b>Kardiovaskuläres System</b>   | - 1 -  |
| 1.2                           | <b>Endothel</b>  | - 2 -  |
| 1.3                           | <b>Oxidative und Antioxidative Systeme im Endothel</b>                                 | - 4 -  |
| 1.4                           | <b>Endothelzellseneszenz</b>   | - 9 -  |
| 1.5                           | <b>Pflanzeninhaltsstoffe</b>   | - 11 - |
| 1.5.1                         | Curcumin   | - 11 - |
| 1.5.2                         | Koffein  | - 14 - |
| 1.6                           | <b>Ziele der Arbeit</b>  | - 16 - |
| 2.                            | MATERIAL UND METHODEN  | - 17 - |
| 2.1                           | <b>Material</b>  | - 17 - |
| 2.1.1                         | Chemikalien  | - 17 - |
| 2.1.2                         | Zellkultur   | - 18 - |
| 2.1.3                         | Kits   | - 19 - |
| 2.1.4                         | Verbrauchsmaterialien  | - 19 - |
| 2.1.5                         | Instrumente  | - 19 - |
| 2.1.6                         | Oligonukleotide  | - 20 - |
| 2.1.7                         | Antikörper   | - 21 - |
| 2.2                           | <b>Methoden</b>  | - 24 - |
| 2.2.1.                        | Molekularbiologische Methoden  | - 24 - |
| 2.2.2.                        | Zellbiologische Methoden   | - 32 - |
| 2.2.3.                        | Analytische Methoden   | - 36 - |
| 3.                            | ERGEBNISSE   | - 42 - |
| 3.1                           | <b>Design eines Nrf2-abhängigen Reportersystems</b>                                    | - 42 - |
| 3.2                           | <b>Klonierung der Luziferase-Reportervektoren mit unveränderten und mutierten AREs</b> | - 43 - |

---

|              |   |               |
|--------------|---|---------------|
| <b>3.3</b>   | <b>Testung des Nrf2-abhängigen Reportersystems</b>  | <b>- 50 -</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>Regulation der transkriptionellen Aktivität von Nrf2 durch Curcumin</b>                  | <b>- 53 -</b> |
| <b>3.5</b>   | <b>Effekt von Koffein auf die Nrf2-Aktivität in Endothelzellen</b>                          | <b>- 56 -</b> |
| <b>3.6</b>   | <b>Einfluss von Koffein auf die Mangan-Superoxid-Dismutase</b>                              | <b>- 58 -</b> |
| <b>3.7</b>   | <b>Endothelzellseneszenz</b>  | <b>- 59 -</b> |
| <b>3.7.1</b> | <b>Einfluss von Curcumin auf die Endothelzellseneszenz</b>                                  | <b>- 60 -</b> |
| <b>3.7.2</b> | <b>Einfluss von Koffein auf die Endothelzellseneszenz</b>                                   | <b>- 68 -</b> |
| <b>3.8</b>   | <b>Pilotstudie zum Einfluss von Curcumin und Koffein auf die Adipogenese</b>                | <b>- 70 -</b> |
| <b>3.8.1</b> | <b>Einfluss von Curcumin auf die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten</b> | <b>- 73 -</b> |
| <b>3.8.2</b> | <b>Einfluss von Koffein auf die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten</b>  | <b>- 79 -</b> |
| <b>4.</b>    | <b>DISKUSSION</b>   | <b>- 83 -</b> |
| <b>4.1</b>   | <b>Design und Testung des Nrf2-abhängigen Reportersystems</b>                               | <b>- 83 -</b> |
| <b>4.2</b>   | <b>Kurzzeitexperimente mit 7,5 <math>\mu</math>M Curcumin</b>                               | <b>- 84 -</b> |
| <b>4.3</b>   | <b>Kurzzeitexperimente mit 50 <math>\mu</math>M Koffein</b>                                 | <b>- 86 -</b> |
| <b>4.4</b>   | <b>Einfluss von Curcumin auf die Endothelzellseneszenz</b>                                  | <b>- 86 -</b> |
| <b>4.5</b>   | <b>Einfluss von Koffein auf die Endothelzellseneszenz</b>                                   | <b>- 89 -</b> |
| <b>4.6</b>   | <b>Pilotstudie zum Einfluss von Curcumin und Koffein auf die Adipogenese</b>                | <b>- 90 -</b> |
| <b>4.7</b>   | <b>Schlussfolgerungen</b>   | <b>- 92 -</b> |
| <b>5.</b>    | <b>QUELLENVERZEICHNIS</b>   | <b>- 93 -</b> |

DANKSAGUNG

# 1. Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläres System

Das kardiovaskuläre System umfasst das Herz und die Blutgefäße und ist verantwortlich für die kontinuierliche Versorgung aller Organe und Gewebe mit Blut. Der Fluss des sauerstoffreichen Blutes folgt einem präzisen Verlauf: Beginnend in der Lunge, gelangt es über das Herz in die größeren Arterien, die sich in immer kleinere Arteriolen verzweigen, bis hin zu den feinsten Kapillaren. An diesen Kapillaren erfolgt der essenzielle Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen sowie von Kohlenstoffdioxid und anderen Molekülen zwischen dem Blut und den umgebenden Geweben. Das daraus resultierende sauerstoffarme Blut wird dann über das Herz in die Lunge gepumpt, wo es durch den Gasaustausch in den Aveolen wieder mit Sauerstoff angereichert wird.

Schätzungen zufolge erstreckt sich das menschliche kardiovaskuläre System über eine Gesamtlänge von etwa 100.000 Kilometern (Krogh, 1929). Obwohl neuere Studien einige Variationen in dieser Zahl zeigen (Poole et al., 2021), bleibt das kardiovaskuläre System aufgrund seiner enormen Ausdehnung und Komplexität von herausragender Bedeutung für die Funktionsweise des Körpers. Es spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase und ist somit unverzichtbar für die Gesundheit und das Überleben.

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, insbesondere die ischämische Herzkrankheit und Schlaganfälle, zählen mit 32 % aller Todesfälle zu den weltweit häufigsten Todesursachen (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, abgerufen am 14.03.2025). Auch nationale Daten bestätigen, dass etwa ein Drittel (ca. 33 %) aller Todesfälle in Deutschland auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückgeht (Statistisches Bundesamt, [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html#sprg235878](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg235878), abgerufen am 13.05.2025). Weltweit sterben jährlich etwa 20,5 Millionen Menschen (Stand 2021) an kardiovaskulären Erkrankungen, mit einer steigenden Tendenz (2019 waren es noch 18 Millionen Todesfälle, (Lindstrom et al., 2022)).

Das kardiovaskuläre System wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst, die sowohl physiologische als auch Umweltfaktoren umfassen. Diese Faktoren können die Struktur und Funktion des Herzens sowie der Blutgefäße direkt oder indirekt verändern und das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen. Unausgewogene Ernährung, mangelnde Bewegung, genetische Prädispositionen, Umweltfaktoren wie Stress und Rauchen sind dabei wesentliche Modulatoren (Cosselman et al., 2015; Tikkanen et al., 2018). Ein gesunder Lebensstil, der eine ausgewogene Ernährung, regelmäßige Bewegung und den Verzicht auf schädliche Gewohnheiten wie Rauchen umfasst, stellt daher eine wichtige Strategie zur Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar (Lichtenstein et al., 2021; Parmar et al., 2023).

Eine Schlüsselrolle in diesem Zusammenhang spielt das Endothel, die innerste Zellschicht der Blutgefäße, deren Funktion maßgeblich von diesen Einflussfaktoren abhängt. Eine endotheliale Dysfunktion steht in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (Poredos, 2002). Vor diesem Hintergrund gewinnt die Erforschung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion sowie die Untersuchung potenzieller

therapeutischer Angriffspunkte mittels z.B. Pflanzeninhaltsstoffen direkt an Endothelzellen (EZ) zunehmend an Bedeutung.

## 1.2 Endothel

Das Endothel ist eine flache Einzelschicht aus Endothelzellen, erstmalig in den 1860ern von Wilhelm His beschrieben, und kleidet das Innere der Blut- und Lymphgefäße aus (His, 1865). Das Endothel zählt als wichtigste Komponente der *Tunica intima*. Es bildet eine Barriere zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe und ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt (Abbildung 1).

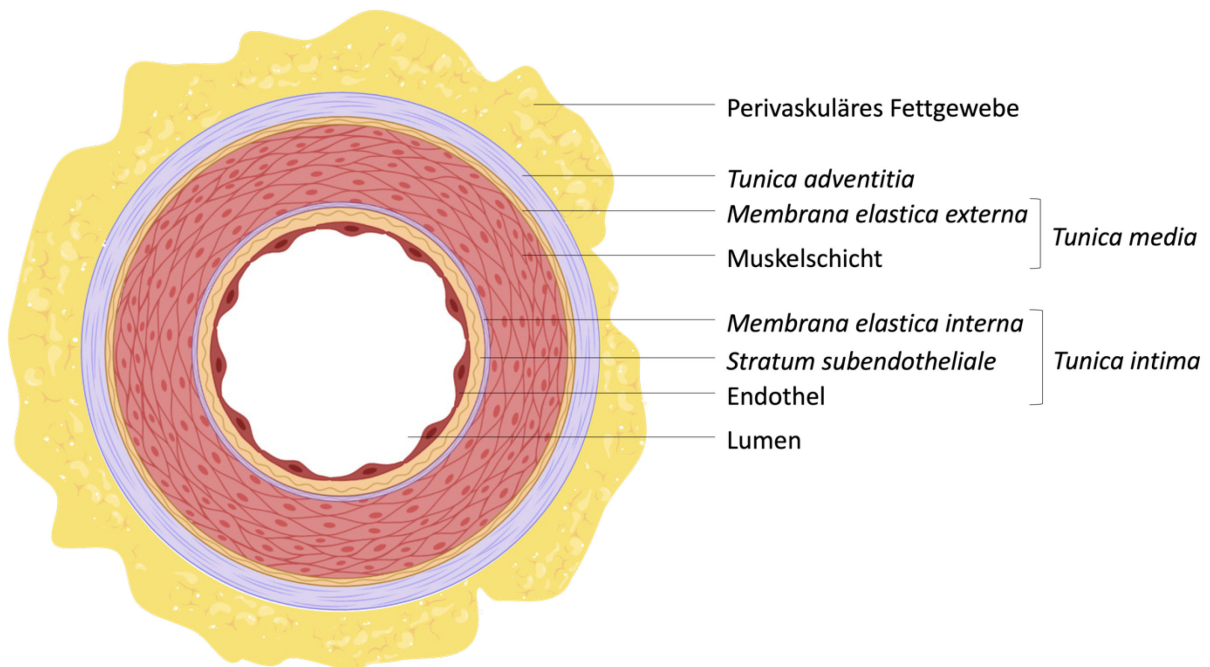


Abbildung 1: **Schematischer Querschnitt durch ein (arterielles) Blutgefäß.** Das Blutgefäß wird von perivaskulärem Fettgewebe umgeben und weist eine dreischichtige Struktur auf, die nach apikaler Richtung benannt ist: Tunica adventitia, Tunica media und Tunica intima. Die innere Schicht wird durch das Endothel gebildet, das als Barriere zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe zählt. Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com und modifiziert in PowerPoint.

Es wird von lockerem Bindegewebe (*Stratum subendotheliale*) welches aus Kollagen und elastischen Fasern besteht und der Basalmembran (bei größeren Arterien die interne elastische Membran (*Membrana elastica interna*)) umgeben. Angrenzend befindet sich die *Tunica media*, bestehend aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern. Darauf folgt, getrennt von der äußeren elastischen Membran (*Membrana elastica externa*), die *Tunica adventitia*. Diese besteht aus lockerem Bindegewebe und kollagenproduzierenden Fibroblasten. Das perivaskuläre Fettgewebe (*perivascular adipose tissue*, PVAT) umhüllt insbesondere größere Blutgefäße und wirkt als endokrines Organ, das einen bedeutenden Einfluss auf die Gefäßfunktion ausüben kann (Hillock-Watling & Gotlieb, 2022). Eine detaillierte Betrachtung zu diesem Thema und dem Crosstalk zwischen Endothel und PVAT wird in einem nachfolgenden Kapitel gegeben (Kapitel 3.8). Je nach Lage und Funktion der Blutgefäße im Körper variieren die Dicke und Zusammensetzung dieser Schichten.

Seit den 1980er Jahren hat sich das Verständnis des Endothels grundlegend gewandelt: Es wird heute nicht mehr als passive Zellschicht betrachtet, sondern als adaptives, signalvermittelndes Organ, das aktiv an vaskulären, metabolischen und immunologischen Prozessen beteiligt ist (Furchgott & Zawadzki, 1980; Krüger-Genge et al., 2019). Neben seiner essenziellen Barrierefunktion übernimmt das Endothel zahlreiche weitere zentrale Aufgaben im Gefäßsystem. Es reguliert maßgeblich die Blutgerinnung, indem es ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-koagulatorischen Faktoren aufrechterhält (Farrokh et al., 2015). Zu den wichtigsten vom Endothel freigesetzten Vasodilatoren zählen Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO), die beide gefäßerweiternd wirken und die Thrombozytenaggregation hemmen. PGI<sub>2</sub> wird durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1), NO durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) mittels katalytischer Umwandlung von Arginin und Sauerstoff gebildet und ist ein Schlüsselfaktor für die Aufrechterhaltung der endothelialen Funktionalität (Mitchell et al., 2008). Die Synthese von NO wird unter anderem durch den *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A) stimuliert, der darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Angiogenese spielt, indem er die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördert (Klagsbrun & D'Amore, 1996).

Gleichzeitig produziert das Endothel auch potente Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 (Yanagisawa et al., 1988), einen der stärksten endogenen Vasokonstriktoren. Durch die regulierte Freisetzung von vasoaktiven Substanzen trägt das Endothel wesentlich zur Regulation des Gefäßtonus, des Blutdrucks und des Blutflusses bei. Die Bedeutung von NO wird besonders deutlich, da Störungen in seiner Homöostase mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert sind. Eine endotheliale Dysfunktion wird unter anderem häufig mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit gleichgesetzt und teilweise sogar synonym verwendet (Yetik-Anacak & Catravas, 2006).

Darüber hinaus ist das Endothel maßgeblich an der Angiogenese beteiligt, einem Prozess, der für die Gewebshelung und -regeneration unerlässlich ist. Endothelzellen migrieren und ermöglichen so die Bildung neuer Gefäßstrukturen (Lamallice et al., 2007). Nicht zuletzt spielt das Endothel eine Schlüsselrolle bei der Entzündungsreaktion und Immunantwort, indem es gezielt den Übertritt von Immunzellen und anderen Molekülen ins Gewebe steuert. Über die Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. *Platelet selectin* (P-Selektin), *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1), *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1)) und Chemokinen reguliert es die Rekrutierung von Leukozyten und ermöglicht deren Transmigration. Somit ist das Endothel aktiv an der Immunüberwachung und -regulation beteiligt (Kadl & Leitinger, 2005), wobei insbesondere die Redoxhomöostase eine entscheidende Rolle für seine Funktionalität spielt.

Die Redoxhomöostase bezeichnet das dynamische Gleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und ihrer Neutralisation. Dieses Gleichgewicht ist essenziell für die Aufrechterhaltung der zellulären Funktion, der Gefäßintegrität und der Signaltransduktion (Sies & Jones, 2020). Wird dieses Gleichgewicht durch externe oder interne Stressoren gestört, kommt es zu oxidativem Stress, der die Funktion der Endothelzellen beeinträchtigen und die Entwicklung vaskulärer Erkrankungen begünstigen kann (Schulz et al., 2011; Thomas et al., 2008). Um dem entgegenzuwirken, verfügt das Endothel über mehrere oxidative und antioxidative Systeme, welche im nun folgenden Kapitel näher betrachtet werden.

### 1.3 Oxidative und Antioxidative Systeme im Endothel

Im Endothel beeinflussen oxidative und antioxidative Systeme gemeinsam die Gefäßfunktion. Die antioxidativen Systeme des Endothels spielen eine zentrale Rolle beim Schutz der Gefäßinnenwand vor schädlichen Auswirkungen induziert durch oxidativen Stress. Oxidativer Stress entsteht überwiegend durch eine Akkumulation von ROS, die entweder endogen als Nebenprodukte physiologischer Stoffwechselprozesse, insbesondere in den Mitochondrien (mtROS), oder durch externe Einflüsse wie z.B. Umweltfaktoren, UV-Strahlung oder ungesunde Ernährung gebildet werden (Ray & Shah, 2005; Sharifi-Rad et al., 2020). Zu den ROS zählen sowohl freie Radikale wie das Superoxidanion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) und das Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) als auch nicht-radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Abbildung 2).

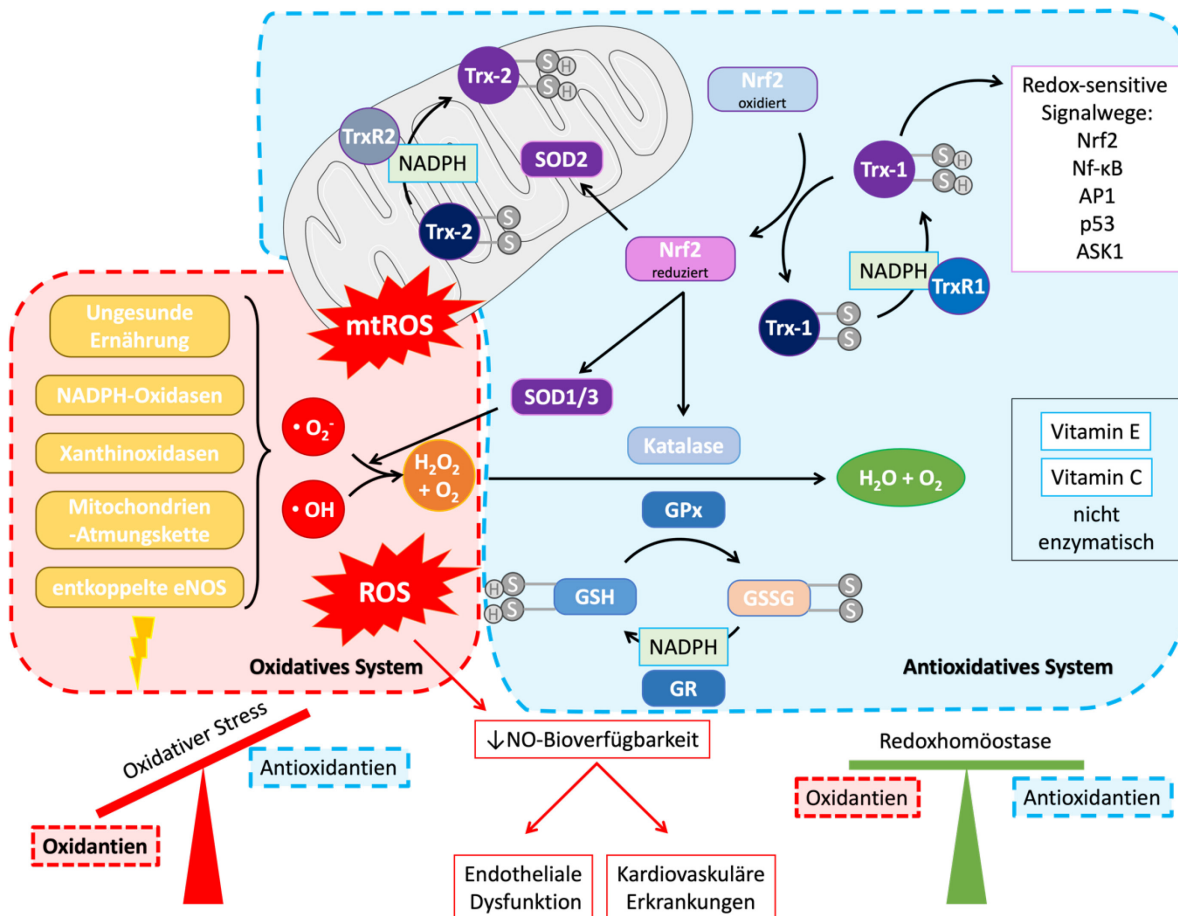


Abbildung 2: Die oxidativen und antioxidativen Systeme im Endothel. Das Schema zeigt auf der linken Seite, im rot hinterlegten Bereich, zentrale Quellen für oxidativen Stress (ungesunde Ernährung, NADPH-Oxidasen, Xanthinoxidasen, mitochondriale Atmungskette, entkoppelte eNOS) die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS/mtROS) wie Superoxidradikale ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) und Hydroxylradikale ( $\bullet\text{OH}$ ) führen. Rechts, im blau hinterlegten Bereich, sind die wichtigsten antioxidativen Systeme im Endothel dargestellt: Superoxid-Dismutasen (SOD1/2/3) wandeln Superoxid in molekularen Sauerstoff und  $\text{H}_2\text{O}_2$  um, das anschließend durch die Katalase oder das Glutathion-System (GSH/GSSG, Glutathionperoxidase (GPx), Glutathion-Reduktase (GR)) unter Verbrauch von NADPH zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wird. Die NADPH-abhängigen Thioredoxin-Systeme, bestehend aus TrxR1/Trx-1 im Zytosol und Nukleus sowie TrxR2/Trx-2 in den Mitochondrien, regenerieren oxidierte Thioredoxine, welche zuvor oxidierte Proteine reduziert haben. Dadurch tragen Thioredoxine zur Aufrechterhaltung redox-sensitiver Signalwege (z. B. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B), Aktivator-Protein 1 (AP-1), p53, Apoptose-Signal regulierende Kinase 1 (ASK1)) bei. Nrf2 fungiert als zentraler Transkriptionsfaktor, der unter oxidativem Stress die

*Expression antioxidativer Enzyme (u. a. SOD, Katalase, GPx, Trx-1, TrxR1) erhöht. Ein Ungleichgewicht zugunsten der Oxidantien führt zu oxidativem Stress, verminderter NO-Bioverfügbarkeit und begünstigt endotheliale Dysfunktion sowie kardiovaskuläre Erkrankungen, während ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien (Redoxhomöostase) die Gefäßfunktion erhält. Neben enzymatischen Schutzsystemen tragen auch nicht-enzymatische Antioxidantien wie Vitamin C und Vitamin E zur Neutralisation von ROS und zur Stabilisierung der endothelialen Redoxbalance bei. Eigene Darstellung, erstellt in PowerPoint.*

Im Jahr 1956 wurde erstmals beschrieben, dass ROS als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette entstehen und in 1998 wurde dokumentiert, dass sie nicht ausschließlich als toxische Stoffwechselprodukte betrachtet werden sollten (Chance & Williams, 1956; Finkel, 1998). Tatsächlich übernehmen ROS in niedrigen Konzentrationen wichtige Signalfunktionen und sind unter anderem an der Regulation der vaskulären Homöostase beteiligt (Widlansky & Guterman, 2011).

Im Endothel entstehen ROS primär über mitochondriale Prozesse sowie durch spezifische Enzymsysteme. Hierzu zählen insbesondere die Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat (NADPH) Oxidasen (NOX) (Brandes & Schröder, 2008). Von den sieben bekannten Isoformen der NADPH-Oxidasen werden im Endothel vor allem NOX4 und NOX2 exprimiert (Van Buul et al., 2005).

Eine weitere Quelle für ROS im Endothel sind die Xanthinoxidoreduktase-Enzyme, insbesondere in ihrer oxidativen Form als Xanthinoxidase. Diese Enzyme katalysieren die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure unter Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$ . Studien zeigen, dass Xanthinoxidasen zur endothelialen und kardialen Dysfunktion nach Reperfusion beitragen (Brown et al., 1988), was einen therapeutischen Ansatzpunkt für die Reduktion von oxidativem Stress darstellt (Berry & Hare, 2004).

Ein zusätzlicher Faktor, der nach Induktion der endothelialen Dysfunktion die Menge an ROS im Endothel erhöht, ist die sogenannte Entkopplung der eNOS. Hierbei produziert die eNOS vermehrt  $O_2^{\cdot-}$  anstatt NO (Janaszak-Jasiecka et al., 2023), da unter anderem die intrazelluläre Konzentration von Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) durch den anhaltenden oxidativen Stress zu gering ist, um als Co-Faktor zu wirken (Kuzkaya et al., 2003; Vásquez-Vivar et al., 1998). Zudem bedingt dauerhafter oxidativer Stress die Hochregulation von Arginasen, sodass die Menge an Arginin ebenfalls zu gering ist (Chen et al., 2010).

Für die Aufrechterhaltung der endothelialen Funktion ist daher das Gleichgewicht zwischen ROS-Bildung und deren Neutralisation durch antioxidative Systeme essenziell. Eine gestörte Balance führt zu endothelialer Dysfunktion (Incalza et al., 2018). Entsprechend sind funktionierende antioxidative Systeme im Endothel von grundlegender Bedeutung, um sowohl schädliche Effekte durch oxidativen Stress abzuwehren als auch physiologische Zellfunktionen aufrechtzuerhalten.

Das komplexe Netzwerk der antioxidativen Systeme setzt sich aus einer Vielzahl enzymatischer sowie nicht-enzymatischer Komponenten zusammen. Nicht-enzymatische Antioxidantien, wie Vitamin C und Vitamin E schützen Endothelzellen, indem sie ROS direkt abfangen (Birben et al., 2012). Hauptquellen dieser antioxidativ wirksamen Substanzen sind natürliche, gesunde Lebensmittel und werden durch eine ausgewogene Ernährung in den Körper aufgenommen (Carlsen et al., 2010; Flag et al., 1994).

Zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien im Endothel gehören unter anderem die Superoxid-Dismutase (SOD), die Katalase sowie die Thioredoxin-Systeme und die Glutathion-Systeme.

SOD katalysieren die Umwandlung von Superoxidradikalen in  $H_2O_2$  und molekularen Sauerstoff. SOD wirken in unterschiedlichen Zellkompartimenten durch drei Isoformen: die extrazelluläre ecSOD (SOD3), die zytosolische Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (SOD1) und die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD/SOD2), wodurch eine effektive Entgiftung von Superoxidradikalen in verschiedenen Bereichen gewährleistet wird (Faraci & Didion, 2004). Das gebildete  $H_2O_2$  wird anschließend entweder durch die Katalase oder durch das Glutathion-Redoxsystem zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. Die Glutathion-Peroxidase (GPx) reduziert  $H_2O_2$  zu Wasser, wobei Glutathion zu Glutathion Disulfid oxidiert wird. Der Glutathion-Redoxzyklus ist wichtig, um Lungen-Endothelzellen vor schädlichen Stoffen zu schützen, die durch oxidativen Stress entstehen. Wenn dieser Schutzmechanismus gestört ist, werden die Zellen deutlich anfälliger für Schäden durch  $H_2O_2$  (Suttorp et al., 1986).

Das Thioredoxin-System besteht aus den Isoenzymen Thioredoxin-Reduktase 1 (TrxR1) und Thioredoxin-Reduktase 2 (TrxR2), die jeweils die entsprechenden Thioredoxine-1 bzw. -2 reduzieren und NADPH als Elektronendonator nutzen (Holmgren, 2000; Lu & Holmgren, 2014). TrxR1 ist überwiegend zytosolisch lokalisiert und reduziert oxidiertes Thioredoxin-1 (Trx-1) zurück in seine aktive, reduzierte Form, wodurch das zelluläre Trx-1-System zentral zur Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase im Zytosol und Nukleus beiträgt (Yamawaki et al., 2003). Mehrere Studien zeigen, dass Trx-1 in den Zellkern translozieren kann und dort die DNA-Bindung und damit Aktivität redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B), p53 oder Aktivator Protein-1 (AP-1) über den Redoxfaktor 1 (Ref-1) fördert (Haendeler, Tischler, et al., 2004). Trx-1 inhibiert die Apoptose-Signal regulierende Kinase 1 (ASK1) durch Förderung ihrer Ubiquitinierung und Degradation und hemmt damit ASK1-vermittelte Apoptose. Auf diese Weise moduliert Trx-1 auch Apoptose- und entzündungsrelevante Signalwege im Endothel (Altschmied & Haendeler, 2009; Liu & Min, 2002). TrxR2 hingegen ist ein mitochondriales Enzym, das Thioredoxin-2 (Trx-2) unter Verbrauch von NADPH reduziert, was essenziell für den Schutz der mitochondrialen Atmungskette vor ROS-bedingten Schäden ist (Kameritsch et al., 2021).

Diese Systeme des antioxidativen Abwehrsystems des Endothels werden u.a. durch den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) reguliert, der als zentraler Schalter für die zelluläre Stressantwort fungiert (Lukosz et al., 2010). Unter homöostatischen Bedingungen wird Nrf2 im Zytoplasma durch das Kelch-like ECH-assoziierte Protein 1 (Keap1) in einem Cullin-3(Cul3)-basierten E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex gehalten, polyubiquitiniert und unterliegt dadurch einem kontinuierlichen proteasomalen Abbau, sodass seine nukleäre Translokation verhindert wird (Abbildung 3) (Baird & Yamamoto, 2020; Tonelli et al., 2018).

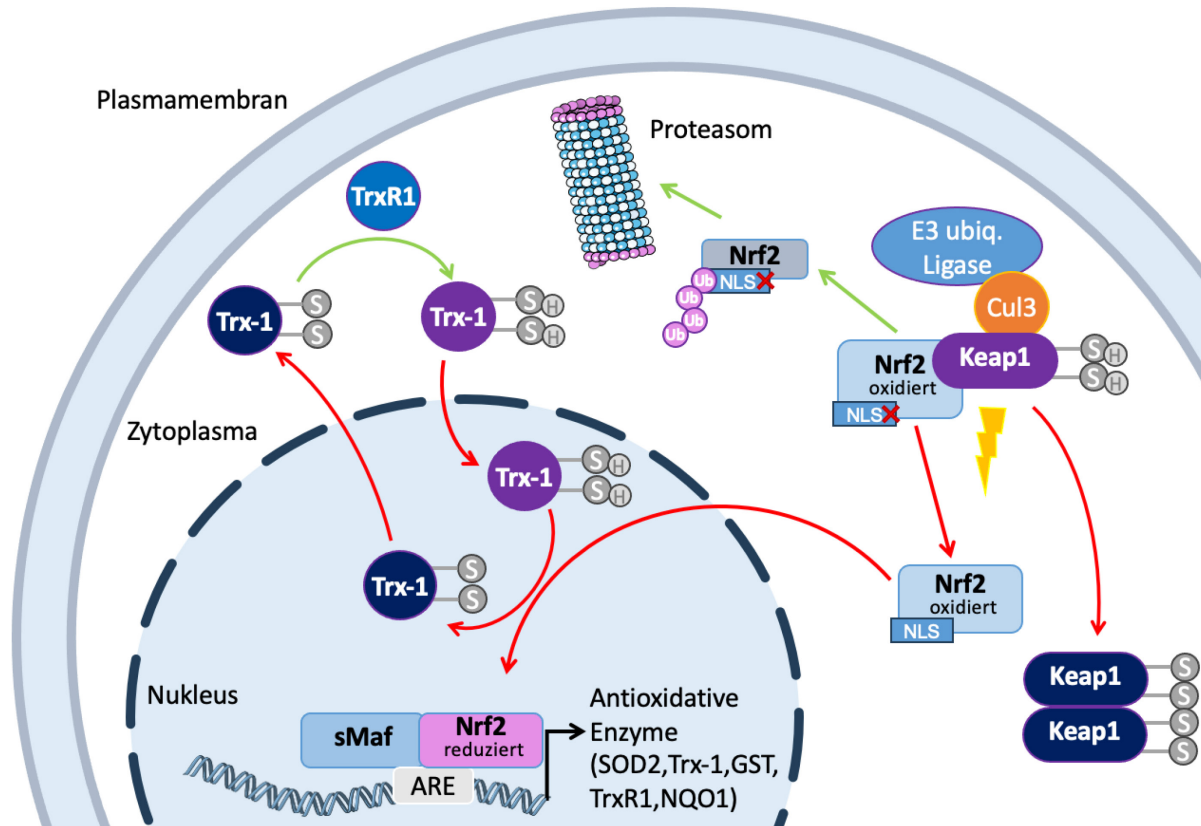


Abbildung 3: **Der Nrf2-Signalweg.** Schematische Darstellung der Redoxregulation von Nrf2 durch das Keap1-Cul3-System und das Thioredoxin-1/Thioredoxinreduktase-1-System (Trx-1/TrxR1) im Endothel. Unter physiologischen Bedingungen (grüne Pfeile) wird Nrf2 im Zytoplasma durch Keap1 als Teil eines Cul3-basierten E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt, sodass die nuclear localisation signal (NLS)-vermittelte nukleäre Translokation unterdrückt ist. Unter oxidativem bzw. elektrophilem Stress (rote Pfeile) werden reaktive Cysteinreste in Keap1 modifiziert, was zur Inaktivierung des Keap1-Cul3-Komplexes, zur Stabilisierung von Nrf2 und zu dessen Import in den Zellkern führt. Im Nucleus wird oxidiertes Nrf2 durch Trx-1 reduziert und kann nach Heterodimerisierung mit einem kleinen Maf-Protein (sMaf) an die Antioxidant response elements (AREs) binden und die Transkription zahlreicher Zielgene des antioxidativen Abwehrsystems, darunter SOD2, Trx-1, TrxR1, GST und NQO1, aktivieren. Eigene Darstellung, erstellt in PowerPoint.

Durch oxidativen oder elektrophilen Stress werden spezifische Cysteinreste in Keap1 modifiziert. Diese Modifikationen begünstigen die Bildung von intermolekularen Keap1-Dimeren (Baird & Yamamoto, 2020). Dadurch wird der Abbau von Nrf2 unterbunden und das freigelegte Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) in Nrf2 bedingt seinen nukleären Import. Im Kern wird dann noch oxidiertes Nrf2 durch das nukleäre Trx-1-System reduziert, um an *antioxidant response elements* (AREs) in den Promotorregionen seiner Zielgene binden zu können und nach Heterodimerisierung mit einem der kleinen Maf Proteine (*small musculoaponeurotic fibrosarcoma protein*, sMaf) Transkription von Zielgenen zu aktivieren. Die durch Nrf2-induzierten Gene umfassen zahlreiche antioxidative Enzyme und Phase-II-Detoxifikationsproteine, darunter SOD2, Komponenten des Thioredoxin-Systems wie Trx-1 und TrxR1, Glutathion-S-Transferase (GST) sowie NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1) (Baird & Yamamoto, 2020; Dodson et al., 2019; Ma, 2013).

Aktuelle Forschungsergebnisse belegen, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 maßgeblich an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt ist. Hierzu zählen unter anderem der Energiestoffwechsel, die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, Autophagie, die Modulation inflammatorischer Prozesse sowie die Regulation immunologischer Antworten (He et al., 2020; Kim & Jeon, 2022; Zhang, 2025).

Die Endothelzell-spezifische Aktivierung von Nrf2 durch Knockdown von Keap1 reduziert die Entstehung von Atherosklerose bei genetisch veränderten Mäusen mit ausgeschaltetem Apolipoprotein E-Gen (*ApoE<sup>-/-</sup>*), indem sie die Entzündung, die auf die Endothelzelle (EZ) wirkt, und die Lipidperoxidation unterdrückt (He et al., 2024). Ähnlich stärkt der Adhäsions-G-Protein-gekoppelte Rezeptor Latrophilin-2 (ADGRL2/LPHN2) das antioxidative Abwehrsystem im Endothel, indem er die Nrf2-Aktivität erhöht und so den Zellschutz vor oxidativem Stress verbessert. Bislang existieren jedoch keine spezifischen pharmakologischen Aktivatoren für LPHN2, weshalb weitere Forschung zu seiner therapeutischen Nutzung notwendig ist (Jakobs et al., 2024).

Obwohl die Aktivierung des Nrf2-Signalwegs viele positive Effekte für den Zellschutz mit sich bringt, birgt eine dauerhafte oder unkontrollierte Aktivierung potenzielle Risiken. Eine konstitutive Überstimulation von Nrf2 kann dazu führen, dass Zellen auf Stresssignale weniger empfindlich reagieren. Dies kann nicht nur die normale Stressantwort beeinträchtigen, sondern auch zu einer gestörten Immunantwort beitragen und die Entstehung und das Wachstum von Tumoren fördern (Rojo de la Vega et al., 2018). Eine gestörte Regulation des Nrf2-Signalwegs, insbesondere eine verminderte Aktivität in kardiometabolischen Erkrankungen sowie eine konstitutive Überaktivierung in verschiedenen Tumorentitäten, wird mit der Entstehung und dem Fortschreiten chronisch-entzündlicher, metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Jakobs et al., 2017; Taguchi & Yamamoto, 2017). Deshalb ist eine ausgewogene Regulation entscheidend.

Der Zusammenhang zwischen gestörter antioxidativer Funktion und vaskulärer Gesundheit zeigt sich deutlich bei chronischem oxidativem Stress, wie er beispielsweise im klinischen Bereich bei schweren COVID-19-Verläufen beobachtet wird (Fodor et al., 2021). In EZ führt Serum schwer erkrankter COVID-19-Patienten zu verminderter Nrf2-Aktivität mit reduzierter nukleärer Akkumulation und Herunterregulation von Nrf2-Zielgenen, sowie zu mitochondrialer Dysfunktion (Hamad et al., 2023; Rodrigues et al., 2023).

Die Bedeutung antioxidativer Systeme für die Gefäßgesundheit zeigt sich besonders im Zusammenhang mit der zellulären Alterung. Dauerhafter oxidativer Stress, wie er zum Beispiel durch eine anhaltende niedrig dosierte Endotoxämie bei kontinuierlicher Lipopolysaccharid-Exposition entsteht, führt dazu, dass zentrale antioxidative Schutzmechanismen zunehmend erschöpft werden (Merk et al., 2024). Besonders betroffen sind Trx-1 und Nrf2 (Altschmied & Haendeler, 2009; Ungvari et al., 2019). Mit zunehmendem Alter nimmt die Produktion von ROS zu, während die antioxidativen Systeme vermindert aktiv sind. Dadurch dominiert oxidativer Stress intrazellulär und es entsteht eine endotheliale Dysfunktion, die eine Hauptursache vaskulärer Erkrankungen darstellt (Czypiorski et al., 2013).

Eine langfristig gestörte Redoxhomöostase begünstigt die Induktion zellulärer Seneszenz, was nun im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird.

## 1.4 Endothelzellseneszenz

Steigende Redoxbelastung in Kombination mit einer verminderten antioxidativen Abwehr begünstigt die zelluläre Seneszenz, welche ein entscheidender Mechanismus bei der Entstehung vaskulärer Alterungsprozesse darstellt (Goy et al., 2014). Zelluläre Seneszenz ist ein zellulärer Stressreaktionsmechanismus, der durch einen irreversiblen Zellzyklusarrest gekennzeichnet ist und als Antwort auf verschiedene intrinsische und extrinsische Stressoren ausgelöst wird. Zu diesen Stressoren zählen unter anderem DNA-Schäden, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion, chronische Entzündungen oder Telomerverkürzung (Huang et al., 2022). Der Mechanismus der Seneszenz dient unter anderem zum Schutz vor unkontrollierter Zellteilung und Krebsentstehung, trägt jedoch gleichzeitig zur Funktionseinschränkung von Geweben und Organen im Alter bei.

Es wird zwischen replikativer Seneszenz – in hoch-proliferativen Geweben - und Stress-induzierter Seneszenz – in kaum oder nicht-proliferierenden Geweben - unterschieden.

Die replikative Seneszenz wurde zuerst in den 1960er Jahren von Leonard Hayflick und Paul Moorhead beobachtet. Darunter versteht man die Eigenschaft humaner diploider Zellen, welche sich *in vitro* bis zu einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen vermehren, bevor ein dauerhafter Zellzyklusarrest einsetzt (Hayflick, 1965; Hayflick & Moorhead, 1961). Diese Beobachtung wurde später durch die Entdeckung der Telomerverkürzung erklärt, die bei jeder Zellteilung auftritt und letztlich zum Zellzyklusstopp führt (Harley et al., 1990).

Die Stress-induzierte Seneszenz ist seit ungefähr zwei Jahrzehnten in der wissenschaftlichen Forschung etabliert und gilt als eigenständiger, Telomerverkürzungs-unabhängiger, zellulärer Prozess, der durch verschiedene Stressfaktoren ausgelöst wird (Herbig et al., 2006; Toussaint et al., 2000). Die Stress-induzierte Seneszenz tritt, im Gegensatz zur replikativen Seneszenz, vermehrt in nicht-proliferativen Geweben, wie den Endothelzellen, auf. In Bezug auf Endothelzellen sind diese durch eine Vielzahl extrinsischer Faktoren im Blut oft oxidativem Stress ausgesetzt (Farhat et al., 2008).

In primären humanen Endothelzellen lässt sich durch eine zweiwöchige, wiederholte Exposition mit niedrigen  $H_2O_2$ -Konzentrationen ein seneszenten Phänotyp hervorrufen. Dies ist eines von mehreren Zellkulturmodellen für Stress-induzierte Seneszenz in primären Endothelzellen (Haendeler, Hoffmann, et al., 2004). Neben der direkten Stress-induzierten Seneszenz durch die Behandlung mit  $H_2O_2$ , führt auch eine stetige Exposition gegenüber geringen Dosen von Endotoxinen, wie Lipopolysaccharide (LPS), zu oxidativem Stress in Endothelzellen. Beides maßgebliche Faktoren bei der Entstehung von zellulärer Seneszenz (Merk et al., 2023).

Seneszenten Endothelzellen zeichnen sich durch die Ausbildung eines sogenannten „*senescence-associated secretory phenotype*“ (SASP) aus. Diese Veränderung im Sekretionsprofil führt zu einer entzündlichen Mikroumgebung durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, welche wiederum umliegende Endothelzellen ebenso zur Seneszenz Induktion stimulieren können (Gorgoulis et al., 2019; Wiley & Campisi, 2021). Die Akkumulation seneszenten Endothelzellen beeinträchtigt die

Gefäßfunktion und begünstigt die Progression altersassoziierter Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Bloom et al., 2023).

Die zentralen Signalwege der Seneszenz umfasst den p53/p21 und p16<sup>INK4a</sup>/ Retinoblastom (Rb) die somit auch als Seneszenzmarker verwendet werden können (Chen et al., 2006). Die Stabilisierung und Aktivierung von p53 induziert die Transkription des Zellzyklusinhibitors p21, welcher die Aktivität cyclinabhängiger Kinasen (CDK) hemmt. Dies führt zu einer hypophosphorylierten, aktiven Form des Rb-Proteins, welches die Transkription E2F-abhängiger Gene blockiert und somit einen stabilen G1-Zellzyklusarrest vermittelt (Lin et al., 2000; Mijit et al., 2020). Parallel dazu spielt der p16<sup>INK4a</sup>/Rb-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des seneszenten Zustands, insbesondere bei Stress-induzierter Seneszenz. p16<sup>INK4a</sup> wirkt als spezifischer Inhibitor von CDK4 und CDK6, und verhindert zudem die Phosphorylierung von Rb, wodurch die Progression des Zellzyklus weiter gehemmt wird (Sherr et al., 2016). Charakteristisch für seneszente Endothelzellen sind neben dem Anstieg des p21-Proteins im Zellkern auch eine erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten Beta-Galaktosidase (SA-β-Gal) und eine reduzierte Produktion von NO, dessen Synthese durch die reduzierte Expression der eNOS beeinträchtigt wird (Förstermann & Münzel, 2006; Han & Kim, 2023; Muller-Delp et al., 2012).

Der klassische Phänotyp seneszenter Endothelzellen weist eine vergrößerte und abgeflachte Morphologie auf (Rosen et al., 1981). Diese physiologischen Veränderungen führen zu einer erhöhten Gefäßsteifigkeit aufgrund der verminderten Elastizität und bewirken verstärkte vaskuläre Entzündungsreaktionen. Dies beeinträchtigt sowohl die Angiogenese als auch die Regulation der Gefäßspannung (Wang & Bennett, 2012). Solche Veränderungen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung altersbedingter Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck (Bloom et al., 2023; Minamino & Komuro, 2007).

Ein bedeutender Ursprung der erhöhten ROS in seneszenten Zellen liegt in mitochondrialen Dysfunktionen, die sich durch strukturelle Veränderungen, eine verminderte Effizienz der mitochondrialen Atmungskette, sowie verringertes mitochondriales Membranpotenzial auszeichnen (Jendrach et al., 2005). Mit zunehmendem Alter akkumulieren intrazelluläre ROS, welches zur Schädigung der DNA und der Mitochondrien beiträgt. Die durch diese Dysfunktion vermehrt produzierten mtROS in Kombination mit der Schädigung der DNA, lösen eine DNA-assoziierte Schadensantwort aus (Moiseeva et al., 2009). Dies führt zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und zur Hochregulation von p21, um die Zelle für mögliche Reparatur der DNA im Zellzyklus Arrest zu arretieren. Zugleich aktiviert der durch die mitochondriale Dysfunktion induzierte ATP-Mangel die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK). Zusammen wird dadurch u.a. auch der proinflammatorische SASP verstärkt (Wiley et al., 2016; Ziegler et al., 2015). Zudem kommt es zu einem sogenannten „vicious cycle“, da Schädigung der Mitochondrien zu weiterer ROS Produktion führt und weitere ROS Produktion die mitochondriale Dysfunktion verstärkt (Fukui & Moraes, 2008).

Im oxidativen Stress-induzierten Seneszenzmodell primärer humaner Endothelzellen wurde gezeigt, dass seneszente Zellen reduzierte Spiegel des antioxidativen Enzyms Trx-1 sowie eine erhöhte Expression der ROS-produzierenden NOX4 aufweisen (Goy et al., 2014). Eine Herunterregulation von NOX4 verzögerte die Induktion von Seneszenz (Lener et al., 2009). Die dauerhafte Expression von Trx-

1 kann das Auftreten der Seneszenz signifikant inhibieren, was die zentrale Rolle der Redoxhomöostase in diesem Prozess unterstreicht. Diese Daten werden untermauert durch Befunde *in vivo*, in einem Mausmodell mit endothel-spezifischer NOX4-Überexpression korrelieren die Trx-1-Proteinspiegel negativ mit der NOX4-Expression (Goy et al., 2014).

Die Induktion zellulärer Seneszenz steht folglich in engem Zusammenhang mit einer gestörten Redoxhomöostase, deren Aufrechterhaltung maßgeblich durch antioxidative Mechanismen reguliert wird, zu denen auch der Transkriptionsfaktor Nrf2 zählt. Die Nrf2 Aktivierung verhindert die Induktion zellulärer Seneszenz. Im Gegensatz dazu erhöht die genetische Deletion von Nrf2 die Seneszenz in Hirnarterien (Fulop et al., 2018). Studien, unter anderem an Primaten, zeigten dass eine verminderte Nrf2-vermittelte antioxidative Antwort und damit die Reduktion der mitochondrialen SOD2 zu chronischem oxidativem Stress führt und zur Induktion von Endothezellseneszenz (Hwang et al., 2022).

Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Stress-induzierten Seneszenz zugrunde liegen, könnte wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung therapeutischer Strategien liefern, die darauf abzielen, altersbedingte Pathologien zu verbessern. Insbesondere Pflanzeninhaltsstoffe wie Curcumin und Koffein werden zunehmend untersucht, da sie antioxidative und entzündungshemmende Eigenschaften besitzen, die die Induktion der Seneszenz hinauszögern oder sogar verhindern und damit die Endothelfunktion länger aufrechterhalten könnten (Cox et al., 2022; Merk et al., 2024).

## 1.5 Pflanzeninhaltsstoffe

Pflanzeninhaltsstoffe gewinnen in der Herz-Kreislauf-Forschung zunehmend an Bedeutung, da sie ein vielversprechendes Potenzial zur Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen aufweisen. Insbesondere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide, Polyphenole (z.B. Curcumin), Alkaloide (z.B. Koffein) und Saponine zeigen in zahlreichen Studien vielfältige kardioprotektive Wirkungen (Adriouch et al., 2018; Cox et al., 2022; Gunter et al., 2017; Micek et al., 2021; Singh & Chaudhuri, 2018). Die vielfältigen kardioprotektiven Effekte dieser Pflanzeninhaltsstoffe umfassen unter anderem antioxidative und entzündungshemmende Effekte, eine Verbesserung der endothelialen Funktion sowie eine Regulation des Blutdrucks (Alotaibi et al., 2021). In der Arbeitsgruppe wird schon seit längerem an Curcumin und Koffein gearbeitet. Denn von Curcumin sind vielfältige bioaktive Eigenschaften beschrieben (Cox et al., 2022), jedoch sind die Auswirkungen auf das Endothel widersprüchlich. Dies wird im Weiteren Verlauf nun beschrieben. Zudem wird Koffein als weltweit am häufigsten konsumierte Substanz beschrieben, für die die Arbeitsgruppe einen neuen Wirkmechanismus gefunden hat (Ale-Agha et al., 2018).

### 1.5.1 Curcumin

Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dione, Diferuloylmethan) ist ein Polyphenol aus der Pflanze *Curcuma longa* (Kurkuma), die zu den Ingwergewächsen (*Zingiberaceae*) gehört. Von den drei Curcuminoiden Curcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin die in Kurkuma vorhanden sind, ist Curcumin die aktivste Komponente (Sharma et al., 2005). Seit über 4000 Jahren wird Curcumin als Heilmittel in der asiatischen Medizin verwendet und wurde von Vogel und Pelletier 1815 erstmals als „gelbes Färbemittel“ beschrieben (Vogel & Pelletier, 1815). Heutzutage ist es von der *World Health Organization* (WHO) und der *Food and Drug*

*Administration* (FDA) als Farbstoff (E100) und Lebensmittelzusatzstoff zugelassen und hat durch sein breites Wirkungsspektrum als „goldenes Gewürz“ zunehmend an Bekanntheit gewonnen (Li et al., 2020).

Curcumin gilt als Paradebeispiel für einen Pflanzeninhaltsstoff mit breitem kardioprotektivem Wirkungsspektrum. In zahlreichen Studien wurden seine antioxidativen, antiinflammatorischen, antikarzinogenen, antimikrobiellen, neuro- und kardioprotektiven Eigenschaften untersucht. Diese pleiotropen Auswirkungen sind darauf zurückzuführen, dass Curcumin über kovalente sowie nicht-kovalente Wechselwirkungen, darunter hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen, direkt oder indirekt mit verschiedenen zellulären Signalproteinen sowie mit DNA und RNA interagieren kann (Gupta et al., 2011). Neben der Beeinflussung zellulärer Signalwege kann Curcumin aufgrund seiner Hydroxylgruppen auch direkt freie Radikale neutralisieren und die Zelle so vor oxidativen Schäden schützen (Priyadarsini et al., 2003).

Zahlreiche klinische Studien zeigen, dass Curcumin sich positiv auf das Lipidprofil von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren auswirkt. In einer systematischen Übersicht fassten Rafiee et al. zusammen, dass Curcumin insbesondere zur Senkung von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyceriden beiträgt, während HDL-Cholesterin häufig unverändert bleibt (Rafiee et al., 2021). Alle diese Parameter (exkl. HDL-Cholesterin) sind mit einem gesteigerten Risiko für atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbunden (Wadström et al., 2023).

Bei vaskulärer Dysfunktion, einem frühen Schritt in der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Kapitel 1.1), ist die Fähigkeit des Endothels zur Produktion von NO vermindert, was zur Gefäßsteifigkeit und erhöhtem Blutdruck führen kann. In einer randomisierten, placebokontrollierten Studie verbesserte die tägliche Curcumin-Supplementierung (2000 mg/Tag) die vaskuläre Endothelfunktion bei gesunden Erwachsenen mittleren und höheren Alters, indem es durch die Aktivierung der eNOS die Bioverfügbarkeit von NO erhöhte und oxidativen Stress reduzierte, was zu einer verbesserten Gefäßrelaxation und Senkung des Blutdrucks führte (Santos-Parker et al., 2017). Mehrere Metaanalysen von randomisierten klinischen Studien bestätigen die signifikante Wirkung von Curcumin auf die Verbesserung des endothelialen Funktionsparameters *flow mediated dilation* (FMD) (Changal et al., 2020), sowie eine Reduktion von Entzündungsparametern, wie C-reaktives Protein (CRP), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) (Dehzad et al., 2023). Epidemiologische Daten aus einer über zwölf Jahre verfolgten asiatischen Kohortenstudie deuten auf Zusammenhänge zwischen einem hohen Curry- bzw. Curcumin-Konsum und einer niedrigeren kardiovaskulären Mortalität sowie einer höheren Lebenserwartung hin (Ng et al., 2024).

Tierexperimentelle Studien ergänzen die klinischen Befunde und zeigen, dass Curcumin in verschiedenen Maus- und Rattenmodellen kardioprotektive Effekte ausübt, darunter die Verbesserung der vaskulären Funktion, Reduktion des oxidativen Stresses und Modulation entzündlicher Signalwege (Cox et al., 2022). So konnte in einer Studie von Pu et al. gezeigt werden, dass die 4-wöchige orale Verabreichung von 0,2 % Curcumin im Futter altersbedingte zerebrovaskuläre Dysfunktionen bei Sprague Dawley Ratten über den AMPK/*Uncoupling Protein 2* (UCP2)-Signalweg verbessert (Pu et al., 2013). In einer weiteren Studie erhielten alte C57BL/6-Mäuse über 4 Wochen Curcumin in gleicher Konzentration in der Ernährung. Dadurch sank die arterielle Pulswellengeschwindigkeit (*aortic pulse*

*wave velocity*, aPWV), ein Maß für die Steifigkeit großer Arterien. Zudem reduzierte Curcumin den oxidativen Stress in alten Mäusen und normalisierte die NO-abhängige Endothelfunktion auf Werte, die denen junger Kontrolltiere ähnelten (Fleenor et al., 2013). Bei isolierten Herzen von mit Curcumin behandelten Ratten und Mäusen, die *ex vivo* einer I/R-Schädigung ausgesetzt wurden, konnte eine Verringerung der Infarktgröße beobachtet werden (Duan et al., 2012; Liu et al., 2017).

Weitere Wirkungen von Curcumin wurden in Primärzellen des Herz-Kreislauf-Systems und in primären EZ *ex vivo* untersucht. Curcumin reduzierte in einem ApoE-defizienten Mausmodell für Atherosklerose die Makrophageninfiltration, was wahrscheinlich auf eine Herunterregulierung der Adhäsionsmoleküle auf EZ zurückzuführen ist. Dies wurde dadurch belegt, dass Curcumin auch die Monozytenadhäsion an EZ *ex vivo* hemmte (Coban et al., 2012). Zudem hemmte Curcumin die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in EZ, wodurch die Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) reduziert wird. Dies führt zu einer Abschwächung von Entzündungsprozessen, zum Beispiel bei durch Rauchen verursachten Gefäßschäden (Lee et al., 2020). Die Hemmung erfolgt unter anderem durch Unterdrückung des Transkriptionsfaktors NF-κB, der für Entzündungsreaktionen maßgeblich ist (Kim et al., 2007). Dies ist auch in einer Studie von Karimian et al. gezeigt worden. Curcumin verminderte die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Monozytenbindung, was zu einer Stabilisierung der Endothelbarriere und somit zur Verringerung entzündlicher Reaktionen beitrug (Karimian et al., 2017).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch Curcumin aktiviert wird, ist Nrf2 (Ashrafizadeh et al., 2020; Brinkmann et al., 2022). Dieser ist für die Regulation des antioxidativen Abwehrsystems des Endothels essenziell (Kapitel 1.3), sodass eine Aktivierung von Nrf2 und damit verbundene Hochregulation von SOD2 durch Curcumin als ein therapeutisches Ziel zur Reduktion oxidativen Stresses fungieren kann.

Eine weitere *ex vivo* Studie belegt, dass eine 24-stündige Vorbehandlung mit 25 µM Curcumin in EZ die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte vorzeitige Seneszenz abschwächt. Dies wurde anhand von reduzierter Aktivität des Enzyms SA-β-Gal und reduzierter Expression des Seneszenzmarkers p21 gezeigt. Zudem fördert diese verwendete Curcuminbehandlung die Zellteilung und die Aktivität von Sirtuin-1, einem Enzym, das für seine Rolle bei der Verlängerung der Lebensdauer, Reparatur von DNA-Schäden und Stressresistenz bekannt ist (Sun et al., 2015). Auch die Aktivierung von AMPK kann durch Curcumin in EZ induziert werden, womit eine Reduktion oxidativen Stresses und eine Förderung der Autophagie assoziiert ist (Zhao et al., 2021).

Bis zu mehrere hundert Milligramm Curcumin täglich werden in klinischen Studien verwendet, ohne dabei signifikante Toxizität zu verursachen (Lao et al., 2006). Dies basiert zum einen auf der geringen Bioverfügbarkeit, da Curcumin lipophile und hydrophobe Eigenschaft hat. Es kann nach Aufnahme in den Körper nur schlecht im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden und gelangt in stark verminderter Konzentration in den Blutkreislauf. Die Aufnahme von Curcumin in sehr hohen Dosen wie 8 g pro Tag erreicht im menschlichen Serum nur maximal etwa 2 µM und es erfolgte keine Anreicherung im Körper (Cheng et al., 2001). In Tiermodellen, zum Beispiel bei Ratten, zeigt sich eine ähnlich eingeschränkte Aufnahme von Curcumin wie beim Menschen (Ireson et al., 2001). Selbst bei hohen oralen Dosierungen von bis zu 2 g pro Kilogramm Körpergewicht gelangen nur sehr geringe Mengen in den Blutkreislauf. Interessanterweise kann die Bioverfügbarkeit durch Zugabe von Substanzen wie Piperin deutlich gesteigert werden, teilweise um das 20-Fache (Shoba et al., 1998). Die *ex vivo* und *in vivo* verwendeten

Konzentrationen von Curcumin variieren stark, liegen jedoch häufig im Bereich von 1 bis 20  $\mu\text{M}$  in Zellkultur-Studien, jedoch zeigen verschiedene Studien mit der gleichen verwendeten Curcuminkonzentration widersprüchliche Ergebnisse. In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die höchste nicht-toxische Dosis von Curcumin auf primäre EZ mit 7,5  $\mu\text{M}$  für 20 Stunden definiert (Brinkmann et al., 2022).

Die geringe Bioverfügbarkeit ist einer der Hauptgründe, warum neue Formulierungen (z. B. mit Piperin, Liposomen oder Nanopartikeln) entwickelt werden, um die Aufnahme und Wirksamkeit im Organismus zu verbessern (Prasad et al., 2014). Daher müssen weitere experimentelle Studien durchgeführt werden, um Aussagen über die Effekte von Curcumin in Seneszenz und kardiovaskulären Erkrankungen machen zu können.

## 1.5.2 Koffein

Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin) ist ein Alkaloid, das von Natur aus in vielen Früchten, Blättern oder Samen verschiedener Pflanzen vorkommt, darunter in der Teepflanze (*Camellia sinensis*), dem Kaffeestrauch (*Coffea spec.*) und der Kolanuss (*Cola nitida*). Koffein kommt in der Forschung in Form eines weißen, geruchlosen, kristallinen Pulvers mit bitterem Geschmack vor, das eine gute Wasserlöslichkeit und Hitzestabilität aufweist (Faudone et al., 2021). Es fungiert seit Jahrzehnten als zentraler Wirkstoff in verschiedenen Getränken und zählt zu den am häufigsten konsumierten Substanzen weltweit (Fisone et al., 2004). 1820 wurde Koffein erstmals von dem deutschen Chemiker Friedlieb Ferdinand Runge isoliert und 1895 von Fischer und Kollegen erstmals synthetisiert (Fischer & Ach, 1895; Runge, 1821).

Mehrere Kohortenstudien zeigen, dass ein regelmäßiger Kaffeekonsum mit einer verminderten Gesamtmortalität sowie einer reduzierten ursachenspezifischen Mortalität, beispielsweise aufgrund von Herzerkrankungen oder Schlaganfällen assoziiert ist. Dies wurde sowohl in sehr großen Allgemeinpopulationen mit 400.000 Teilnehmern, wie der *National Institutes of Health–AARP Diet and Health* (NIH–AARP) Studie (Freedman et al., 2012), als auch in multinationalen europäischen Stichproben der *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) Studie mit mehr als 500.000 Teilnehmern beobachtet (Gunter et al., 2017). Auch Untersuchungen älterer Bevölkerungsgruppen, darunter Analysen auf Basis der *NHANES I- Epidemiologic Follow-Up* Studie (Greenberg et al., 2007) und der *Framingham Heart* Studie (Greenberg et al., 2008), berichten vergleichbare Zusammenhänge für kardiovaskuläre Mortalität. Insgesamt deutet die Evidenzlage darauf hin, dass moderater Kaffeekonsum, von zwei bis vier Tassen Kaffee pro Tag (Kim et al., 2019), potenziell protektive Effekte auf die langfristige Gesundheit haben könnte, wenngleich die zugrunde liegenden Mechanismen weiterhin nicht abschließend geklärt sind.

Unsere Arbeitsgruppe hat 2008 festgestellt, dass nach einem Kaffeekonsum von vier Tassen Kaffee eine Serumkonzentration an Koffein von ungefähr 30  $\mu\text{M}$  erreicht wird (Spyridopoulos et al., 2008). Bei Plasmakonzentrationen um 67  $\mu\text{M}$  Koffein wird im Menschen eine etwa halbmaximale Belegung zerebraler  $A_1$ -Adenosinrezeptoren erreicht, die als funktionell relevante Antagonisierung dieses Systems gilt (Elmenhorst et al., 2012). Dieser Wirkungsmechanismus im zentralen Nervensystem wird mit einer Steigerung der Wachheit sowie Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit verbunden

(Kløve & Petersen, 2025). Die Forschungsergebnisse bezüglich der Auswirkungen der Aktivierung oder Hemmung von Adenosinrezeptoren im Herz-Kreislauf-System sind bislang uneinheitlich. So wird berichtet, dass die Stimulation des A<sub>2</sub>A-Adenosinrezeptors positive Effekte auf das Herzmuskelgewebe nach einem Infarkt bei Schweinen zeigt (Lasley et al., 2001), während die Blockade desselben Rezeptors mit einer verminderten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie einer geringeren Expression von NOX2 im Herzgewebe einhergeht (Ribé et al., 2008). Weitere Effekte von Koffein werden über die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration oder Hemmung von Phosphodiesterasen beschrieben (Fisone et al., 2004). Allerdings basieren viele dieser Befunde auf experimentellen Koffeinkonzentrationen im Bereich von 250–500 µM (Daly, 2007; Smellie et al., 1979), die deutlich über physiologisch erreichbaren Spiegeln und sogar nahe an der humanen toxischen bzw. letalen Dosis liegen (Ale-Agha et al., 2018; Banerjee et al., 2014).

Demgegenüber identifizierte unsere Arbeitsgruppe 2018 einen Wirkmechanismus von Koffein im Endothel bei physiologisch relevanten Konzentrationen von 30 - 50 µM, wobei eine Beteiligung der Adenosinrezeptor-Aktivierung ausgeschlossen wurde. Koffein führt zu einer Translokation des Zellzyklusinhibitors CDKN1B/p27 in die Mitochondrien, wodurch die mitochondriale Funktion und die migratorische Kapazität primärer humaner Endothelzellen verbessert wird (Ale-Agha et al., 2018). Zudem stimuliert Koffein mitochondrienabhängig die Migration und Reparatur von EZ, sowie die von endothelialen Vorläuferzellen, durch die Aktivierung des Enzyms AMPK (Spyridopoulos et al., 2008). Damit unterstreichen beide Studien, dass nicht hohe, experimentelle Koffeinmengen, sondern vielmehr realistisch erreichbare Konzentrationen relevante vaskuläre Schutzmechanismen aktivieren können.

Eine randomisierte, placebokontrollierte Studie in gesunden Probanden zeigte eine Verbesserung der endothelabhängigen Acetylcholin-induzierten Vasodilatation durch die orale Einnahme von 300 mg Koffein. Die Aufhebung dieses Effekts durch einen NO-Synthese-Inhibitor weist darauf hin, dass die Wirkung maßgeblich über eine direkte Stimulation der eNOS und eine Erhöhung des NO-Spiegels vermittelt wird (Umemura et al., 2006). Die Einnahme von 200 mg Koffein führte in einer klinischen Studie sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit zu einer signifikanten Verbesserung der endothelabhängigen FMD sowie zu einer Reduktion von Entzündungsmarkern im Plasma. Dies weist auf eine direkte positive Wirkung von Koffein auf die Endothelfunktion und eine entzündungshemmende Wirkung hin (Shechter et al., 2011). Ergänzend hierzu zeigte eine aktuelle Untersuchung, dass regelmäßiger Koffeinkonsum die Gefäßgesundheit langfristig unterstützt, indem es das Überleben endothelialer Vorläuferzellen fördert. Dieser Mechanismus wurde bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes beobachtet (Orefice et al., 2024).

Diese Befunde werden durch epidemiologische Analysen unterstützt, welche zeigen, dass moderater Kaffeekonsum, unter anderem durch die entzündungshemmenden und antioxidativen Effekte von Koffein, mit einer Verzögerung des Alterungsprozesses und einer verbesserten Zellgesundheit einhergeht (Lopes & Cunha, 2024). Lopes et al. betonen jedoch, dass weitere Studien erforderlich sind, um die komplexen molekularen Mechanismen und die umfassende Bedeutung von Koffein für das menschliche Altern vollständig zu verstehen.

Obwohl Curcumin und Koffein als vielversprechende Pflanzeninhaltsstoffe gelten, ist ihr genauer Einfluss auf das Endothel und die Stress-induzierte Seneszenz in physiologisch relevanten Konzentrationen bislang noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer eingehender Untersuchungen.

## **1.6 Ziele der Arbeit**

Die steigende Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen in der immer älter werdenden Gesellschaft stellt weltweit eine erhebliche Herausforderung für das Gesundheitswesen dar. Besonders die Funktion des Endothels, das als Regulator für Gefäßgesundheit, Entzündungsprozesse und antioxidative Abwehrmechanismen eine Schlüsselrolle übernimmt, rückt zunehmend in den Mittelpunkt biomedizinischer Forschung. Eine gestörte Redoxhomöostase und die vorzeitige Seneszenz von Endothelzellen gelten als entscheidende Veränderungen, die die Entwicklung und das Fortschreiten vaskulärer Erkrankungen maßgeblich beeinflussen. Die Regulation des antioxidativen Signalwegs um Nrf2 ist deshalb ein wichtiger Ansatzpunkt, um dem Verlust der Gefäßfunktion entgegenzuwirken. Allerdings bleibt trotz umfangreicher Erkenntnisse zu Nrf2 offen, wie und ob Pflanzeninhaltsstoffe wie Curcumin und Koffein diesen Signalweg und die damit verbundenen Schutzmechanismen in Endothelzellen beeinflussen. Zunehmend rückt dabei auch das perivaskuläre Fettgewebe (PVAT) in den Fokus, das durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren in engem Austausch mit der Gefäßwand steht und zur Modulation der endothelialen Funktion beitragen kann.

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit zuerst mit der Frage, welchen Einfluss die Pflanzeninhaltsstoffe Curcumin und Koffein auf die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2 haben.

Des Weiteren sind trotz bekannter antioxidativer Eigenschaften von Curcumin und Koffein ihre Wirkmechanismen bei der Zellerterung des Endothels noch nicht erforscht, sodass im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Wirkung der Pflanzeninhaltsstoffe auf die Endothelzellseneszenz untersucht wird.

Ergänzend werden in pilotartigen Untersuchungen die Effekte von Curcumin und Koffein auf die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten im dritten Teil der Arbeit analysiert, um potenzielle Veränderungen der Eigenschaften des PVAT zu erfassen, die perspektivisch für den Crosstalk mit dem Endothel relevant sein könnten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien.

| Name  | Hersteller, Ort                           |
|---|---|
| 2x SYBR Green qPCR Master Mix                   | Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach     |
| 30 % (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamid-Mix (29:1)   | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)             | Roche Diagnostics, Mannheim               |
| Agarose Standard Roti®agarose                   | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Agarose Ultra Pure™                             | Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt |
| Ammoniumsulfat (APS)                            | Sigma Aldrich, Taufkirchen                |
| Ampicillin                                      | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate   | BioRad, München                           |
| Bromphenolblau                                  | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Chloroform                                      | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Coomassie Brilliant Blue G-250                  | Serva, Heidelberg                         |
| CutSmart Puffer 10x                             | New England Biolabs, Ipswich, MA, USA     |
| Dithiothreitol (DTT)                            | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| DNase/RNase-freies Wasser                       | Thermo Fisher Scientific, Schwerte        |
| Ethidiumbromid                                  | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA)                 | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Gel Ladepuffer, Blau (6x)                       | New England Biolabs, Ipswich, MA, USA     |
| GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter                  | Thermo Fisher Scientific, Schwerte        |
| GeneRuler Low Range DNA-Leiter                  | Thermo Fisher Scientific, Schwerte        |
| Glycin  | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Glyzerin 86 % (v/v)                             | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| IGEPAL CA-630                                   | Fluka Chemie, Buchs, CH                   |
| Isopropanol 100 % (v/v)                         | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Luziferase Assay Substrat                       | Promega, Walldorf                         |
| Lysogeny broth (LB) medium (Lennox)             | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Magermilchpulver (MP)                           | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| NEB® 5-alpha kompetente <i>Escherichia coli</i> | New England Biolabs, Ipswich, MA, USA     |
| Normales Ziegenserum (NZS)                      | Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK     |
| Öl Rot O  | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                |
| Oligonukleotide                                 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                |
| Orange G  | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Paraformaldehyd (PFA)                           | Sigma-Aldrich, Taufkirchen                |
| Phalloidin, CF® 488A                            | Biotum, Fremont, CA, USA                  |
| Phosphatase Inhibitorcocktail                   | BioTool, Kirchberg                        |
| Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrat      | Thermo Fisher Scientific, Schwerte        |
| ProLong™ Diamond Antifade Mountant              | Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt |

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| Protease Inhibitorcocktail  | BioTool, Kirchberg                    |
| Protein Größenmarker, Low-range Amersham Rainbow™ Marker                                | Merck, Darmstadt                      |
| Protein Größenmarker, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard | BioRad, München                       |
| Restriktionsenzyme  | New England Biolabs, Ipswich, MA, USA |
| Rinderserumalbumin  | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Röntgenfilm Entwicklerkonzentrat  | Adefo, Neu-Isenburg                   |
| Röntgenfilm Fixiererkonzentrat  | Adefo, Neu-Isenburg                   |
| SOC Outgrowth Medium  | New England Biolabs, Ipswich, MA, USA |
| Sodium dodecyl sulfate Pellets  | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Tetramethylethyldiamin  | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| TRIS-Base   | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| TRIS-Chlorwasserstoff (HCl)   | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Triton™ X-100   | Thermo Fischer Scientific, Schwerte   |
| TRIzol® Reagenz   | Thermo Fischer Scientific, Schwerte   |
| Tween®20  | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Xylencyanol   | Carl Roth, Karlsruhe                  |

## 2.1.2 Zellkultur

Tabelle 2: Liste verwendeter Chemikalien und Medien in der Zellkultur.

| Name   | Hersteller, Ort                     |
|--|-------------------------------------|
| 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)                   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA   |
| Curcumin ≥ 94 % (w/v)                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA   |
| Dexamethason   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA   |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                              | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)              | Thermo Fischer Scientific, Schwerte |
| GlutaMAX™  |                                     |
| Effectene® Transfektionsreagenz                      | Qiagen, Hilden                      |
| EGM™ Single Quots®                                   | Lonza, Köln                         |
| Endotheliales Basalmedium (EBM)                      | Lonza, Köln                         |
| Fötale Kälberserum (FBS)                             | Thermo Fischer Scientific, Schwerte |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % (v/v)             | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Humane Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC)             | Lonza, Köln                         |
| Insulin  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA   |
| Koffein  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA   |
| Lipopolysaccharid (LPS)                              | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA   |
| LPS detoxifiziert                                    | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA   |
| Penicillin (10,000 U/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml) | Thermo Fischer Scientific, Schwerte |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)                  | Thermo Fischer Scientific, Schwerte |
| Trypsin-EDTA 0.5 % (w/v) 10x                         | Thermo Fischer Scientific, Schwerte |

### 2.1.3 Kits

Tabelle 3: Liste verwendeter Kits.

| Name                                  | Hersteller, Ort |
|---------------------------------------|-----------------|
| HiSpeed® Plasmid Maxi Kit             | Qiagen, Hilden  |
| QIAprep® Spin Miniprep Kit            | Qiagen, Hilden  |
| QIAquick® Gel Extraction Kit          | Qiagen, Hilden  |
| QuantiTect® Reverse Transcription Kit | Qiagen, Hilden  |
| RNeasy® Mini Kit                      | Qiagen, Hilden  |

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien.

| Name  | Hersteller, Ort                       |
|---|---------------------------------------|
| 96 Well Mikrotiterplatte                                    | Greiner Bio-One, Frickenhausen        |
| 6 Well CELLSTAR® Zellkultur Multiwellplatten                | Greiner Bio-One, Frickenhausen        |
| Immobilon®-P Polyvinyliden fluorid (PVDF) Membran (0,45 µm) | GE Healthcare Life Sciences, Freiburg |
| Kryoröhrchen  | Greiner Bio-One, Frickenhausen        |
| Küvetten  | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Mikrozentrifugenröhrchen (0,2 ml - 2 ml)                    | Eppendorf, Hamburg                    |
| PCR 0.1 ml 4-Tube & 4-Cap Strips                            | Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf |
| Pipettenspitzen   | StarLab, Hamburg                      |
| Polystyrol-Rundbodenröhrchen                                | Corning, Glendale, AZ, USA            |
| Röntgenfilme Fujifilm Super RX-N                            | Fujifilm Europe, Düsseldorf           |
| Schikanenkolben   | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Serologische Pipetten 2 ml, 50 ml                           | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml                    | Greiner Bio-One, Frickenhausen        |
| TC Flaschen T-75, 75 cm <sup>2</sup>                        | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Whatman™ Filter Papier                                      | GE Healthcare Life Sciences, Freiburg |
| Zellkulturschalen, 35 mm, 60 mm                             | TPP, Trasadingen, CH                  |
| Zellschaber   | TPP, Trasadingen, CH                  |
| Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml                            | TPP, Trasadingen, CH                  |

### 2.1.5 Instrumente

Tabelle 5: Liste verwendeter Instrumente.

| Name   | Hersteller, Ort                       |
|--|---------------------------------------|
| Autoradiographiekassetten                            | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Berthold Centro XS <sup>3</sup> LB 960 Luminometer   | Berthold Technologies, Bad Wildbad    |
| BioPette™ Plus autoklavierbare Pipetten 10 - 1000 µl | Labnet, Edison, NJ, USA               |
| BioTek Platten-Reader                                | BioTek Instruments, Winooski, VT, USA |

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| Durchlichtmikroskop "CKX31"                              | Olympus, Hamburg                   |
| Eismaschine CoolNat                                      | Ziegra Eismaschinen, Isernhagen    |
| Elektrophorese Stromversorgung                           | VWR International, Darmstadt       |
| EMC-11-UV Spektrophotometer                              | Emclab, Duisburg                   |
| Fluoreszenzmikroskop "Axio Observer 7"                   | Carl Zeiss, Oberkochen             |
| Hamilton MICROLITER™ Spritze                             | Carl Roth, Karlsruhe               |
| Heraeus Hera Cell 240 Inkubator                          | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Hybridisationsinkubator 7601                             | GFL, Burgwedel                     |
| INTAS GelStick IMAGER                                    | INTAS, Göttingen                   |
| Labstar 150 Autoklav                                     | Zirbus, Bad Grund                  |
| Magnetrührer "IKA® RH Basic 2"                           | IKA Laboratory Equipment, Staufen  |
| Milli-Q® Filter system                                   | Merck Millipore, Darmstadt         |
| NanoDrop™ 2000c  | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Neubauer-Hämozytometer                                   | Marienfeld, Lauda-Königshofen      |
| Orbitalschüttler "DOS-20L"                               | ELMI, Riga, Latvia                 |
| pH-Meter SevenGo   | Mettler Toledo, Schwerzenbach, CH  |
| Pipettierhilfe "Pipetboy acu 2"                          | Integra Biosciences, Biebertal     |
| PowerPac™ Universal Power Supply                         | BioRad, München                    |
| Präzisionswaage "CP124s"                                 | Sartorius, Göttingen               |
| Rotor-Gene® Q  | Qiagen, Hilden                     |
| Sicherheitswerkbank "HeraSafe2025™"                      | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Thermocycler MyCycler™                                   | BioRad, München                    |
| Vertikal-Elektrophoresesystem "Mini-PROTEAN® Tetra cell" | BioRad, München                    |
| Vortex-Genie® 2  | NeoLab® Migge, Heidelberg          |
| Zentrifuge "5424 R"                                      | Eppendorf, Hamburg                 |
| Zentrifuge "CD-3124R"                                    | JoJo Life Science, Giengen         |
| Zentrifuge "Rotina 420R"                                 | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen    |

## 2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden in entsalzter Form im 25 nmol Maßstab von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, bezogen. Die Herstellung der 100 µM Stammlösungen erfolgte in TE-Puffer (10 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) und deren Lagerung bei -20 °C. Vor dem Gebrauch wurden Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 µM angefertigt.

### 2.1.6.1. Oligonukleotide für Klonierung

Tabelle 6: Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer für die Klonierung.

| Name          | Sequenz (5' → 3')  |
|---------------|--|
| AREmut bottom | gatcAAAGTaaTTTGctAgCATTAGCAATGTCATTTCCAAGCTAAAAGTaaTTTGctAgCATTAGCAATGTCATTTCCAAGCTA |
| AREmut top    | agctTAGCTTGGAATGACATTGCTAATGcTagCAAAtttACTTTTAGCTTGGAATGACATTGCTAATGcTagCAAAtttACTTT |

|              |   |
|--------------|---|
| AREwt bottom | gatcAAAGTTGCTTTGTCACCATTAGCAATGTCATTCCAAGCTAAAAGTTGCTTT<br>GTCACCATTAGCAATGTCATTCCAAGCTA  |
| AREwt top    | agctTAGCTTGAAATGACATTGCTAATGGTGACAAAGCAACTTTTAGCTTGGAA<br>ATGACATTGCTAATGGTGACAAAGCAACTTT |

### 2.1.6.2. Oligonukleotide für semi-quantitative Echtzeit-PCR

Tabelle 7: Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer für die semi-quantitative Echtzeit-PCR.

| Name               | Sequenz (5' → 3')      |
|--------------------|------------------------|
| hCDKN1A Ex02 for1  | TCTCAGGGTCGAAAACGGC    |
| hCDKN1A Ex03 rev1  | GCTTCCTGTGGGCGGATTAG   |
| hGLB1 Ex10 for1    | AGCCCACCAGCTACGACTAT   |
| hGLB1 Ex11 rev1    | ATGGAGGGATAGGACCTTCTGG |
| hmRPL32 Ex02 for1  | GTGAAGCCCAAGATCGTCAA   |
| hmRPL32 Ex03 rev1  | TTGTTGCACATCAGCAGCAC   |
| hNOS3 Ex10 rev1    | TATCCAGGTCCATGCAGACA   |
| hNOS3 Ex9 for1     | AGGAACCTGTGTGACCCTCA   |
| hSOD2 Ex02 for1    | GCCCTGGAACCTCACATCAA   |
| hSOD2 Ex03/04 rev1 | AGCAACTCCCCTTTGGGTTC   |
| hTXN1 Ex01 for1    | TGGTGAAGCAGATCGAGAGC   |
| hTXN1 Ex03/04 rev1 | ACATCCTGACAGTCATCCACAT |

### 2.1.6.3. Oligonukleotide für Sequenzierung

Tabelle 8: Liste der verwendeten Oligonukleotidprimer für die Sequenzierung.

| Name       | Sequenz (5' → 3')    |
|------------|----------------------|
| HSVtk rev1 | ACGCTGTTGACGCTGTTAAG |

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1. Primärantikörper für Immunoblot und Immunfluoreszenzfärbung

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Primärantikörper für Immunoblot (IB) in 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T und für Immunfluoreszenzfärbung (IF) in 1 % (w/v) *bovine serum albumin* (BSA) in PBS verdünnt.

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper für Immunoblot und Immunfluoreszenzfärbung.

| Antikörper           | Spezies   | Verwendung | Verdünnung                 | Firma                     |
|----------------------|-----------|------------|----------------------------|---------------------------|
| Anti-eNOS            | Maus      | IF         | 1:100                      | Cell Signaling Technology |
| Anti-eNOS [EPR19296] | Kaninchen | IF, IB     | 1:200 (IF)<br>1:1,000 (IB) | Abcam                     |

|                            |           |        |   |                              |
|----------------------------|-----------|--------|---|------------------------------|
| Anti-GAPDH<br>[6C5]        | Maus      | IB     | 1:50,000                                    | Abcam                        |
| Anti-ICAM-1/CD54<br>[15.2] | Maus      | IF     | 1:100                                       | Santa Cruz                   |
| Anti-MnSOD<br>[EPR2560Y]   | Maus      | IF     | 1:500                                       | Abcam                        |
| Anti-MnSOD                 | Kaninchen | IB     | 1:300                                       | Millipore                    |
| Anti-Nrf2<br>(clone D1Z9C) | Kaninchen | IF     | 1:50  | Cell Signaling<br>Technology |
| Anti-p21                   | Ziege     | IF     | 1:50 in 1 %<br>(w/v) BSA + 1<br>% (v/v) NDS | R&D Systems                  |
| Anti-p21<br>(clone 12D1)   | Kaninchen | IF, IB | 1:500 (IB)<br>1:50 (IF)                     | Cell Signaling<br>Technology |
| Anti-Src<br>(clone 32G6)   | Kaninchen | IB     | 1:1,000 (IB)                                | Cell Signaling<br>Technology |
| Anti-Tom20<br>[FL-145]     | Kaninchen | IF     | 1:50  | Santa Cruz                   |

### 2.1.7.2. Sekundärantikörper für Immunoblot und Immunfluoreszenzfärbung

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Sekundärantikörper für IB in 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T und für IF in PBS verdünnt.

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper für Immunoblot und Immunfluoreszenzfärbung.

| Antikörper  | Spezies    | Verwendung | Verdünnung | Firma                       |
|---|------------|------------|------------|-----------------------------|
| Anti-Maus IgG HRP-gekoppelt   | Schaf      | IB         | 1:5,000    | GE Healthcare Life Sciences |
| Anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt  | Esel       | IB         | 1:5,000    | GE Healthcare Life Sciences |
| Anti-Kaninchen IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 594 | Schaf/Esel | IF         | 1:500      | Thermo Scientific Fischer   |
| Anti-Kaninchen IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488 | Schaf/Esel | IF         | 1:500      | Thermo Scientific Fischer   |

|  |            |    |       |                      |         |
|--|------------|----|-------|----------------------|---------|
| Anti-Maus <i>IgG (H+L)</i><br><i>Highly Cross-Adsorbed</i><br><i>Secondary Antibody,</i><br><i>Alexa Fluor™ 488</i>  | Schaf/Esel | IF | 1:500 | Thermo<br>Scientific | Fischer |
| Anti-Maus <i>IgG (H+L)</i><br><i>Highly Cross-Adsorbed</i><br><i>Secondary Antibody,</i><br><i>Alexa Fluor™ 594</i>  | Schaf/Esel | IF | 1:500 | Thermo<br>Scientific | Fischer |
| Anti-Schaf <i>IgG (H+L)</i><br><i>Highly Cross-Adsorbed</i><br><i>Secondary Antibody,</i><br><i>Alexa Fluor™ 488</i> | Esel       | IF | 1:500 | Thermo<br>Scientific | Fischer |
| Anti-Schaf <i>IgG (H+L)</i><br><i>Highly Cross-Adsorbed</i><br><i>Secondary Antibody,</i><br><i>Alexa Fluor™ 647</i> | Esel       | IF | 1:500 | Thermo<br>Scientific | Fischer |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Verwendeter Bakterienstamm

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sämtliche Klonierungs- und Plasmidisolierungsexperimente mit dem im Handel erhältlichen *Escherichia coli* Stamm NEB 5-alpha mit dem Genotyp *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* durchgeführt.

#### 2.2.1.2. Transformation in *Escherichia coli*

Für Transformationen wurden ausschließlich kommerziell erhältliche kompetente NEB 5-alpha *E. coli* (Kapitel 2.2.1) genutzt. Dazu wurden 50 µl der bei -80°C gelagerten Suspension kompetenter Bakterien in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen auf Eis aufgetaut und 4 µl der Ligationsansätze (Kapitel 2.2.1.3) bzw. 10 ng ungeschnittene Plasmid DNA hinzugefügt. Die Suspension wurde dann vorsichtig gemischt und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Dann wurde ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt, wonach die Proben für 5 Minuten auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden 950 µl SOC Outgrowth Medium zu den Proben gegeben und eine Stunde lang bei 200 Umdrehungen pro Minute (UpM) und 37 °C geschüttelt. Die Proben wurden dann bei 3,220 xg für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Bakterien wurden in 100 µl LB-Medium (Tabelle 11) resuspendiert. Um einzelne Bakterienkolonien erhalten, wurden 10 µl bzw. 90 µl des Transformationsansatzes auf zwei separaten LB Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (Tabelle 11) mit einem Drigalskispatel ausgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C auf dem Kopf stehend inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### 2.2.1.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Im Rahmen der Arbeit wurden nur Ligationen zwischen einem linearisierten Vektorrückgrat und doppelsträngigen DNA Oligonukleotiden durchgeführt. Dazu wurden 100 ng des Vektorrückgrats zusammen mit einem 15-fachen molaren Überschuss der doppelsträngigen, nicht phosphorylierten Oligonukleotide mit DNase-freiem Wasser auf 5 µl aufgefüllt. Zum Starten der Reaktion wurden 5 µl des Blunt/TA-Ligase-Mastermixes hinzugefügt, die Proben 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben entweder direkt für die Transformation in kompetente *E. coli* verwendet (Kapitel 2.2.1.2) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.1.4. Anfertigung von Glycerindauerkulturen

Zur Langzeitlagerung von Plasmid tragenden Bakterien wurden ein Glycerindauerkulturen angelegt. Zu diesem Zweck wurden 500 µl der zu verwendenden Plasmid-tragenden Bakterien-Übernachtskultur mit 500 µl sterilem 50 % (v/v) Glycerin in einem Kryokonservierungsgefäß gemischt und bei -80 °C gelagert. Bei Entnahme von Bakterien aus einer Dauerkultur musste darauf geachtet werden, dass diese nicht auftaut. Dementsprechend wurde ein Teil der Bakterien mit einer Pipettenspitze von der gefrorenen Kultur abgekratzt und auf einer LB Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen (Kapitel 2.2.1.5).

### 2.2.1.5. Isolierung von Plasmid-DNA

In Abhängigkeit von der Art des Experiments sowie der erforderlichen Menge an Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Kits verwendet. Für die Isolierung von Plasmid-DNA im Rahmen von Klonierungsexperimenten wurde das QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit verwendet, während für die Isolierung einer großen Menge an Plasmid-DNA für Transfektionen das HiSpeed<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit zum Einsatz kam (Kapitel 2.2.2.4).

In allen Fällen wurden Bakterien direkt aus einer gefrorenen Glycerindauerkultur entnommen (Kapitel 2.2.1.4) und mit einer Impfoese ein Vereinzelausstrich auf einer *Lysogeny Broth* (LB) Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin (Tabelle 11) angelegt. Die Platte wurde über Nacht in einem Inkubator bei 37 °C auf dem Kopf stehend inkubiert.

Zur Gewinnung geringer Mengen an Plasmid-DNA ( $\leq 15$  µg) wurde eine einzelne Bakterienkolonie in ein 14 ml Kulturröhrchen mit 2,5 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Das Röhrchen wurde anschließend für 18 Stunden bei 37 °C in einem Orbitalschüttler bei 200 UpM inkubiert. Im Anschluss wurde das QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers eingesetzt, wobei die folgenden Modifikationen vorgenommen wurden. Nach Aufzentrifugieren des klaren Lysats wurde die Säule zweimal mit jeweils 600 µl PE-Puffer anstatt einmal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die DNA mit 50 µl Puffer EB von der Säule eluiert.

Das HiSpeed<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit wurde eingesetzt, um größere Mengen (bis zu 750 µg) hochreiner Plasmid-DNA für die Transfektion primärer humaner Endothelzellen zu erhalten (Kapitel 2.2.2.4). Hierfür wurde eine Vorkultur wie oben beschrieben angelegt, aber nur fünf Stunden bei 37 °C geschüttelt. Für die Beimpfung der Hauptkultur wurden 200 µl der Vorkultur in 200 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Diese Hauptkultur wurde gleichmäßig auf zwei 500 ml Schikanenkolben aufgeteilt und für 19 Stunden bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. Die Verwendung des HiSpeed<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kits erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers, wobei folgende Änderungen vorgenommen wurden: nach der Zugabe von kaltem P3-Puffer und vorsichtigem Mischen wurde ein Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 3,220 xg bei RT durchgeführt. Im Anschluss wurde das erhaltene, klare Lysat auf den QIAfilter aufgetragen. Der TE-Puffer für die Elution aus dem QIAprecipitator wurde auf eine Temperatur von 65 °C vorgewärmt und die Elution wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt. Für den ersten Elutionsschritt wurden 500 µl des vorgewärmten TE-Puffers genutzt, das Eluat in den QIAprecipitator geladen und damit nochmals eluiert. Im Anschluss wurde ein zweiter Elutionsschritt mit 300 µl frischem, vorgewärmtem TE-Puffer in ein separates Auffangröhrchen durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen der beiden Eluate wurden spektralphotometrisch (Kapitel 2.2.1.11) bestimmt. Im Falle einer finalen DNA-Konzentration nach Vereinigung der beiden Eluate von  $\geq 0,8$  µg/µl, wurden diese kombiniert und die DNA-Konzentration erneut gemessen. In allen anderen Fällen wurde nur das Eluat mit der höheren Konzentration genutzt. Zur Verifizierung der Identität der isolierten Plasmid DNAs sowie zur Überprüfung auf Kontamination mit genomischer DNA wurde ein Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.1.8) durchgeführt, der ein Plasmidspezifisches Restriktionsfragmentmuster ergibt. In der folgenden Agarose-Gelelektrophorese wäre

kontaminierende genomische DNA als Schmier im Hintergrund zu erkennen. Die Plasmid-DNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

*Tabelle 11: Verwendete Medien und Agarplatten während der Plasmid-Isolierung.*

*Lysogeny broth* (LB) Medium:

|    |     |                       |
|----|-----|-----------------------|
| 10 | g/l | Trypton               |
| 5  | g/l | Hefeextrakt           |
| 5  | g/l | Natriumchlorid (NaCl) |

Das LB Medium wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

LB Agarplatten:

|    |     |                   |
|----|-----|-------------------|
| 15 | g/l | Agar in LB Medium |
|----|-----|-------------------|

Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben, nachdem der Agar autoklaviert und auf etwa 55 °C abgekühlt worden war. Die Agarlösung wurde in Petrischalen aus Kunststoff gegossen und die Agarplatten nach dem Erstarren bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C auf dem Kopf stehend gelagert.

Ampicillin Stammlösung:

|     |       |                 |
|-----|-------|-----------------|
| 100 | mg/ml | Ampicillin      |
|     |       | in Reinstwasser |

Die Stammlösung wurde steril filtriert und bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese

In einer Agarosegelmatrix können Nukleinsäuren elektrophoretisch nach Größe getrennt werden. Je nach Größe der zu trennenden RNA- oder DNA-Fragmente müssen unterschiedliche Anteile an UltraPure™ (für RNA; 0,8 % (w/v)) oder Standard-Agarose Roti® agarose (für DNA-Fragmente > 500 bp 1 % (w/v) bzw. ≤ 500 bp 2 % (w/v)) verwendet werden. Vor der elektrophoretischen Trennung von RNA müssen alle Gerätekomponenten mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt werden. Außerdem muss für die Zubereitung der Puffer autoklaviertes Reinstwasser verwendet werden. Die Agarose wurde je nach gewünschtem Prozentsatz eingewogen, 1x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Tabelle 12) hinzugefügt und in der Mikrowelle gekocht, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Nach dem Abkühlen auf etwa 50-60 °C wurde die flüssige Agarose in eine Gießschale gegossen, Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Nach dem Ziehen des Kammes wurden die Proben, denen ein Fünftel des entsprechenden 6x Ladepuffers (Tabelle 12) zugesetzt wurde, geladen. Parallel dazu wurde eine DNA-Leiter, die DNA-Banden bekannter Größe

enthält, als Referenz geladen (Abbildung 4). Die Elektrophorese wurde mit einer Feldstärke von 4-7 V/cm durchgeführt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Nukleinsäuren bzw.-Fragmente im durchscheinenden UV-Licht mit dem Gel-Dokumentationssystem „INTAS GelStick IMAGER“ sichtbar gemacht und dokumentiert.

*Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.*

50x TRIS-Acetat EDTA (TAE) Puffer:

|    |         |            |
|----|---------|------------|
| 2  | M       | TRIS-Base  |
| 5  | % (v/v) | Essigsäure |
| 50 | mM      | EDTA       |
| pH | 8.3     |            |

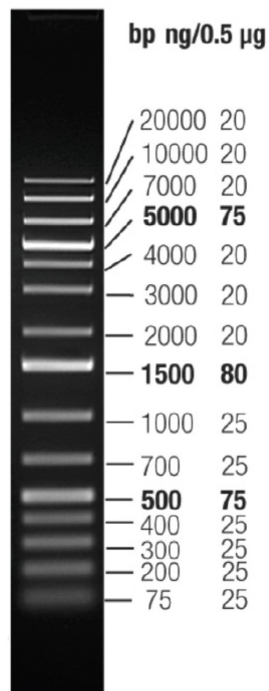
50x TAE-Puffer wurde mit Reinstwasser zu 1x verdünnt.

6x DNA-Ladefarbstoff:

|      |         |                  |
|------|---------|------------------|
| 30   | % (v/v) | Glyzerin         |
| 60   | mM      | TRIS-HCl, pH 7.4 |
| 60   | mM      | EDTA             |
| 0.05 | % (w/v) | Orange G         |
| 0.05 | % (w/v) | Xylencyanol FF   |

6x RNA-Ladefarbstoff wurde bei New England Biolabs erworben.

GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter



GeneRuler Low Range DNA-Leiter

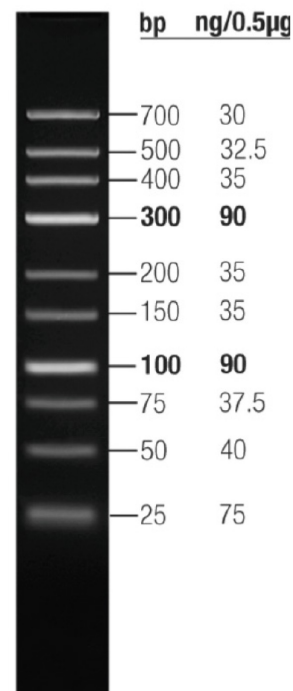


Abbildung 4: **GeneRuler DNA-Leitern als Größenmarker.** Je nach Größe der untersuchten DNA-Fragmente wurde die GeneRuler 1 kb Plus (1 kb+ Leiter) oder die GeneRuler Low Range (LR Leiter) DNA-Leiter verwendet. (aus: Thermo Fisher Scientific). Die Größe der unterschiedlichen DNA-Fragmente ist in bp angegeben, ng/0.5 µg gibt an wieviel ng des jeweiligen DNA-Fragments in insgesamt 0.5 µg der DNA-Leiter enthalten ist.

### 2.2.1.7. Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Für die Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAquick® Gel Extraction Kit“ gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt und die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell herausgeschnitten. Abweichend von den Anweisungen des Herstellers wurde die Säule nach Aufzentrifugieren des solubilisierten Gels zweimal mit jeweils 600 µl PE-Puffer gewaschen, anstatt einmal mit 750 µl PE-Puffer.

### 2.2.1.8. Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden durchgeführt, um die Identität und Reinheit von Plasmid-DNAs zu überprüfen (Kapitel 2.2.1.5) und um DNA-Fragmente für Klonierungen zu erzeugen. Ein Zehntel des Endvolumens des 10x CutSmart-Puffers (Tabelle 13) wurde mit der gewünschten DNA-Menge, Wasser und einem oder mehreren Restriktionsenzymen kombiniert, wobei das Volumen der Restriktionsenzyme ein Zehntel des Gesamtvolumens nicht überschreiten darf. Als allgemeiner

Richtwert wurde 1 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA verwendet. Die Mischung wurde bei 37 °C drei Stunden oder über Nacht inkubiert.

Tabelle 13: Zusammensetzung des 10x CutSmart Puffers.

|                      |       |                 |
|----------------------|-------|-----------------|
| 10x CutSmart Puffer: |       |                 |
| 0.5                  | M     | KOAc            |
| 0.2                  | M     | TRIS-Acetat     |
| 0.1                  | M     | Magnesiumacetat |
| 1                    | mg/ml | BSA             |
| pH                   | 7.9   |                 |

### 2.2.1.9. DNA Sequenzierung

Zur Bestätigung der Identität neu klonierter Plasmide auf DNA-Sequenzebene wurden die modifizierten Regionen der Plasmide extern durch die Firma StarSEQ GmbH sequenziert. In Übereinstimmung mit den Angaben im "U Mix Protokoll" wurden 400 ng Plasmid-DNA mit 1  $\mu\text{l}$  einer 10 pmol/ $\mu\text{l}$  Lösung eines Primers gemischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 7  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die erhaltenen Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe des frei zugänglichen Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit der erwarteten Sequenz verglichen.

### 2.2.1.10. Extraktion gesamter zellulärer RNA

Zur Extraktion der gesamten zellulären RNA wurde eine Kombination aus Lyse in TRIzol<sup>®</sup> und anschließender Aufreinigung mit dem RNeasy Mini Kit verwendet. Um die Zellen zu lysieren, wurde das Medium abgesaugt, die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und 700  $\mu\text{l}$  kaltes TRIzol<sup>®</sup> pro 6 cm Zellkulturschale zu den Zellen gegeben und die Suspension auf Eis mehrmals auf und ab pipettiert. Die Suspension wurde in ein 2,0 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Suspension wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur direkten Verwendung wurde die Mischung aufgetaut, 300  $\mu\text{l}$  wassergesättigtes Chloroform hinzugefügt und das Röhrchen 15-mal invertiert. Es folgten eine 2-minütige Inkubation bei RT und ein Zentrifugationsschritt bei 12,000  $\times\text{g}$  für 15 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurde die klare obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, in ein RNase-freies 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt, das gleiche Volumen 70 % (v/v) Ethanol zugegeben und grünglich gemischt. Die Lösung wurde in mehreren Schritten, jeweils 700  $\mu\text{l}$ , auf eine RNeasy Mini Spin-Säule geladen, bei 12,000  $\times\text{g}$  für eine Minute bei RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nachdem die gesamte RNA Lösung auf die Säule geladen worden war, wurde sie gemäß den Anweisungen des Herstellers gewaschen und die RNA in 25  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop<sup>™</sup> 2000c bestimmt (Kapitel 2.2.1.11). Die RNA-Integrität wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.1.6) überprüft. Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.11. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentrationen

Die DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit einem NanoDrop™ 2000c Spektrophotometer gemessen. Die Leerwertmessungen wurden mit 1 µl des Lösungsmittels durchgeführt. Das gleiche Volumen an Proben wurde auf den Messsockel aufgetragen, und die Absorption wurde zwischen 220 nm und 340 nm gemessen. Die Nukleinsäure-Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung der Tatsache berechnet, dass eine Absorption von 1 bei 260 nm 50 ng/µl für DNA und 40 ng/µl für RNA entspricht. Zur Bewertung der Reinheit der Nukleinsäuren wurden die Verhältnisse der Absorption bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) und bei 260 nm und 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) herangezogen. Eine Kontamination liegt vor, wenn das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von  $\sim 1,8$  für DNA oder  $\sim 2,0$  für RNA abweicht. Die Werte des  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnisses sollten für beide Nukleinsäuren im Bereich von 1,8 bis 2,2 liegen. Die Werte des  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnisses werden durch Proteinkontamination, die Werte des  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnisses werden in der Regel durch restliche Kohlenhydrat- oder Phenolkontamination verringert.

### 2.2.1.12. Reverse Transkription von RNA

Das “QuantiTect® Reverse Transcription Kit” wurde für die reverse Transkription von RNA in *complementary* DNA (cDNA) verwendet, wobei die Anweisungen des Herstellers mit einer Änderung befolgt wurden. Die RNA wurde im genomicDNA (gDNA) Wipeout Puffer bei 42 °C für 10 Minuten statt für 2 Minuten inkubiert.

### 2.2.1.13. Semi-quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die relativen Transkriptmengen der verschiedenen Gene (Primer siehe Tabelle 6) wurden mittels semi-quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Dazu wurde der *prima*QUANT 2x qPCR SYBR® Green Mastermix und der Rotor-Gene® Q Thermocycler gemäß den Anweisungen der Hersteller verwendet.

Zuerst wurden die *forward* und *reverse* Primer (jeweils 10 µM) in einem Verhältnis von 1:1 kombiniert. Ein Mastermix ohne Template wurde gemäß den Anweisungen in Tabelle 14 hergestellt, und 15 µl dieses Mastermixes wurden in 0,2 ml PCR-Gefäße vorgelegt. Anschließend wurden 5 µl verdünnte cDNA zugegeben, wobei die Verdünnung von dem zu analysierenden Transkript abhing. Als Negativkontrolle für jedes Primerpaar wurde Nuklease-freies Wasser anstelle von cDNA verwendet.

Die Rohdaten, d. h. die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenz, wurden mit der Software „Rotor-Gene® Q“ von Qiagen ausgewertet. Als Maß für die Amplikonhäufigkeit wurde ein Schwellenzyklus ( $C_t$ ) verwendet. Dieser  $C_t$ -Wert ist die arithmetisch berechnete Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz einen vordefinierten Schwellenwert (hier 0,1) überschreitet, und kann somit einen Dezimalwert haben. Nach Abschluss der Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, um die Homogenität des Endproduktes zu überprüfen. Dazu wurde die Temperatur in 0,2 °C Schritten von 50 °C auf 95 °C erhöht, um die doppelsträngige DNA in Einzelstränge zu schmelzen (Abbildung 5). Dieser Prozess führt zur Dissoziation des eingebauten Farbstoffs, was mit einer Abnahme der Fluoreszenz einhergeht, die nach jedem Zyklus gemessen wurde. Die während dieses Prozesses beobachtete

Fluoreszenzveränderung kann als Schmelzkurve dargestellt werden; dazu wird der negative Wert der Fluoreszenzveränderung gegen die Temperatur aufgetragen. Ein homogenes Produkt führt zu einem einzelnen, scharfen Schmelzpeak, der auf eine spezifische Amplifikation ohne Primer-Dimer-Bildung oder unspezifische Produkte hinweist. Der Schmelzpunkt hängt nicht nur von der Produktlänge, sondern auch von Faktoren wie GC-Gehalt und der Sekundärstruktur des Amplifikationsproduktes ab. Zum Schluss werden die Proben auf 4 °C abgekühlt.

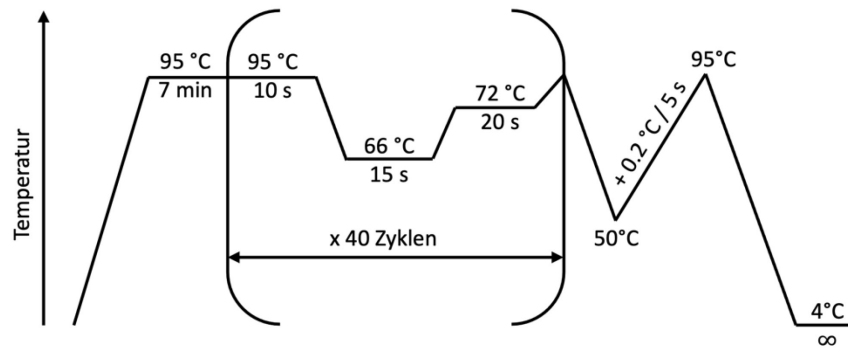


Abbildung 5: **Thermisches Zyklusprofil für qRT-PCRs.** Die y-Achse gibt die Temperatur und die x-Achse die Zeit an. Die Sequenz in der Klammer beschreibt einen Zyklus und wird 40 mal wiederholt.

Alle Proben wurden in technischen Duplikaten analysiert, wobei die mittleren  $C_t$ -Werte der Duplikate für die Berechnungen verwendet wurden. Wenn die Differenz der  $C_t$ -Werte innerhalb der Duplikate mehr als 0,5 betrug, wurden die Reaktionen für diese Probe wiederholt. Nach Abschluss des Laufes wurde ein Aliquot jeder Probe auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.1.6), um die Größe des amplifizierten Produkts zu überprüfen. Alle Primer-Kombinationen waren Intron-übergreifend, d.h. die beiden Primer befanden sich in getrennten Exons, um sicherzustellen, dass die Amplifikationsprodukte von der cDNA stammen. Zur Normalisierung wurde das *Large Ribosomal Subunit Protein EL32* (RPL32), dessen Expression unter allen genutzten Versuchsbedingungen konstant ist, verwendet. Für die Berechnung der relativen Transkriptmengen und damit der Veränderungen in der Expression des Gens von Interesse (GOI), z.B. als Reaktion auf eine Behandlung, wurde die folgende Formel nach der  $\Delta C_t$ -Methode von Pfaffl verwendet (Pfaffl, 2001):

$$\Delta C_t = \bar{C}_{t_{GOI}} - \bar{C}_{t_{RPL32}}$$

$$\text{Relative Transkriptmenge GOI} = 2^{-\Delta C_t}$$

Tabelle 14: Schema für die Mastermix Herstellung.

Mastermix (1x):

|    |    |   |
|----|----|---|
| 10 | µl | 2x SYBR® Green qPCR Mastermix                         |
| 3  | µl | Nuclease-freies Wasser                                |
| 2  | µl | Oligonukleotidprimer Mix ( <i>forward + reverse</i> ) |

## 2.2.2. Zellbiologische Methoden

Alle folgenden zellbiologischen Experimente, einschließlich bis zum Kapitel 2.2.2.4, wurden in einer Thermo Scientific™ Herasafe2025™ Sicherheitswerkbank unter sterilen Konditionen durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Routinemäßig wurden die Zellen in T-75 Flaschen kultiviert und für Experimente in Zellkulturschalen oder Multiwellplatten ausgesät, wie in den spezifischen Methodenabschnitten beschrieben. Alle Zellzählungen wurden mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in diese pipettiert und die Zellen in den vier eckständigen Großquadraten unter einem Durchlichtmikroskop gezählt. Da das Volumen eines Quadrates 0,1 µl entspricht, konnte die Zellzahl mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{(\text{Summe der gezählten Zellen})}{(\text{Anzahl gezählter Quadrate})} \times 10^4$$

### 2.2.2.1. Kultivierung primärer humaner Nabelvenen-Endothelzellen

Primäre humane Nabelvenen-Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) aus Nabelschnüren mehrerer Spender wurden von der Firma Lonza erworben. Die Zellen wurden in komplettem endotheliales Basalmedium (EBM komplett) kultiviert (Tabelle 15). Für alle Experimente wurden Zellen nur bis zur dritten Passage verwendet. Um die Zellen für Experimente auszusäen, wurden sie erst mit ca. 6 ml PBS gewaschen und dann 2 ml einer 1x Trypsin-EDTA Lösung (Tabelle 15) hinzugegeben. Den Vorgang des Ablöses der Zellen vom Kulturgefäßboden wurde unter einem Durchlichtmikroskop beobachtet und sobald 90 % der Zellen abgerundet waren, wurde die Reaktion mit 8 ml EBM komplett gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen vorsichtig vom Kulturgefäßboden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, auf- und abpipettiert und gezählt. Abhängig vom jeweiligen Experiment, wurden die Zellen in 6 cm Zellkulturschalen oder 6 Well Kulturplatten ausgesät; die jeweils eingesetzten Kulturgefäße und Zellzahlen sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

Tabelle 15: Verwendete Lösungen für die Kultivierung von Endothelzellen.

EBM komplett:

|    |         | 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 ( <i>epidermal growth factor</i> , EGF) |
| 10 | % (v/v) | Fötales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> , FBS)                      |

10x Trypsin-EDTA Lösung:

|     |         |         |
|-----|---------|---------|
| 0,5 | % (w/v) | Trypsin |
| 0,2 | % (w/v) | EDTA    |
| 145 | mM      | NaCl    |

Vor der Verwendung wurde die 10x Trypsin-EDTA Lösung mit PBS zu 1x verdünnt.

### 2.2.2.2. Kultivierung muriner 3T3-L1 Präadipozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten 3T3-L1 Präadipozyten, die sich durch die spezifische Eigenschaft der Akkumulation von Lipiden auszeichnet, sind ein Subklon aus einer 3T3 Zelllinie und wurden von der Firma Zen-Bio bezogen. Diese Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, dass sie sich unter definierten Kultivierungsbedingungen vom Fibroblasten-ähnlichen Zelltyp zu Adipozyten differenziert (Green & Kehinde, 1975). 3T3-L1 Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) komplett (Tabelle 16) kultiviert. Eine regelmäßige Passagierung hat stattgefunden, wenn eine Konfluenz von 70-80 % erreicht wurde. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit ca. 8 ml PBS gewaschen und durch die Zugabe von 2 ml 1x Trypsin-EDTA Lösung (Tabelle 16) und eine Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 8 ml DMEM komplett gestoppt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, wie zuvor beschrieben, ermittelt. Differenzierungsexperimente wurden mit Zellen in den Passagen 10-13 durchgeführt.

Tabelle 16: Verwendetes Medium für die Kultivierung von Präadipozyten.

DMEM komplett:

|    |         |                         |
|----|---------|-------------------------|
|    |         | DMEM GlutaMAX™          |
| 10 | % (v/v) | FBS                     |
| 1  | % (v/v) | Penicillin/Streptomycin |

### 2.2.2.3. Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten in Adipozyten

Um die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten in Adipozyten zu induzieren, wurden  $2,2 \times 10^5$  Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nachdem nach ca. 6 bis 7 Tagen eine vollständige Konfluenz erreicht wurde, wurde zwei Tage später das Medium durch Differenzierungsmedium ersetzt (Tabelle 2). Die Zellen wurden in diesem Differenzierungsmedium für 3 Tage kultiviert (Abbildung 6) bevor das Medium gegen Differenzierungsmedium ohne IBMX und Dexamethason ausgetauscht wurde. Nach Inkubation in diesem Medium für weitere zwei Tage, wurde dieses durch DMEM komplett ersetzt (Tabelle 16). Bei den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimenten zur Untersuchung des Einflusses von Curcumin bzw. Koffein wurden den Zellen diese Substanzen beginnend mit der Induktion der Differenzierung und anschließend bei jedem Mediumwechsel (in Abbildung 6 mit „+“ gekennzeichnet) zugegeben, wie im Abschnitt „Ergebnisse“ näher erläutert.

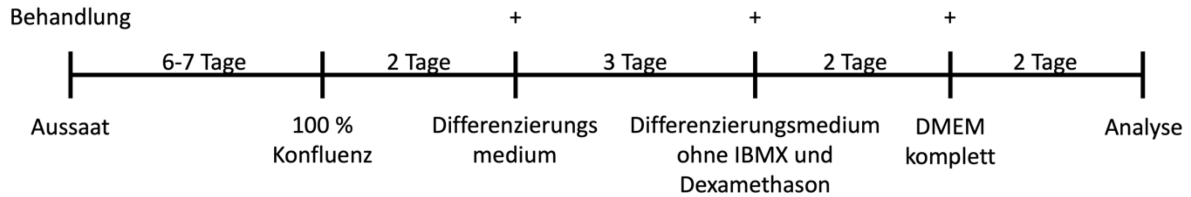


Abbildung 6: **Zeitstrahl des Differenzierungsmodells.** Schematische Darstellung des Verfahrens zur Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten. Die Pluszeichen oben zeigen die Zeitpunkte der Behandlung an. Die Anzahl der Tage gibt die Zeit zwischen den verschiedenen Verfahren an, die unter den vertikalen Linien erläutert werden.

Tabelle 17: Verwendetes Medium für die Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten.

Differenzierungsmedium:

|      |         |                         |
|------|---------|-------------------------|
|      |         | DMEM GlutaMAX™          |
| 10   | % (v/v) | FBS                     |
| 1    | % (v/v) | Penicillin/Streptomycin |
| 0.5  | mM      | IBMX                    |
| 0.25 | µM      | Dexamethason            |
| 1    | µg/ml   | Insulin                 |

#### 2.2.2.4. Transfektion von primären humanen Nabelvenen-Endothelzellen

Endothelzellen wurden transient transfiziert unter Verwendung des Effectene® Transfektionsreagenzes. 24 Stunden vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 6 cm Zellkulturschalen bzw.  $7 \times 10^4$  Zellen auf angeätzten Deckgläschen in 6 Well Kulturplatten in 3 ml bzw. 2 ml EBM komplett ausgesät. Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf die Transfektion einer 6 cm Zellkulturschale bzw. eines einzelnen Wells einer 6 Well Kulturplatte. Zunächst wurden 2,5 µg Plasmid-DNA für 6 cm Zellkulturschalen und 1,0 µg Plasmid-DNA für ein Well mit 150 µl (pro 6 cm Zellkulturschale) bzw. 100 µl (pro Well) EC-Puffer gemischt. Nach Zugabe von 8 µl Enhancer pro 1 µg Plasmid-DNA und vorsichtigem Mischen wurde die Lösung drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu der Mischung wurden 25 µl Effectene® (pro 6 cm Zellkulturschale) bzw. 10 µl Effectene® (pro Well) hinzugefügt und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung des Transfektionskomplexes zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit EBM ohne Zusätze gewaschen und 1 ml vollständiges EBM (pro 6 cm Zellkulturschale) bzw. 400 µl (pro Well) zu den Zellen gegeben. Nach Ablauf der zehninütigen Inkubationszeit wurde der Transfektionsmischung EBM komplett zugesetzt, für die 6 cm Zellkulturschalen betrug die Menge 1,1 ml, für die 6 Well Kulturplatten 400 µl. Im Anschluss wurde die finale Transfektionsmischung tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach einer dreistündigen Inkubation in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C wurde das Medium durch EBM komplett ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen unter identischen Bedingungen bis zur Ernte (Kapitel 2.2.2.6) oder Fixierung (Kapitel 2.2.3.1) inkubiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte zwei Stunden nach dem zuletzt erwähnten Medienwechsel.

### 2.2.2.5. Öl Rot O Färbung

Um die Differenzierung von 3T3-L1-Präadipozyten in Adipozyten zu kontrollieren, wurden die Zellen mit Öl Rot O gefärbt, das zur Visualisierung der Lipidakkumulation verwendet wird. Dazu wurden  $2,2 \times 10^5$  Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und die Differenzierung induziert (Kapitel 2.2.2.3). Am siebten Tag nach Start der Differenzierung wurden die Zellen in 4 % (w/v) PFA in PBS für 15 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Reinstwasser gewaschen und in der Zellkulturplatte für ca. 20 Minuten bei 37 °C in einem trockenen Inkubator getrocknet. Zur Herstellung der Öl Rot O-Stammlösung wurden 300 mg Öl Rot O-Pulver in 100 ml 100 % (v/v) Isopropanol bei 60 °C aufgelöst und bei RT gelagert. Für das Färbeverfahren wurden jeweils 9 ml der Stammlösung mit 6 ml Reinstwasser frisch gemischt und mit einem 0,22 µm Sterilfilter filtriert. Die fixierten und getrockneten Zellen wurden dann 20 Minuten lang mit dieser Lösung bei RT gefärbt. Anschließend wurde die Öl Rot O-Lösung entfernt und solange mit Reinstwasser gewaschen, bis die überschüssige Farbe ausgespült war. Dann wurden 500 µl 100 % (v/v) Isopropanol pro 6 cm Zellkulturschale zugegeben, die Platte mehrmals horizontal geschwenkt und 200 µl dieser Lösung in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt, deren Absorption bei 492 nm mit dem „BioTek Plate Reader“ gemessen wurde.

### 2.2.2.6. Zellernte

In Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment wurden die Zellen entweder 18 - 20 Stunden nach der Behandlung, für Kurzzeitexperimente, oder drei Tage nach der letzten Behandlung, für Langzeitexperimente, geerntet. Während die Zellkulturschalen auf Eis gehalten wurden, wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgetragen und in ein konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die verbliebenen Zellen auf den Zellkulturschalen wurden erneut mit dem Zellschaber in eiskaltem PBS abgeschabt und mit den Zellen im konischen Zentrifugenröhrchen vereinigt. Nach einer Zentrifugation bei  $800 \times g$  für 9 Minuten (HUVEC) bzw.  $2.200 \times g$  für 7 Minuten (3T3-L1) bei 4 °C wurde der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 800 µl eiskaltem PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und unter identischen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der zuvor beschriebene Vorgang wurde einmal unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Im Anschluss wurde der Überstand vollständig abgenommen und das trockene Zellpellet entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert oder gemäß den Anweisungen in Kapitel 2.2.2.7 lysiert.

### 2.2.2.7. Lyse der Zellen

Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben geerntet. Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und für den Luziferase-Assay werden unterschiedliche Lysen durchgeführt.

Für die Zellyse zur Vorbereitung der SDS-PAGE, wurde *radio-immunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffer (Tabelle 18) verwendet. Ein Proteaseinhibitor-Cocktail und, falls erforderlich, Phosphataseinhibitoren wurden dem RIPA-Puffer in einer Verdünnung von 1:100 unmittelbar vor der Verwendung zugesetzt. Dem Zellpellet wurde das doppelte Volumen RIPA-Puffer zugesetzt und die Zellen resuspendiert. Nach

einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Lysate bei 18,000 ×g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, gekühltes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt.

Für den Nachweis der Luziferaseaktivität (siehe Kapitel 2.2.3.4) wurde der 1x *Reporter Lysis Buffer* (RLB), der durch Verdünnung eines kommerziell erhältlichen 5x Konzentrats mit Reinstwasser hergestellt wird, verwendet. Dem Zellpellet wurde das doppelte Volumen 1x RLB zugesetzt und die Zellen wurden resuspendiert. Die Zellsuspension wurde unmittelbar in Flüssigstickstoff schockgefrostet und nach vollständigem Auftauen bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Lysate bei 18,000 ×g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues, gekühltes 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt.

Die Proteinkonzentrationen in diesen Lysaten beider Lyseverfahren wurden sofort mit dem Protein-Assay (siehe Kapitel 2.2.2.8) bestimmt. Schließlich wurden die Lysate bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

*Tabelle 18: Verwendete Puffer für die Zellyse.*

| RIPA-Puffer: |         |                            |
|--------------|---------|----------------------------|
| 50           | mM      | TRIS-HCl, pH 8.0           |
| 150          | mM      | NaCl                       |
| 1            | % (v/v) | IGEPAL <sup>®</sup> -CA630 |
| 0.5          | % (w/v) | Natriumdesoxycholat        |
| 0.1          | % (w/v) | SDS                        |

### 2.2.2.8. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lysaten wurde ein Protein-Assay durchgeführt, der auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und einer damit verbundenen Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm führt. Dazu wurden 799 µl Reinstwasser und 200 µl „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ in einer Kunststoff-Halbmikroküvette gemischt und 1 µl Lysat hinzugefügt. Zur Bestimmung des durch das Spektralphotometer verursachten Hintergrundsignals wurde 1 µl des entsprechenden Lysepuffers verwendet und die Messung wurde um diesen Leerwert korrigiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm in einem Photometer gemessen. Eine mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellte Kalibrierungskurve konnte dann zur Berechnung der Proteinkonzentration verwendet werden.

## 2.2.3. Analytische Methoden

### 2.2.3.1. Immunfluoreszenzfärbung

Um die relativen Mengen von Proteinen sowie ihre intrazelluläre Lokalisierung zu ermitteln, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils  $7 \times 10^4$  humane Endothelzellen auf geätzten Deckgläsern in 6 Well Kulturplatten ausgesät. Je nach Experiment wurden die Zellen transfiziert (Kapitel 2.2.2.4) oder wie beschrieben behandelt. Am Ende des Experiments

wurden die Zellen für 15 Minuten in 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte ein 15-minütiger Permeabilisierungs- und Blockierungsschritt in der Blocklösung (Tabelle 19) bei RT. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die jeweiligen Primärantikörper in 1 % (w/v) BSA in PBS verdünnt (Tabelle 9). Die Inkubation mit 100 µl der verdünnten Primärantikörper wurde in der mit Parafilm®-überzogenen 6 Well Kulturplatte über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit PBS bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 800 µl eines Fluorophor-konjugierten 1:500 in PBS verdünnten Sekundärantikörpers, der analog zu den Immunoblots (Kapitel 2.2.3.3) einer anderen Spezies als der Primärantikörper stammt, eine Stunde lang bei RT im Dunkeln inkubiert (Tabelle 10). Zur Färbung des Zytoskeletts wurden die Zellen gegebenenfalls mit Alexa Fluor™ 488 Phalloidin inkubiert, einem fluoreszenzmarkierten Cyclopeptid, das an Aktinfilamente bindet. Zu diesem Zweck wurde die Phalloidin-Lösung 1:70 in PBS verdünnt und die Zellen damit für 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne durch Inkubation mit 0,5 µg/ml DAPI in PBS für 5 Minuten bei RT gegengefärbt. Die Deckgläser wurden dann dreimal 5 Minuten lang mit PBS gewaschen und in „ProLong™ Diamond Antifade Mountant“ auf Objektträger befestigt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop „Axio Observer 7“ (200x oder 400x Vergrößerung und Öl) und der Software „ZEN 2.0“ aufgenommen. Die Intensität der Färbung des zu untersuchenden Proteins wurde mithilfe von „ImageJ“ (Schindelin et al., 2012) analysiert und quantifiziert.

*Tabelle 19: Verwendete Lösung für die Immunfluoreszenzfärbung.*

|              |         |              |
|--------------|---------|--------------|
| Blocklösung: |         |              |
| 3            | % (w/v) | BSA          |
| 0.3          | % (v/v) | Triton-X-100 |
| in PBS       |         |              |

### 2.2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Technik, bei der Proteine nach Denaturierung in einer vertikalen Elektrophoresekammer nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Die Proteine werden in einem Polyacrylamidgel getrennt, das eine Gitterstruktur mit einer definierten Porengröße aufweist, die von der Konzentration und dem Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid abhängt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die durch SDS negativ geladenen Proteine entsprechend ihrer Größe im Gel getrennt. Im Rahmen der Arbeit wurden ausschließlich Gele verwendet, bei denen das Trenngel 14 % (w/v) des Acrylamid enthielt. Bei der Herstellung des Trenngels wurden als Katalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) und als Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) zuletzt zugegeben, um die Polymerisation zu starten (Tabelle 20). Nach kräftigem Mischen wurde die Lösung zwischen zwei senkrechte Glasplatten gegossen, wobei die Geldicke durch die Dicke der Abstandshalter zwischen Glasplatten bestimmt wurde, und mit 100 % (v/v) Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol mit Reinstwasser abgewaschen, das Wasser abgegossen und jegliche Wasserreste mit Filterpapier

restlos abgesaugt. Das Sammelgel wurde durch Zugabe von TEMED und APS hergestellt und nach kräftigem Mischen auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde sofort eingesetzt, um Taschen für die Proben zu bilden. Die Elektrophorese wurde in einem mit SDS-PAGE Laufpuffer befüllten Vertikal-Elektrophorese System "Mini-PROTEAN® Tetra cell" durchgeführt. Dazu wurde die jeweils gewünschte Menge Lysat mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 5x Laemmli-Puffer gemischt und 5 Minuten lang bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden in die Taschen des Sammelgels geladen, und parallel dazu ein vorgefärbter Proteingrößenstandard als Referenz (Abbildung 7). Zur Trennung wurde zunächst eine Spannung von 80 V bei RT angelegt, bis die Proben an der Grenze zwischen dem Sammel- und dem Trenngel konzentriert waren. Die Spannung wurde dann auf 100 V erhöht, bis die gewünschte Trennung der Proben erreicht war. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für den Immunoblot verwendet (siehe Kapitel 2.2.3.3).

Tabelle 20: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.

Trenngel (14 %):

|     |    |   |
|-----|----|---|
| 1.4 | ml | Reinstwasser                                  |
| 1.3 | ml | TRIS-HCl, pH 8.8                              |
| 2.3 | ml | 30 % (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamid-Mix (29:1) |
| 50  | µl | SDS   |
| 50  | µl | APS   |
| 2   | µl | TEMED   |

Sammelgel (5 %):

|     |    |   |
|-----|----|---|
| 3.4 | ml | Reinstwasser                                  |
| 630 | µl | TRIS-HCl, pH 6.8                              |
| 830 | µl | 30 % (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamid-Mix (29:1) |
| 50  | µl | SDS   |
| 50  | µl | APS   |
| 5   | µl | TEMED   |

SDS-PAGE Laufpuffer:

|     |         |           |
|-----|---------|-----------|
| 25  | mM      | TRIS-Base |
| 192 | mM      | Glycin    |
| 0.1 | % (w/v) | SDS       |

5x Laemmli Puffer:

|      |         |                  |
|------|---------|------------------|
| 3125 | mM      | TRIS-HCl, pH 6.8 |
| 250  | mM      | Dithiothreitol   |
| 10   | % (w/v) | SDS              |
| 50   | % (v/v) | Glyzerin         |
| 0.01 | % (w/v) | Bromphenol Blau  |

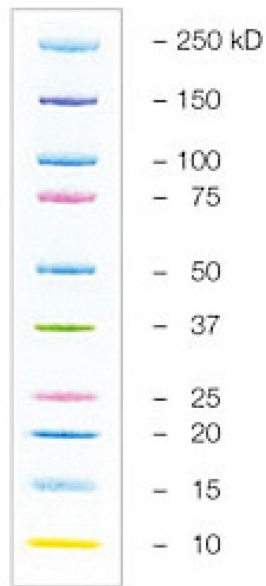


Abbildung 7: Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard als Protein Größenmarker. Die Größe der unterschiedlichen, vorgefärbten Proteingrößen ist in kD angegeben (aus: BioRad).

### 2.2.3.3. Immunoblot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (Kapitel 2.2.3.2) werden mit Hilfe eines Western Blots auf eine Membran übertragen und anschließend einzelne Proteine mit Antikörpern nachgewiesen. Hierfür wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Die Membran wurde 90 Sekunden lang in Methanol aktiviert und dann kurz mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurde sie zusammen mit Whatman Filterpapieren, Schwämmen und dem Trenngel in dem entsprechenden Transferpuffer (Tabelle 21) äquilibriert und wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt unter Vermeidung von Luftblasen zwischen Gel und Membran sowie zwischen dem Gel bzw. der Membran und den Whatman Filterpapieren zu einem Blotsandwich zusammengesetzt.

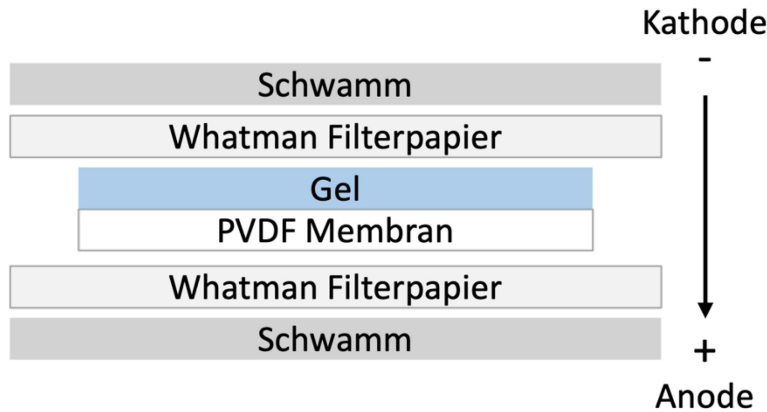


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Blotsandwiches.

Das Blotsandwich wurde in eine Blotkammer und dann in das zugehörige Vertikal-Elektrophorese System “Mini-PROTEAN® Tetra cell” eingesetzt. Diese wurde dann je nach Größe der zu untersuchenden Proteine mit eiskaltem 1x Transferpuffer mit bzw. ohne SDS befüllt (Tabelle 21). Abhängig von der Größe der Proteine, größer oder kleiner als 80 kDa, wurde eine Spannung von 80 V für 2 Stunden bzw. 100 V für 75 Minuten angelegt. Die Proteine wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes vom Trenngel auf die Membran übertragen, wodurch das Trennmuster der Proteine erhalten blieb. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde der Transfer bei 4 °C in einem Kühlraum durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit TBS-T (Tabelle 22) gewaschen und die nachzuweisenden Proteine wurden mit Antikörpern identifiziert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran zunächst mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T bei RT und 80 UpM auf einem Orbitalschüttler für eine Stunde blockiert. Anschließend wurde der jeweils benötigte Primärantikörper (Tabelle 9), der in 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T auf die gewünschte Konzentration verdünnt worden war, auf die Membran aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-T bei RT und 80 UpM auf einem Orbitalschüttler gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 10), der aus einer anderen Spezies als der Primärantikörper stammt und gegen dessen Fc-Domäne gerichtet ist, inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde 1:5,000 in 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verdünnt. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden lang bei RT und 80 UpM auf einem Orbitalschüttler. Danach wurde die Membran noch dreimal mit TBS-T für jeweils 10 Minuten bei RT und 80 UpM auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Die folgenden Schritte wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt. Die Bindung der Antikörper wurde mit dem „Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate“ nachgewiesen, das gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgetragen wurde. Dieses Substrat wurde durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase umgewandelt, was zur Erzeugung von Licht führte. Dieses Lichtsignal wurde dann in einer Autoradiographiekassette auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Dazu wurden mehrere Röntgenfilme mit unterschiedlichen Belichtungszeiten erstellt, entwickelt, mit Leitungswasser abgespült, fixiert, erneut mit Leitungswasser abgespült und getrocknet. Das Programm „ImageJ“ wurde für die semi-quantitative densitometrische Analyse der detektierten Signale verwendet (Schindelin et al., 2012).

Tabelle 21: Verwendete Puffer während des Immunoblottens.

5x Transferpuffer mit SDS:

(verwendet für Proteine > 80 kDa)

|      |         |           |
|------|---------|-----------|
| 240  | mM      | TRIS-Base |
| 192  | mM      | Glycin    |
| 0.25 | % (w/v) | SDS       |

5x Transferpuffer ohne SDS:

(verwendet für Proteine < 80 kDa)

|     |    |           |
|-----|----|-----------|
| 120 | mM | TRIS-Base |
| 966 | mM | Glycin    |

Vor der Verwendung wurden 200 ml des 5x Transferpuffers (mit bzw. ohne SDS) mit 600 ml Reinstwasser und 200 ml Methanol kombiniert, so dass sich eine endgültige Transferpufferkonzentration von 1x in 20 % (v/v) Methanol ergab.

Tabelle 22: Verwendete Lösungen während des Immunoblottens.

TBS:

|     |    |                     |
|-----|----|---------------------|
| 150 | mM | NaCl                |
| 50  | mM | TRIS-HCl, pH 8.0    |
| 5   | mM | Kaliumchlorid (KCl) |

Für TBS-T, wurde Tween®20 in einer Endkonzentration von 0.1 % (v/v) hinzugefügt.

### 2.2.3.4. Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay basiert auf der von der Luziferase *Photinus pyralis* katalysierten Umwandlung von D-Luciferin in Oxyluciferin, was zur Emission von Licht führt (Abbildung 9). Dabei ist die Menge des emittierten Lichts (RLU - *Relative Light Units*) bei nicht limitierenden ATP-Konzentrationen ist direkt proportional zur Menge an Luziferase.

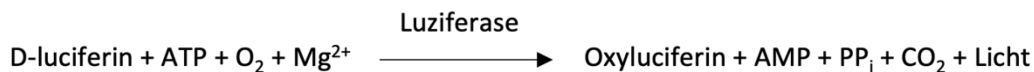


Abbildung 9: **Reaktionsgleichung des Luziferase-Assays.** D-Luciferin wird unter Addition von Adenosinriphosphat (ATP), Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Magnesium (Mg<sup>2+</sup>) durch das Enzym Luziferase umgewandelt in Oxyluciferin mit den Nebenprodukten Adenosinmonophosphat (AMP), anorganisches Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>), Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Licht.

Für die Messungen wurden 10 µg Lysat (Kapitel 2.2.2.7) mit 1x RLB in einem Well einer weißen, lichtdichten 96-Well Kulturplatte auf 20 µl aufgefüllt; 20 µl 1x RLB wurden als Leerwert verwendet. Nachdem die Platte in ein Luminometer mit automatischem Injektionssystem gestellt wurde, wurde die Messung mit einer Verzögerung von 120 Sekunden gestartet. Dazu wurden Well für Well je 100 µl der Luziferase-Substratmischung injiziert. 5 Sekunden nach jeder Injektion des Substrats wurde die Lichtemission 10 Sekunden lang gemessen und als RLU ausgegeben. Die Messwerte wurden dann für den Leerwert korrigiert und auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen.

### 3. Ergebnisse

In vorangehenden Studien konnte ich nachweisen, dass Curcumin den Transkriptionsfaktor Nrf2 stabilisiert, dessen Kerntranslokation in primären menschlichen Endothelzellen induziert und zu einer Hochregulation der Expression der MnSOD führt (Brinkmann et al., 2022). Dies sind allerdings nur indirekte Hinweise auf eine erhöhte transkriptionsregulatorische Aktivität von Nrf2 nach Curcuminbehandlung. Einen direkten Nachweis kann man mit einem Nrf2-abhängigen Reporterkonstrukt mit entsprechenden Spezifitätskontrollen erhalten. Ein derartiges Konstrukt sollte in der Promotorregion Bindungsstellen für Nrf2, sogenannte *antioxoditative response elements* (AREs), enthalten, sodass die Expression des Reportergens nach Aktivierung von Nrf2 erhöht wird. Reportergene, deren Expression über einen weiten Bereich gut quantifizierbar ist, sind Luziferasen. Solche Reporterplasmide sind kommerziell erhältlich, allerdings fehlen entsprechende Spezifitätskontrollen, das heißt, Plasmide, in denen die AREs so mutiert wurden, dass keine Bindung von Nrf2 mehr möglich ist.

#### 3.1 Design eines Nrf2-abhängigen Reportergensystems

Daher wurde in dieser Arbeit zuerst ein Nrf2-spezifisches Reporterkonstrukt und zusätzlich ein Reporterplasmid als Spezifitätskontrolle generiert. Diese basierten auf dem bereits existierenden Luziferase-Reportervektor pTATA LUC+ (Altschmied & Duschl, 1997), der einen Minimalpromotor mit lediglich einer TATA-Box enthält, der die basale Expression der Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* steuert. 5' zu diesem Minimalpromotor wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit zwei AREs inseriert. Es wurde eine Konfiguration mit 2 AREs gewählt, da derart multimerisierte Transkriptionsfaktorbindestellen synergistische Effekte aufweisen, das heißt die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität des Minimalpromotors wesentlich stärker ist als man aus einer Addition der Effekte zweier Bindestellen erwarten würde (Schüle et al., 1988). Eine gleichartige Konfiguration war in der Arbeitsgruppe schon für einen Luziferase-Reportervektor für den Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 erfolgreich genutzt worden (Haendeler et al., 2013). Als ARE wurde eine 41 Basenpaare (bp) lange Sequenz aus dem Promotor des Glutathion-S-Transferase, alpha 1 (Ya) (*GSTa1*) Gens der Maus genutzt (Abbildung 10). Für diesen DNA-Abschnitt war gezeigt worden, dass er nach Fusion mit einem Minimalpromotor in einem Luziferase-Reporterplasmid die Induktion der Luziferase-Aktivität durch Behandlung mit tert-Butylhydrochinon (tBHQ), einem Auslöser chemoprotektiver Zellantworten, vermittelt (Wasserman & Fahl, 1997).

```

5'-agctTAGCTTGGAAATGACATGCTAATGGTGACAAAGCAACTTTAGCTTGGAAATGACATGCTAATGGTGACAAAGCAACTTT-3'
      |||
3'-ATCGAACCTTTACTGTAACGATTACCACTGTTTCGTTGAAAATCGAACCTTTACTGTAACGATTACCACTGTTTCGTTGAAActag-5'

```

Abbildung 10: Sequenz des doppelsträngigen Oligonukleotids mit zwei Kopien des AREs aus dem Maus Glutathion-S-Transferase, alpha 1 (Ya) Promotor. Die Sequenz zeigt die beiden AREs, gelb bzw. grün unterlegt. Rot markierte Nukleotide symbolisieren konservierte Positionen in der in Abbildung 11 gezeigten ARE Konsensussequenz. Die an den 5'-Enden gezeigten Einzelstrangüberhänge sind kompatibel mit den durch Verdau von pTATA LUC+ mit HinDIII und BamHI generierten Überhängen.

Des Weiteren wurde eine Spezifitätskontrolle entworfen, mit der sichergestellt werden kann, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf Nrf2 zurückzuführen sind. Dafür wurde ein zweites Reportergenkonstrukt generiert, in dem die ARE-Sequenzen so verändert wurden, dass keine Nrf2

Bindung mehr möglich ist. Die Auswahl der geänderten Nukleotide beruhte auf der publizierten ARE Konsensussequenz. Die Definition dieser ARE-Konsensussequenz (Abbildung 11) resultierte aus dem Vergleich von 57 bekannten, funktionellen ARE-Sequenzen (Wang et al., 2007). Sie lässt sich als sogenanntes Sequenzlogo darstellen, in dem die Häufigkeit, mit der ein Nukleotid an einer bestimmten Position des AREs vorkommt, grafisch durch die Höhe der einzelnen Buchstaben symbolisiert ist. Dabei sind Positionen, an denen im Sequenzlogo nur ein Nukleotid auftaucht, invariant, d.h. in allen zugrunde gelegten Sequenzen kommt ausnahmslos das gleiche Nukleotid vor.

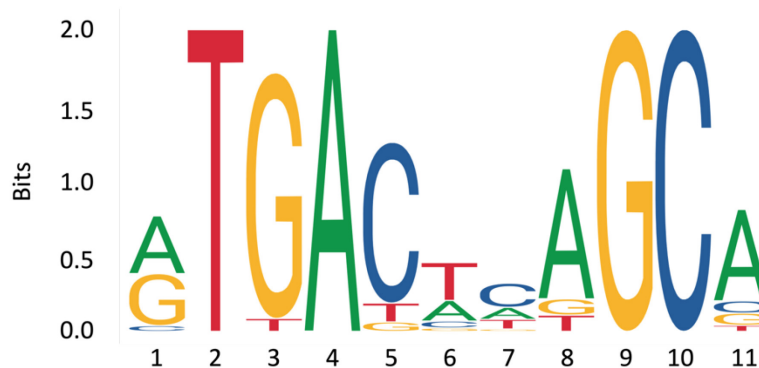


Abbildung 11: Sequenzlogo der ARE Konsensussequenz. Das Sequenzlogo entstammt der JASPAR Datenbank für Transkriptionsfaktor-Bindeprofile (<https://jaspar2018.genereg.net/matrix/MA0150.1>).

Wie aus dem Sequenzlogo zu ersehen ist, sind die Positionen 2, 4, 9 und 10 in allen untersuchten AREs identisch, an Position 3 kommt fast immer ein G (Guanin) vor. Diese Konservierung lässt darauf schließen, dass die Nukleotide an diesen Positionen essenziell für die Bindung von Nrf2 sind, was auch durch Mutationsanalysen bestätigt wurde (Erickson et al., 2002; Wasserman & Fahl, 1997). Eine relativ gute Konservierung weisen zudem die Nukleotide an den Positionen 5, 8 und 11 auf, in denen jeweils ein Nukleotid dominant ist. Beim Design der mutierten Nrf-2 Bindestellen wurden hauptsächlich diese konservierten Nukleotide geändert. Zusätzlich zu den Veränderungen in konservierten Positionen der ARE Konsensussequenz wurden weitere, benachbarte Nukleotide ausgetauscht, für die gezeigt worden war, dass sie die transkriptionelle Grundaktivität oder die Induzierbarkeit beeinträchtigen (Erickson et al., 2002; Wasserman & Fahl, 1997). Die Sequenz der so mutierten AREs ist in Abbildung 12 dargestellt.

```

5'-agctTAGCTTGGAAATGACATTGCTAATGcTagCAAAtttACTTTAGCTTGGAAATGACATTGCTAATGcTagAAAttACTTT-3'
3'-ATCGAACCTTTACTGTAACGATTACgAtcGTTTaaaTGAAAATCGAACCTTTACTGTAACGATTACgAtcGTTTaaaTGAAAActag-5'

```

Abbildung 12: Sequenz des doppelsträngigen Oligonukleotids mit zwei Kopien des mutierten AREs aus dem Maus Glutathion-S-Transferase, alpha 1 (Ya) Promotor. Die Sequenz zeigt die beiden mutierten AREs, gelb bzw. grün unterlegt. Rot markierte Nukleotide symbolisieren konservierte Positionen in der in Abbildung 11 gezeigten ARE Konsensussequenz und kleingeschriebene Nukleotide stellen die Mutationen dar. Die an den 5'-Enden gezeigten Einzelstrangüberhänge sind kompatibel mit den durch Verdau von pTATA LUC+ mit HinDIII und BamHI generierten Überhängen.

### 3.2 Klonierung der Luziferase-Reportervektoren mit unveränderten und mutierten AREs

Die Luziferase-Reportervektoren wurden durch Insertion der doppelsträngigen Oligonukleotide mit den unveränderten bzw.- mutierten AREs (Abbildung 10 und Abbildung 12)

zwischen die *HindIII*- und *BamHI*-Restriktionsstellen 5' zu dem Minimalpromotor in pTATA LUC+ generiert (Abbildung 13).

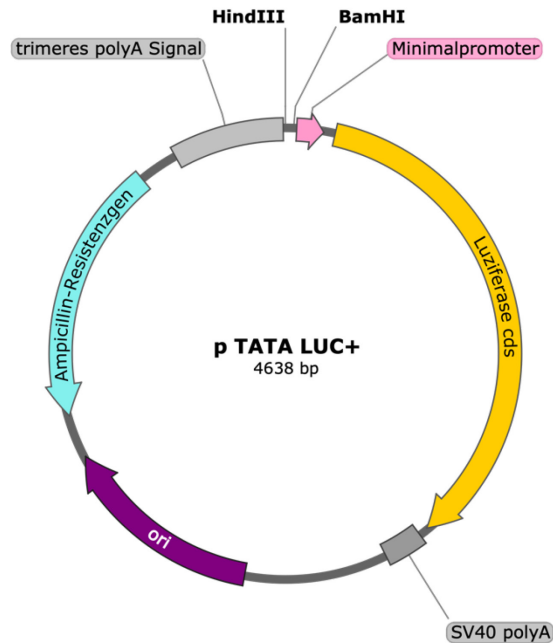


Abbildung 13: **Luziferase Reportervektor pTATA LUC+** mit den Restriktionsschnittstellen für die Insertion der **ARE-Oligonukleotide**. Die Abbildung zeigt den bestehenden Vektor pTATA LUC+ mit, den für die Klonierung relevanten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI*. Die Plasmidkarte wurden mit SnapGene Viewer erstellt. Luziferase cds: kodierende Sequenz für die *Photinus pyralis* Luziferase, SV40 polyA: Affenvirus (Simian Virus) 40 Polyadenylierungssignal, ori: Replikationsursprung, trimeres polyA Signal: 3 Kopien des Polyadenylierungssignal aus dem Affenvirus (Simian Virus) 40.

Hierzu wurden 10 µg des Luziferase-Reportervektors pTATA LUC+ mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* verdaut. Der Verdau wurde auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft (Abbildung 14).

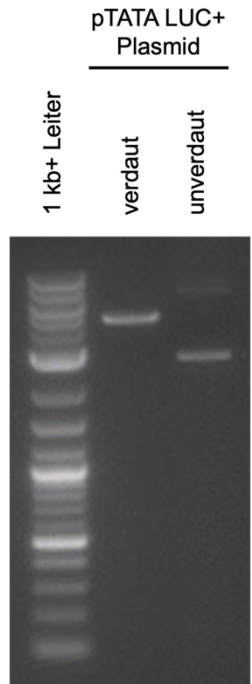


Abbildung 14: **Analytisches Gel des Restriktionsverdaus.** Das pTATA LUC+ Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut. 100 ng des verdauten Plasmids wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zum Vergleich wurden 100 ng des unverdauten Plasmids pTATA LUC+ daneben aufgetragen. Als Größenstandard wurde parallel dazu die GeneRuler 1 kb plus DNA-Leiter (1 kb+ Leiter) geladen.

Das verdaute Plasmid ergibt ein DNA-Fragment bei der erwarteten Größe von ca. 4,6 kbp, das sich im Laufverhalten deutlich von dem ungeschnittenen Plasmid unterscheidet. Das durch den Restriktionsverdau ausgeschnittene Fragment ist im Agarosegel nicht sichtbar, da es mit 30 bp zu klein ist, um ausreichend mit Ethidiumbromid angefärbt zu werden. Damit bleibt die Möglichkeit bestehen, dass nur eines der beiden Restriktionsenzyme das Plasmid geschnitten hat. Nichtsdestotrotz wurde das verdaute Plasmid als Vektorrückgrat für weitere Experimente verwendet.

Zur Reinigung des Vektorrückgrats wurde der Rest des verdauten Plasmids auf ein 1 %iges präparatives Agarosegel geladen (Abbildung 15).

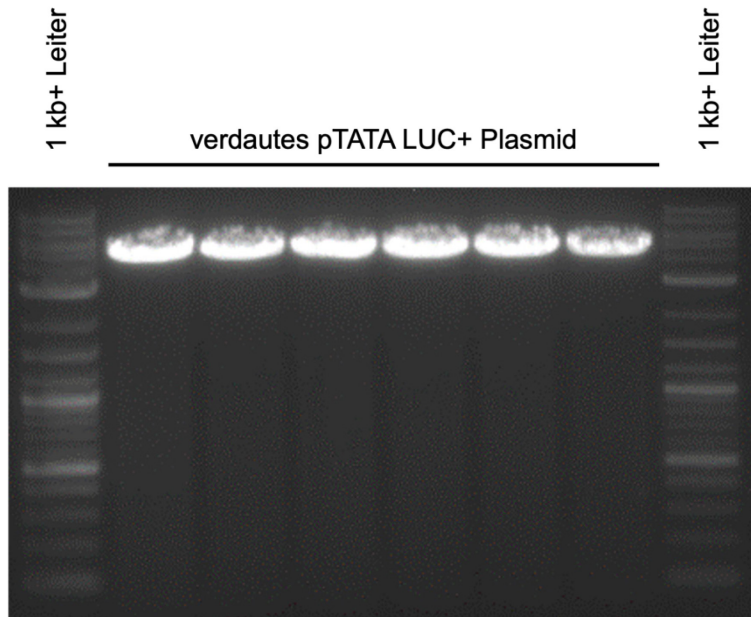


Abbildung 15: **Präparatives Gel für die Extraktion des Vektorrückgrats für die Klonierung.** Der Rest des verdauten pTATA LUC+ Plasmids wurde gleichmäßig auf sechs Spuren verteilt und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde parallel dazu die GeneRuler 1 kb plus DNA-Leiter (1 kb+ Leiter) geladen.

Das ca. 4,6 kbp große Fragment des verdauten pTATA LUC+ Plasmids wurde mit dem „QIAquick® Gel Extraction“ Kit gereinigt. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus dem präparativen Gel ausgeschnitten, die DNA aus jeweils zwei Spuren in einem Mikrozentrifugenröhrchen gepoolt und gewogen. Nach Aufschmelzen in QG Puffer wurden alle Lösungen nacheinander auf eine QIAquick-Spin-Säule aufzentrifugiert und die DNA den Anweisungen des Herstellers gereinigt, die finale Elution erfolgte in 50 µl EB Puffer. Nach einer spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung wurden ca. 80 ng DNA des gereinigten Vektorrückgrats erneut auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, um die Integrität und Reinheit der extrahierten DNA zu überprüfen (Abbildung 16).

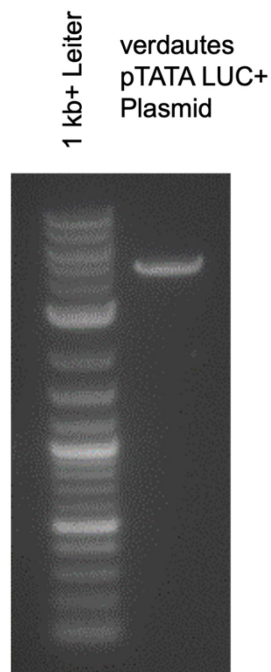


Abbildung 16: **Analytisches Gel des gereinigten Plasmids.** 80 ng des verdauten pTATA LUC+-Rückgrats wurden nach der Gelextraktion auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde parallel dazu die GeneRuler 1 kb plus DNA-Leiter (1 kb+ Leiter) geladen.

Abbildung 16 zeigt nur ein DNA-Fragment bei der erwarteten Größe von ca. 4,6 kbp, was auf ein intaktes DNA-Fragment ohne Verunreinigungen hinweist. Zudem entspricht die Intensität der aufgetragenen Menge des Vektorrückgrats ungefähr der Intensität der helleren Banden des Größenstandards, die 75 bis 80 ng DNA enthalten.

Die Fragmente für die ARE- und mutierten ARE-Bindungsstellen wurden durch *Annealing* der entsprechenden einzelsträngigen Oligonukleotide hergestellt. Dazu wurden jeweils 50 pmol des „top“ und „bottom“ Oligonukleotids (siehe Tabelle 6) des entsprechenden ARE-Motivs in einem Endvolumen von 30 µl MyTaq Reaktionspuffers gemischt und eine erste Denaturierung bei 95 °C für 5 min durchgeführt. Danach folgten fünf Zyklen mit einer Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden und einem *Annealing*-Schritt bei 40 °C für 30 Sekunden, um die doppelsträngigen Oligonukleotide mit überhängenden 5'-Enden zu erzeugen, die mit den Restriktionsstellen des Vektorrückgrats kompatibel sind. Um eine spätere Selbstligation auszuschließen, wurden die Oligonukleotide nicht phosphoryliert. Für die Ligation wurde ein 15-facher molarer Überschuss der doppelsträngigen ARE-Oligonukleotide und jeweils 100 ng des gereinigten pTATA LUC+ Vektorrückgrats eingesetzt, mit DNase-freiem Wasser auf 5 µl aufgefüllt und 5 µl des Blunt/TA-Ligase-Mastermixes zugegeben. 4 µl des Ligationsansatzes wurden nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in 50 µl kompetente NEB5alpha *E.coli* transformiert. Parallel wurde eine Kontrollligation des Vektorrückgrats ohne Oligonukleotide zur Abschätzung einer möglichen Selbstligation des Vektorrückgrats durchgeführt, die stattfinden würde, wenn nur eines der Restriktionsenzyme bei der Vorbereitung des Vektorrückgrats geschnitten haben sollte. Da bei den Ansätzen mit den Ligationen mit den Oligonukleotiden wesentlich mehr Bakterienkolonien erhalten wurden als nach Transformation der Kontrollligation, wurden jeweils sechs Kolonien für jeden der beiden Ansätze mit den intakten (ARE) bzw. mutierten AREs (AREmut) zum Animpfen von Kulturen für die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA genutzt. Die DNA-Isolierung wurde wie unter Kapitel 2.2.1.7 beschrieben durchgeführt. Nach Messung der DNA-Konzentration

wurden 900 ng jedes Plasmids mit dem Restriktionsenzym *HincII* verdaut und auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert. Als Fragmentmuster wurden 2521 bp, 1361 bp, 510 bp und 302 bp erwartet. Zum Vergleich wurde die gleiche Menge des Ausgangsvektors pTATA LUC+ verdaut und parallel dazu aufgetragen, wobei sich das hierbei erhaltene Fragmentmuster mit 2521 bp, 1366 bp, 510 bp, 159 bp und 87 bp von den neu generierten Plasmiden unterscheidet (Abbildung 17).

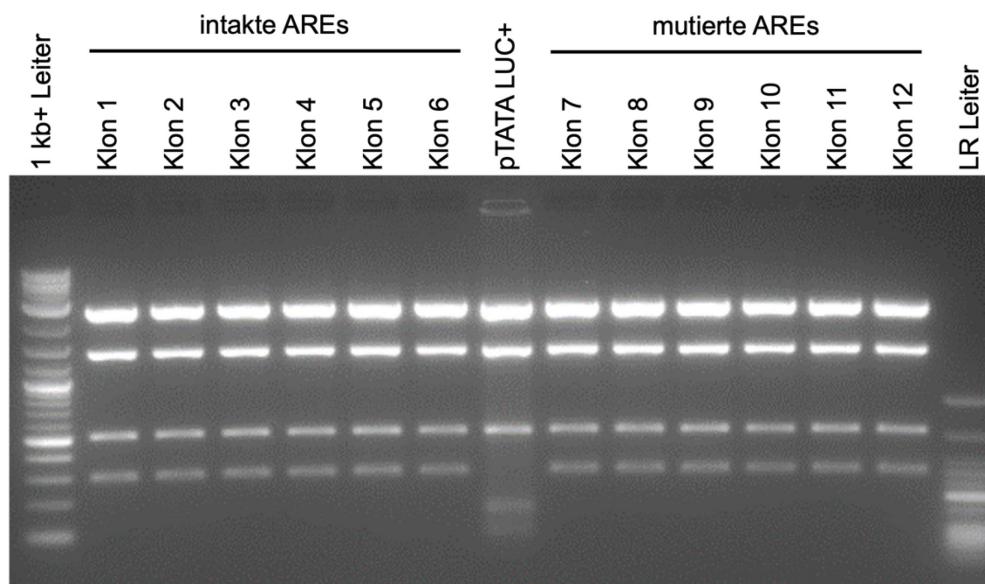


Abbildung 17: **Analytisches Gel des Restriktionsverdaus.** 900 ng der zwölf isolierten Plasmide und pTATA LUC+ wurden mit dem Restriktionsenzym *HincII* verdaut und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmide von Klon 1 bis 6 entstammen der Ligation mit dem Oligonukleotid mit intakten AREs, die Plasmide von Klon 7 bis 12, der Ligation mit dem Oligonukleotid mit mutierten AREs. Zum Vergleich wurden 900 ng des identisch verdauten Plasmids pTATA LUC+ aufgetragen. Als Größenstandard wurde parallel dazu die GeneRuler 1 kb plus DNA-Leiter (1 kb+ Leiter), sowie die GeneRuler LowRange DNA-Leiter (LR Leiter) geladen.

Alle analysierten Plasmide zeigten das gleiche erwartete Fragmentmuster. Da sich die beiden Plasmide mit den AREs nur in wenigen Nukleotiden unterscheiden und das gleiche Restriktionsfragmentmuster aufweisen, ist es nicht möglich, diese allein anhand einer Agarose-Gelelektrophorese voneinander zu unterscheiden. Deshalb, und um Fehler in den Sequenzen der ARE-Oligonukleotide auszuschließen, wurden drei Klone jedes Plasmids mit dem Primer *HSVtk rev1* sequenziert.

Der Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit den *in silico* erstellten Sequenzvorhersagen bestätigte, dass alle Plasmide die gewünschten Sequenzen aufwiesen. Die Klone eins und sieben wurden als p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+ bzw. p(AREmut)<sub>2</sub>TATA LUC+ bezeichnet (Abbildung 18).

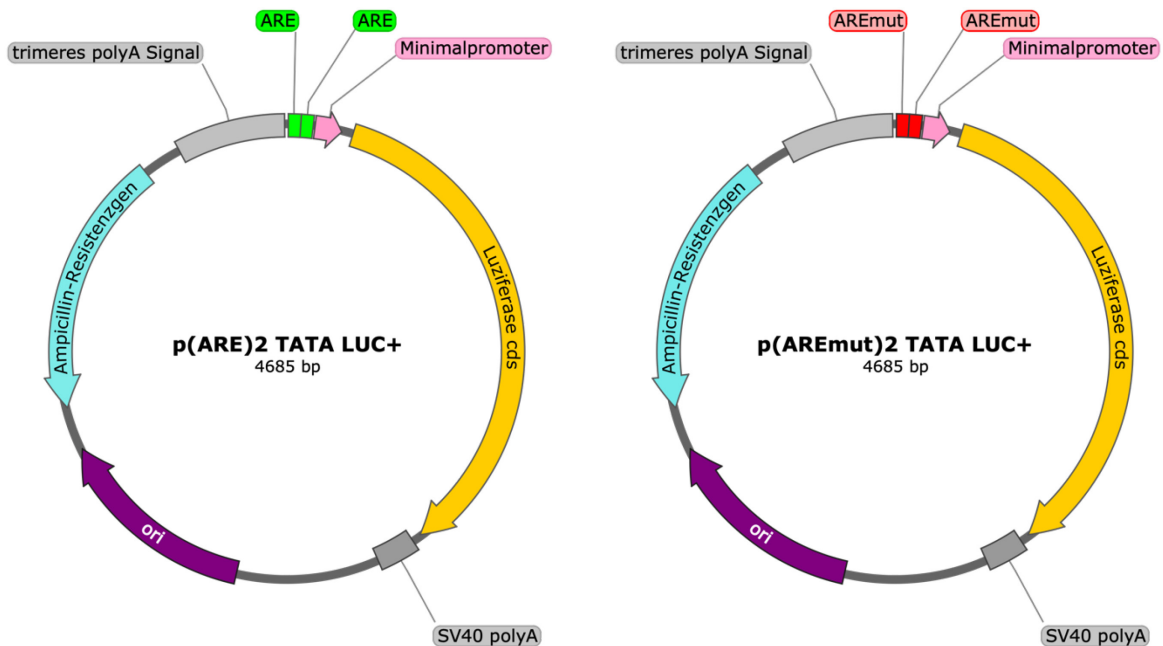
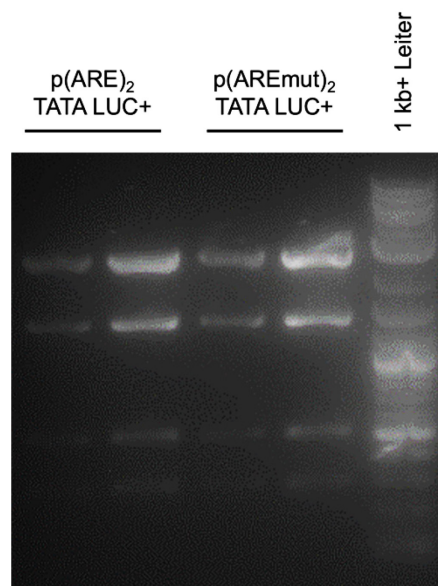


Abbildung 18: **Luziferase-Reporter-Vektoren mit AREs.** Die Abbildung zeigt die Plasmide,  $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}^+$  und  $p(\text{AREmut})_2\text{TATA LUC}^+$ . Die Plasmidkarten wurden mit SnapGene Viewer erstellt. Luziferase cds: kodierende Sequenz für die *Photinus pyralis* Luziferase, SV40 polyA: Affenvirus (Simian Virus) 40 Polyadenylierungssignal, ori: Replikationsursprung, trimeres polyA Signal: 3 Kopien des Polyadenylierungssignalaus dem Affenvirus (Simian Virus) 40, AREmut: mutiertes ARE

Sie wurden anschließend verwendet, um größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA zu isolieren. Um die Identität der isolierten Plasmide zu überprüfen und potenzielle Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ein Restriktionsverdau mit *HincII* mit 1  $\mu\text{g}$  der Plasmide durchgeführt und jeweils 0,8  $\mu\text{g}$  und 0,2  $\mu\text{g}$  auf einem 1 %-igen Agarosegel analysiert (Abbildung 19).



*Abbildung 19: Analytisches Gel des Restriktionsverdaus der gereinigten Luziferase Reporterplasmide. Je 1 µg der Plasmide p(ARE)<sub>2</sub> TATA LUC+ und p(AREmut)<sub>2</sub> TATA LUC+ wurden mit dem Restriktionsenzym HincII verdaut. Jeweils 0,2 µg und 0,8 µg der verdauten Plasmide wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde parallel dazu die GeneRuler 1 kb plus DNA-Leiter (1 kb+ Leiter) aufgetragen.*

Abbildung 19 zeigt das 1 %ige analytische Gel mit dem erwarteten Fragmentmuster der Plasmide; zudem ist keine Kontamination mit genomischer DNA erkennbar. Daher wurden die Reportervektoren p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+ und p(AREmut)<sub>2</sub>TATA LUC+ für weitere Experimente verwendet.

### 3.3 Testung des Nrf2-abhängigen Reportergensystems

Um die Funktionalität des eigens hergestellten Luziferase-Reportersystems zu untersuchen, wurde das Nrf2-spezifische Reporterkonstrukt (p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+) oder das Reporterkonstrukt der Nrf2-Spezifitätskontrolle (p(AREmut)<sub>2</sub>TATA LUC+) mit einem Nrf2-Expressionsvektor (pCMV myc-hNRF2 wt) in humane Endothelzellen co-transfiziert. Dafür musste zunächst die minimale Menge des Nrf2-Expressionsvektors für die Transfektion ermittelt werden, bei der Nrf2 nachweisbar und potenziell aktiv ist. Dies sollte nur dann möglich sein, wenn die Menge an endogenem Keap1 nicht ausreicht, um alle Nrf2 Moleküle zu binden und damit dem proteasomalen Abbau zugänglich zu machen. Zu diesem Zweck wurde ein Vorversuch durchgeführt, in dem verschiedene Mengen, zwischen 0,5 µg und 0,01 µg, des bereits im Labor vorliegenden Nrf2-Expressionsvektors pCMV myc-hNRF2 wt in EZs transfiziert wurden. Um die für die Transfektionen in den 6 Well Kulturplatten erforderliche Gesamtmenge an DNA (1,0 µg pro Well) zu erhalten, wurde jeweils mit dem Leervektor pcDNA3.1 aufgefüllt. Die Expression und Lokalisation von Nrf2 wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das myc-Tag am N-Terminus des auf dem Plasmid kodierten Nrf2-Proteins untersucht (Abbildung 20).

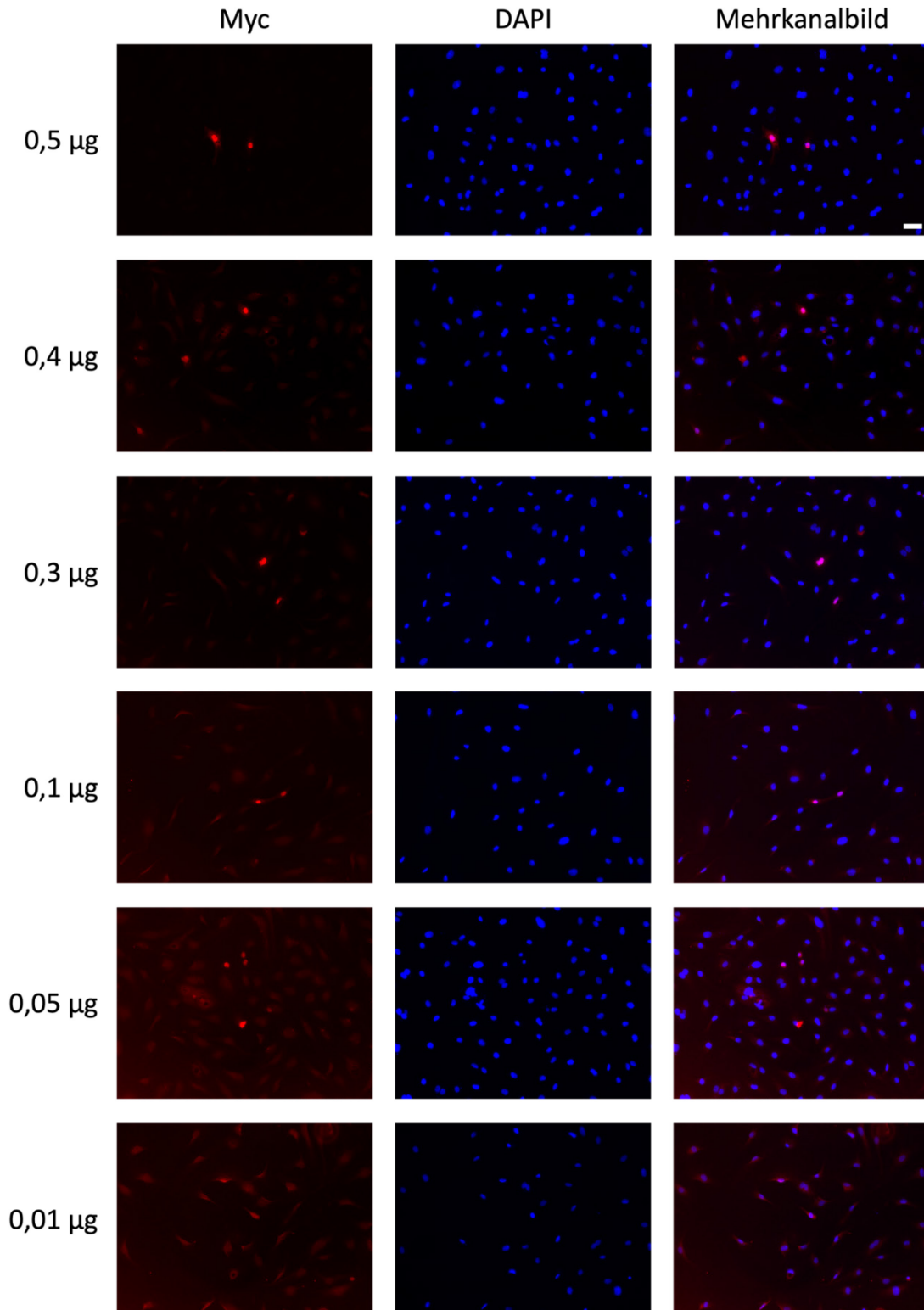


Abbildung 20: *Nrf2*-Expression in humanen Endothelzellen nach Titration des *Nrf2*-Expressionsvektors. Humane Endothelzellen wurden mit abnehmenden Mengen des *Nrf2*-Expressionsvektors pCMV myc-hNRF2 wt transfiziert, wobei jeweils mit dem Leervektor auf die für eine Transfektion notwendige Gesamtmenge aufgefüllt wurde. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die *Nrf2*-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Zellkerne wurden mit DAPI

gegengefärbt. Einzelkanäle: Myc (myc-Nrf2, rot), DAPI (Zellkerne, blau); Mehrkanalbild: Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu\text{m}$  an.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, lässt sich in den Endothelzellen bei allen Mengen des transfizierten Nrf2-Expressionsvektors ein Myc Signal nachweisen, was die Expression von Nrf2 bestätigt. Zudem ist auch nach Transfektion der geringsten Menge des Expressionsvektors exogenes Nrf2 im Zellkern lokalisiert, was als erstes Indiz für die Aktivierung von Nrf2 gewertet werden kann. Basierend hierauf wurde in der Folge mit 0,01  $\mu\text{g}$  des Nrf2-Expressionsvektors gearbeitet.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Luziferase-Reportersystems wurde ein weiteres Pilotexperiment durchgeführt in dem die hergestellten Reporterkonstrukte p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+ und p(AREmut)<sub>2</sub>TATA LUC+ mit einem Leervektor oder dem Nrf2-Expressionsvektor co-transfiziert wurden. Die Transfektion erfolgte in 6 cm Zellkulturschalen. Dabei wurden 0,01  $\mu\text{g}$  des Nrf2-Expressionsvektors sowie 0,25  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Luziferase-Reportervektors eingesetzt. Die restliche DNA-Menge wurde durch Zugabe eines Leervektors ergänzt, sodass eine Gesamtmenge von 2,5  $\mu\text{g}$  DNA pro 6 cm Zellkulturschale erreicht wurde. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Luziferaseaktivität wurde in den Lysaten bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf die Aktivität in Lysaten von Zellen normiert, die mit dem Reporterkonstrukt, welches die intakten AREs enthält (p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+) und einem Leervektor anstelle des Nrf2-Expressionsvektors co-transfiziert worden waren, da dies die basale Aktivität von endogenem Nrf2 in den Zellen widerspiegeln sollte (Abbildung 21).

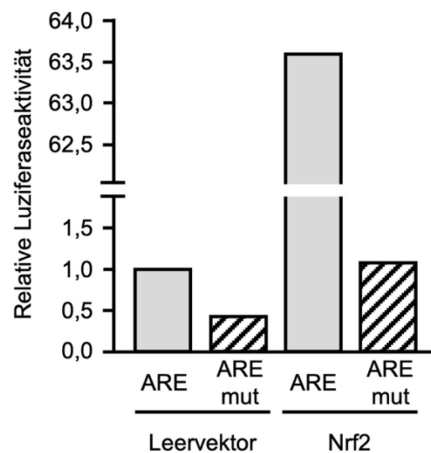


Abbildung 21: **Pilotexperiment zur Spezifität des Nrf2-abhängigen Luziferase-Reportersystem.** Humane Endothelzellen wurden mit den Reporterkonstrukten p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+ (einfarbige Balken, ARE) oder p(AREmut)<sub>2</sub>TATA LUC+ (schraffierte Balken, AREmut) und einem Leervektor oder dem Nrf2-Expressionsvektor (Nrf2) co-transfiziert und die Luziferaseaktivität in Lysaten der Zellen bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus technischen Doppelmessungen. Der Mittelwert der Aktivität in Lysaten von Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+ und dem Leervektor co-transfiziert wurden, wurde auf 1 gesetzt.

Da es sich bei diesem Pilotexperiment um ein einzelnes Experiment handelt, können keine quantitativ exakten Aussagen getroffen werden. Abbildung 21 zeigt in Abwesenheit von exogenem Nrf2 eine messbare Luziferaseaktivität in Zellen die mit dem Reporterkonstrukt, welches die intakten AREs enthält (p(ARE)<sub>2</sub>TATA LUC+) und Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt, welches die mutierten AREs enthält (p(AREmut)<sub>2</sub>TATA LUC+), transfiziert wurden. Diese messbare Luziferaseaktivität lässt sich auf die basale Aktivität des Minimalpromotors zurückführen. In Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt mit den intakten AREs und dem Nrf2-Expressionsvektor co-transfiziert wurden, ist ein deutlicher Anstieg

der Luziferaseaktivität zu erkennen. Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt mit den mutierten AREs und dem Nrf2-Expressionsvektor co-transfiziert wurden, zeigen eine ähnliche Luziferaseaktivität wie die Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt mit den intakten AREs und dem Leervektor co-transfiziert wurden. Diese Daten zeigen, dass exogenes Nrf2 die Transkription des Luziferase-Reporters mit den intakten AREs aktivieren kann. Zudem ist diese Transkriptionsaktivierung sequenzspezifisch, da dieser Effekt bei Verwendung des Reporterkonstrukts mit den mutierten AREs nicht auftritt. Damit kann das Reportersystem auch zum Nachweis der Aktivität von endogenem Nrf2 eingesetzt werden.

### 3.4 Regulation der transkriptionellen Aktivität von Nrf2 durch Curcumin

Nach Validierung des Luziferase-Reportersystems wurde der Einfluss von Curcumin auf die transkriptionelle Aktivität von endogenem Nrf2 untersucht. Zu diesem Zweck wurden humane Endothelzellen mit dem Reporterkonstrukt, welches die intakten AREs enthält und dem Reporterkonstrukt, welches die mutierten AREs enthält, transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 6 cm Zellkulturschalen unter Verwendung von 0,25 µg des jeweiligen Luziferase-Reportervektors sowie 2,25 µg eines Leervektors, um eine Gesamtmenge DNA von 2,5 µg pro Schale zu gewährleisten. Zusätzlich wurden die Zellen über einen Zeitraum von 20 Stunden mit 7,5 µM Curcumin oder dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle behandelt, bevor die Luziferaseaktivität in Lysaten gemessen wurde (Abbildung 22).

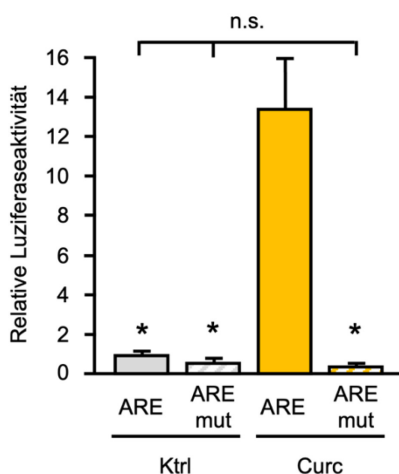


Abbildung 22: **Einfluss von Curcumin auf die transkriptionelle Aktivität von Nrf2.** Humane Endothelzellen wurden mit den Reporterkonstrukten  $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}+$  (einfarbige Balken, ARE) oder  $p(\text{AREmut})_2\text{TATA LUC}+$  (schraffierte Balken, ARE mut) transfiziert und 20 Stunden lang mit DMSO als Kontrolle (Ktrl) oder mit 7,5 µM Curcumin (Curc) behandelt, bevor die Luziferaseaktivität in Lysaten der Zellen bestimmt wurde. Der Mittelwert der Aktivität in Lysaten von Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt  $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}+$  transfiziert und mit DMSO behandelt wurden, wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=7$ ; \* $p<0,05$  vs. ARE/Curc; one-way ANOVA mit post hoc Tukey Test; n.s.=nicht signifikant).

Abbildung 22 zeigt eine mehr als zehnfache Steigerung der Luziferaseaktivität durch Curcumin, wenn das Reporterkonstrukt, welches die intakten AREs enthält, transfiziert wurde. Demgegenüber wurde ein solcher Effekt nicht beobachtet, wenn das Reporterkonstrukt mutierte AREs enthält, da Nrf2 an diese Elemente nicht binden kann. Aus den Daten geht eindeutig hervor, dass Curcumin die transkriptionelle Aktivität von endogenem Nrf2 signifikant erhöht.

In einer früheren Studie konnte ich zeigen, dass die hier verwendete Curcuminkonzentration in humanen Endothelzellen die Translokation von endogenem Nrf2 in den Zellkern induziert und in der Folge zu einer erhöhten Expression der Mangan-Superoxid-Dismutase führt (Brinkmann et al., 2022). Diese Effekte wurden unter Bedingungen beobachtet, bei denen die Zellen ausschließlich mit Curcumin behandelt, jedoch nicht transfiziert wurden. Vor diesem Hintergrund wurde nun untersucht, ob vergleichbare Effekte auch nach Transfektion der Zellen mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben jedoch mit dem Unterschied, dass die Plasmidmenge an die verwendeten 6 Well Kulturplatten angepasst wurde, mit 0,1  $\mu\text{g}$  des Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukts und 0,9  $\mu\text{g}$  eines Leervektors co-transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgte eine Behandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin oder mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle über einen Zeitraum von 20 Stunden. Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von Nrf2 wurde eine Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines primären Anti-Nrf2-Antikörpers sowie eines entsprechenden Fluorophor-konjugierten Sekundärintikörpers durchgeführt. Als Negativkontrolle für das Färbeverfahren wurden unbehandelte Zellen verwendet, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers auszuschließen (Abbildung 23).

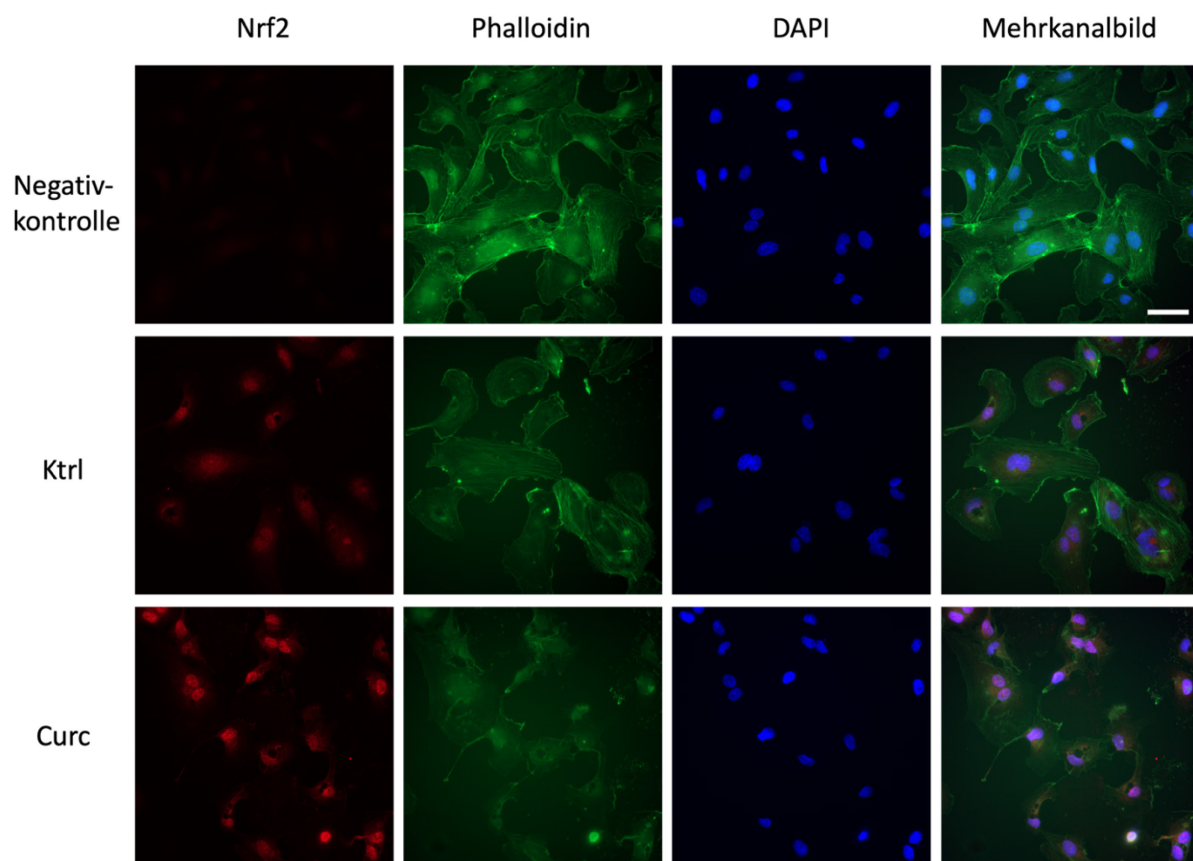


Abbildung 23: **Curcumin-induzierte Nrf2-Kerntranslokation nach Transfektion mit einem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt.** Humane Endothelzellen wurden mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt ( $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}+$ ) transfiziert und 20 Stunden mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin (Curc) bzw. DMSO (Ktrl) als Lösungsmittelkontrolle behandelt, bevor die Nrf2-Lokalisation mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert wurde. Zellkerne wurden mit DAPI, das Aktin-Zytoskelett

mit Phalloidin gegengefärbt. Die obere Reihe (Negativkontrolle) zeigt eine Färbung von unbehandelten Zellen, bei der der primäre Antikörper weggelassen wurde. Einzelkanäle: Nrf2 (rot), Phalloidin (Aktin-Zytoskelett, grün), DAPI (Zellkerne, blau); Mehrkanalbild: Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu\text{m}$  an.

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, ist die Nrf2-Färbung spezifisch, da kein Signal erhalten wurde, wenn der Anti-Nrf2 Antikörper weggelassen wurde (Negativkontrolle). Darüber hinaus liefert die Färbung einen klaren Beweis dafür, dass die Transfektion mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt keinen Einfluss auf die Curcumin-induzierte Anreicherung von Nrf2 im Zellkern hat.

Des Weiteren wurde die Hochregulation der MnSOD, einem *bona fide* Zielgen von Nrf2, unter den Voraussetzungen einer Transfektion mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt und einer Behandlung mit Curcumin untersucht. Um die gleichen Bedingungen wie beim Luziferase-Reportersystem zu gewährleisten, wurden humane Endothelzellen in 6 cm Zellkulturschalen mit 0,25  $\mu\text{g}$  des Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt und 2,25  $\mu\text{g}$  des Leervektors co-transfiziert und mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin behandelt. Im Anschluss wurde ein Immunoblot durchgeführt und eine semi-quantitative Analyse der gescannten Röntgenfilme vorgenommen (Abbildung 24).

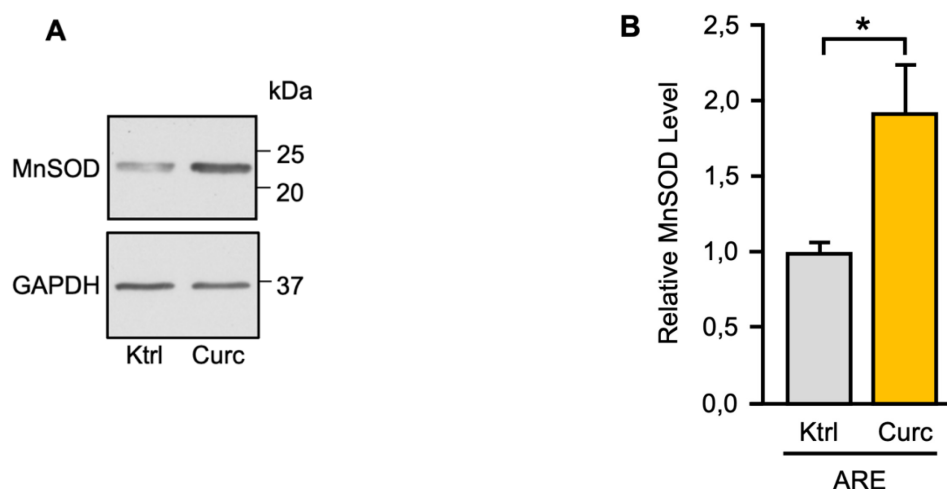


Abbildung 24: **Curcumin-induzierte Hochregulation von MnSOD nach Transfektion mit einem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt.** Humane Endothelzellen wurden mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt ( $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}+$ ) transfiziert und 20 Stunden mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin (Curc) bzw. DMSO (Ktrl) als Lösungsmittelkontrolle behandelt, bevor die Zellen lysiert und MnSOD (22 kDa) sowie GAPDH (36 kDa, als Ladekontrolle) mittels Immunoblot nachgewiesen wurden. **(A) Repräsentativer Immunoblot.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse von MnSOD.** Der Mittelwert des MnSOD Levels in den mit DMSO behandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=4$ ;  $*p<0,05$  vs. Ktrl; zweiseitiger, gepaarter t-Test).

Wie in Abbildung 24 dargestellt, resultiert die Behandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin in einer signifikanten Zunahme der MnSOD-Proteinmenge. Die durchgeführten Untersuchungen belegen, dass eine Curcuminkonzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  sowohl eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 als auch eine Induktion des nachgeschalteten Zielgens MnSOD hervorruft, welche durch eine Transfektion der Zellen mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstruktes nicht beeinflusst wird.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Curcumin die transkriptionelle Aktivität von endogenem Nrf2 in Endothelzellen erhöht, sollte in der Folge untersucht werden, ob der zweite Pflanzeninhaltsstoff, Koffein, einen Einfluss auf die Nrf2-Aktivität hat.

### 3.5 Effekt von Koffein auf die Nrf2-Aktivität in Endothelzellen

In vorangegangenen Arbeiten war bereits gezeigt worden, dass Koffein verschiedene Parameter in unterschiedlichen Zellen des kardiovaskulären Systems verbessert, indem es sowohl die Aktivität von Komplex I der Atmungskette in Herzmitochondrien als auch die migratorische Kapazität von Endothelzellen erhöht und die Myofibroblastendifferenzierung kardialer Fibroblasten unterstützt (Ale-Agha et al., 2018). Da die Funktionalität von Endothelzellen eng mit einer intakten Redoxhomöostase verknüpft ist, stellte sich die Frage, ob Koffein diese möglicherweise auch, z.B. über die Aktivierung von Nrf2, beeinflussen kann.

Um dies zu untersuchen, wurden initial Kurzzeitexperimente durchgeführt, in denen eine Koffeinkonzentration verwendet wurde, die in früheren Untersuchungen als ausreichend für die Verbesserung endothelialer Zellfunktionen beschrieben worden war (Spyridopoulos et al., 2008). Die Versuche orientierten sich methodisch an den im vorherigen Kapitel beschriebenen Untersuchungen zur Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität von Nrf2 durch Curcumin. Endothelzellen wurden hierzu zunächst in 6 cm Zellkulturschalen mit 0,25 µg der beiden verschiedenen Luziferase-Reportervektoren sowie 2,25 µg eines Leervektors transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µM Koffein für 18 Stunden behandelt. In den Lysaten wurde dann die Luziferaseaktivität gemessen, um Rückschlüsse auf die Nrf2-abhängige Transkriptionsaktivierung zu erhalten (Abbildung 25).

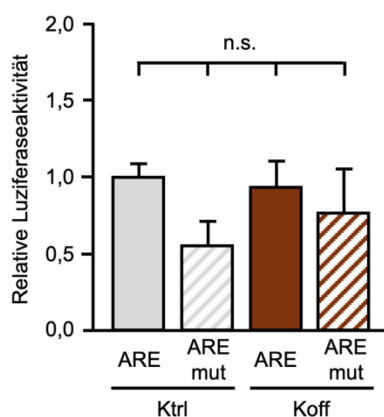


Abbildung 25: **Einfluss von Koffein auf die transkriptionelle Aktivität von Nrf2.** Humane Endothelzellen wurden mit den Reporterkonstrukten  $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC+}$  (einfarbige Balken, ARE) oder  $p(\text{AREmut})_2\text{TATA LUC+}$  (schraffierte Balken, ARE mut) transfiziert und 18 Stunden lang mit 50 µM Koffein (Koff) behandelt, bevor die Luziferaseaktivität in Lysaten der Zellen bestimmt wurde. Als Kontrolle (Ktrl) blieben die Zellen unbehandelt. Der Mittelwert der Aktivität in Lysaten von Zellen, die mit dem Reporterkonstrukt  $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC+}$  transfiziert und nicht behandelt wurden, wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=7$ ; one-way ANOVA mit post hoc Tukey Test; n.s.=nicht signifikant).

Abbildung 25 zeigt, dass die Kurzzeitbehandlung mit Koffein die Transkription des Reportergens nicht induziert, was bedeutet, dass Koffein keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 hat.

Die transkriptionelle Aktivierung von Nrf2-Zielgenen basiert auf der Stabilisierung und anschließenden Translokation von Nrf2 in den Zellkern, wo es als Heterodimer mit kleinen Maf-Proteinen an AREs in

den Promotorregionen seiner Zielgene bindet. In den Versuchen mit den Luziferase-Reporterplasmiden wird allerdings nur der Endpunkt dieser separaten Prozesse, d.h. die Nrf2-abhängige Transkriptionsaktivierung nachgewiesen. Somit lassen die Ergebnisse noch keinen Rückschluss darauf zu, ob Koffein auch nicht in der Lage ist die Stabilisierung und den Kernimport zu induzieren. Daher wurde zusätzlich die Menge und intrazelluläre Verteilung von Nrf2 untersucht. Um die Bedingungen identisch zu den Versuchen, in denen die Luziferaseexpression gemessen wurde, konstant zu halten wurden die Zellen in 6 Well Kulturplatten mit 0,1 µg des Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukts mit den nicht mutierten AREs und 0,9 µg eines Leervektors co-transfiziert und für 18 Stunden mit 50 µM Koffein behandelt. Allerdings wurde nun Nrf2 mittels Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines primären Anti-Nrf2-Antikörpers sowie eines entsprechenden Fluorophorkonjugierten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Als Negativkontrolle für das Färbeverfahren wurden unbehandelte Zellen verwendet, bei deren Färbung der primäre Antikörper weggelassen wurde, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers auszuschließen (Abbildung 26).

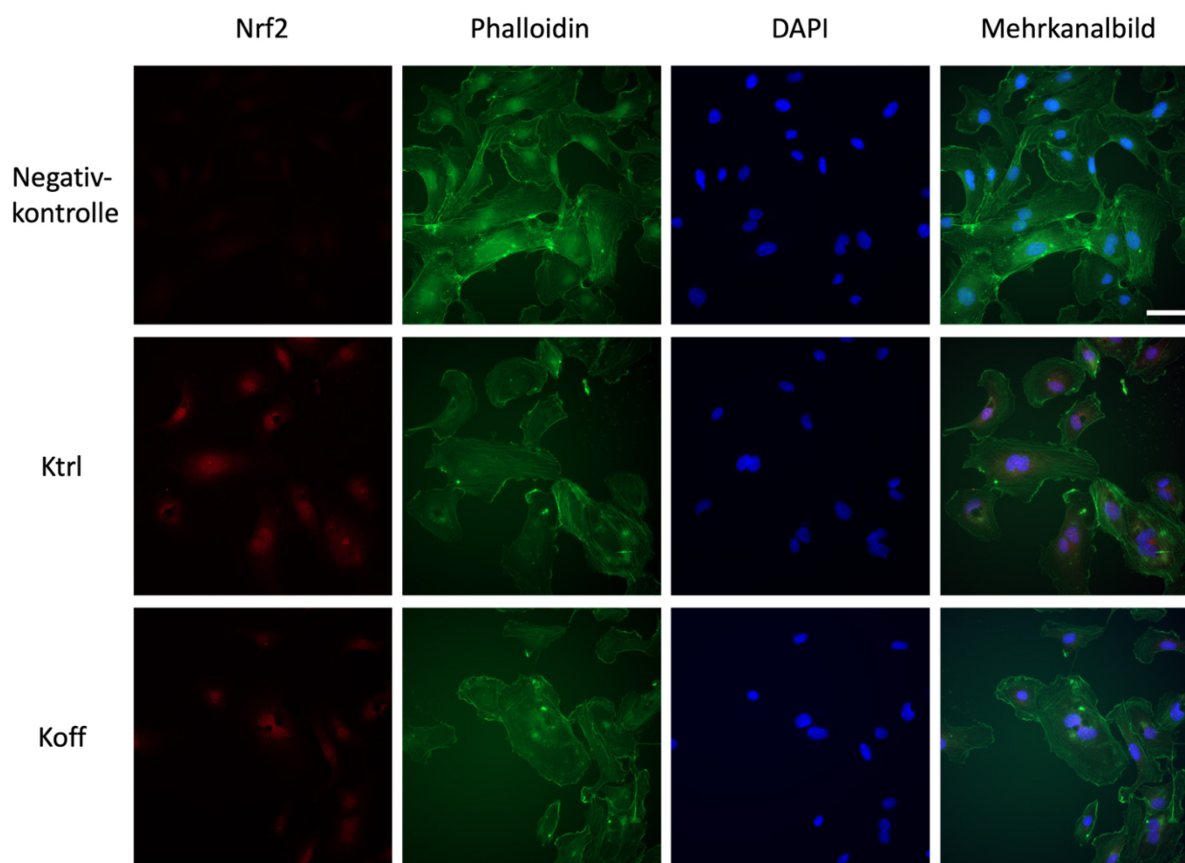


Abbildung 26: **Einfluss von Koffein auf die Lokalisierung von Nrf2 in Endothelzellen.** Humane Endothelzellen wurden mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt ( $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}+$ ) transfiziert und 18 Stunden mit 50 µM Koffein (Koff) behandelt. Als Kontrolle (Ktrl) blieben die Zellen unbehandelt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Nrf2-Lokalisation mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Zellkerne wurden mit DAPI, das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin gegengefärbt. Die obere Reihe (Negativkontrolle) zeigt eine Färbung von unbehandelten Zellen, bei der der primäre Antikörper weggelassen wurde. Einzelkanäle: Nrf2 (rot), Phalloidin (Aktin-Zytoskelett, grün), DAPI (Zellkerne, blau); Mehrkanalbild: Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 50 µm an.

Das Fehlen eines Signals in der Negativkontrolle, bei der während der Färbung nur der Sekundäntikörper verwendet wurde, weist auf eine spezifisch durchgeführte Färbung hin. Die Abbildung 26 zeigt, dass Koffein keine Stabilisierung von Nrf2 über das basale Niveau hinaus bewirkt, da es zu keiner Akkumulation im Zytoplasma kommt. Zudem ist auch kein stärkeres Fluoreszenzsignal in den Zellkernen zu erkennen, was eindeutig zeigt, dass es auch nicht zu einem verstärkten Transport in den Zellkern kommt. Daraus folgt, dass auch die initialen Aktivierungsschritte von Nrf2, nämlich Stabilisierung und Kerntranslokation, nicht durch Koffein beeinflusst werden.

Auch wenn Koffein, anders als Curcumin, Nrf2 nicht aktivieren kann, könnte es neben der Verbesserung der Atmungskettenfunktion (Ale-Agha et al., 2018) möglicherweise auch die Redoxhomöostase in den Mitochondrien aufrechterhalten und so zusätzlich zur Verhinderung von Endotheldysfunktion beitragen. Daher wurde abschließend die Regulation von MnSOD, einem der zentralen antioxidativen Enzyme von Mitochondrien, durch Koffein untersucht, da dessen Expression nicht nur durch Nrf2, sondern auch durch andere Signalwege reguliert werden kann (Kim et al., 2017).

### 3.6 Einfluss von Koffein auf die Mangan-Superoxid-Dismutase

Um zu untersuchen, ob Koffein die Expression von MnSOD beeinflusst, wurden humane Endothelzellen in 6 cm Zellkulturschalen - wiederum um die experimentellen Randbedingungen konstant zu halten - mit 0,25 µg des Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstruktes und 2,25 µg des Leervektors transfiziert und für 18 Stunden mit 50 µM Koffein behandelt. Im Anschluss wurde ein Immunoblot zur Bestimmung der relativen MnSOD-Proteinmenge durchgeführt (Abbildung 27 A), gefolgt von einer semi-quantitativen Analyse der gescannten Röntgenfilme (Abbildung 27 B).

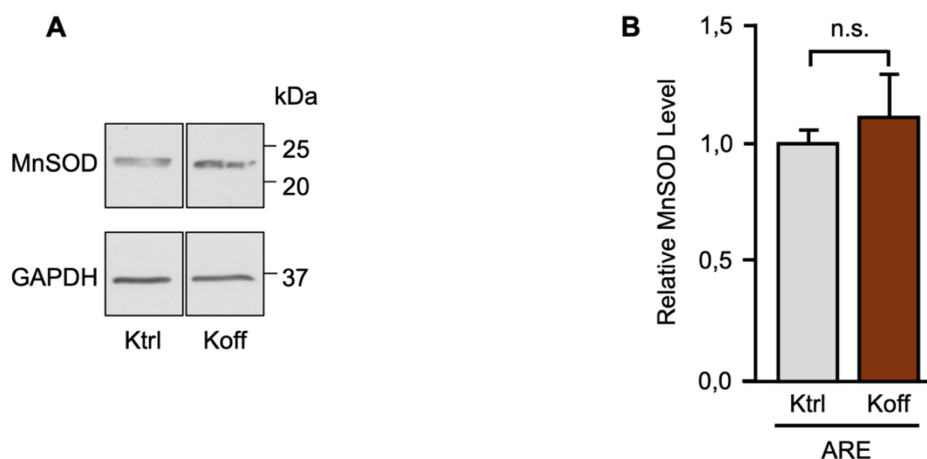


Abbildung 27: **Einfluss von Koffein auf MnSOD in Endothelzellen.** Humane Endothelzellen wurden mit dem Nrf2-spezifischen Luziferase-Reporterkonstrukt ( $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}+$ ) transfiziert und 18 Stunden mit 50 µM Koffein (Koff) behandelt. Als Kontrolle (Ktrl) blieben die Zellen unbehandelt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden MnSOD (22 kDa) und GAPDH (36 kDa), als Ladekontrolle, mittels Immunoblot nachgewiesen. (A) Repräsentativer Immunoblot. Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. (B) Semi-quantitative Analyse der MnSOD Proteinmenge. Der Mittelwert der MnSOD Level in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=4$ ; n.s.=nicht signifikant; zweiseitiger, gepaarter t-Test).

Abbildung 27 zeigt eindeutig, dass die Kurzzeitbehandlung mit Koffein die MnSOD Menge in Endothelzellen nicht verändert. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass Koffein, anders als Curcumin, weder Nrf2 aktivieren noch die MnSOD Menge über andere Signalwege erhöhen kann.

### 3.7 Endothelzellseneszenz

Im Rahmen der zuvor geschilderten Kurzzeitexperimente konnte für Curcumin und Koffein gezeigt werden, dass beide Pflanzeninhaltsstoffe unterschiedliche Aspekte der Endothelzellfunktion positiv beeinflussen. Für Curcumin wurde nach kurzzeitiger Exposition eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von Nrf2 nachgewiesen, was zu einer verbesserten zellulären Redoxhomöostase führt. Für Koffein wurde hingegen keine Aktivierung von Nrf2 beobachtet. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten jedoch gezeigt, dass Koffein andere Funktionsparameter von Endothelzellen verbessert, indem es z.B. deren migratorische Kapazität steigert. Dem zugrunde liegt eine verbesserten Mitochondrienfunktion, die auf einer verstärkten Translokation von p27 in die Mitochondrien beruht. Im Herzen resultiert dies in einer erhöhten Aktivität von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Ale-Agha et al., 2018). Diese Befunde sind insbesondere im Kontext des Alterns relevant, da es sowohl im physiologischen Alterungsprozess als auch in seneszenten Endothelzellen, wie sie in gealterten Gefäßwänden auftreten, nicht nur zu einer Störung der zellulären Redoxhomöostase mit Verschiebung zu einem pro-oxidativen Status, sondern auch zu einer Abnahme der Mitochondrienfunktion kommt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob beide Pflanzeninhaltsstoffe der Induktion der Endothelzellseneszenz entgegenwirken können.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden in unserem Labor etablierte Modelle der vorzeitigen, Stress-induzierten Endothelzellseneszenz eingesetzt. Dafür wurden zwei verschiedene Modelle herangezogen. Zum einen wurde Stress-induzierte Seneszenz durch die Langzeitbehandlung mit niedrigen Dosen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jeden zweiten Tag für zwei Wochen induziert (Goy et al., 2014; Haendeler, Tischler, et al., 2004). Zum anderen wurde eine niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierte Seneszenz durch eine Langzeitbehandlung mit 1 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) jeden zweiten Tag für zwei Wochen hervorgerufen, ein Modell, das erstmalig in unserer Arbeitsgruppe etabliert worden war (Merk et al., 2023). Parallel zur Seneszenzinduktion wurde mit Curcumin oder Koffein behandelt, um deren potenziellen Einfluss auf die Seneszenzinduktion zu untersuchen. Im Vergleich zu den Kurzzeitbehandlungen (siehe Kapitel 3.4 - 3.6) wurden dabei niedrigere Konzentrationen von Curcumin und Koffein eingesetzt, um eine zytotoxische Beeinträchtigung während der verlängerten Inkubationsdauer zu vermeiden.

Für die Experimente wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Zellkulturformate verwendet. Für Analysen der Genexpression sowie der Proteinmenge, wurden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Mikroskopische Analysen erfolgten auf geätzten Deckgläschen in 6 Well Kulturplatten mit einer Zelldichte von 4 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well. Das Medium wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen jeden zweiten Tag gewechselt, über das Wochenende nach drei Tagen. Die Seneszenzinduktion durch oxidativen Stress oder durch niedrig-Dosis Endotoxämie erfolgte durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder LPS zu Endkonzentrationen von 50 µM bzw. 1 ng/ml jeweils zwei Stunden nach dem Mediumwechsel. Als Kontrolle für die LPS-Behandlung wurde detoxifiziertes LPS, d. h. durch alkalische Hydrolyse teilweise delipidiertes LPS desselben *Escherichia coli* (*E.coli*)-Serotyps, in der gleichen Konzentration zugesetzt.

Vier Stunden nach jedem Mediumwechsel wurden die Zellen mit Curcumin oder Koffein in Endkonzentrationen von 500 nM bzw. 10  $\mu$ M behandelt (Abbildung 28).

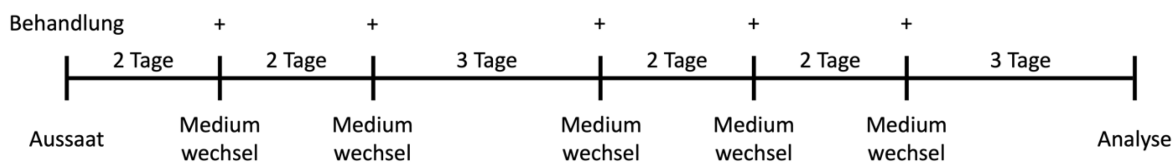
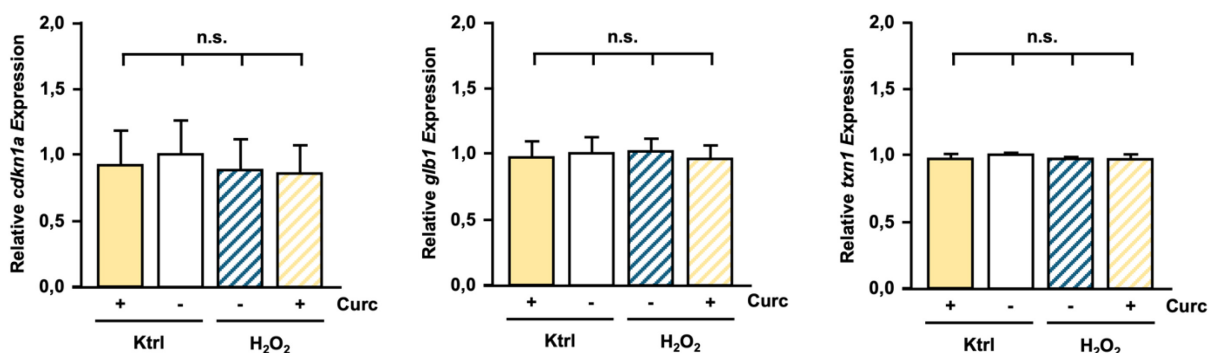


Abbildung 28: **Behandlungsschema für die durch oxidativen Stress oder niedrig-Dosis Endotoxämie induzierte Endothelzellseneszenz.** Schematische Darstellung des Behandlungsschemas. Die Pluszeichen oben zeigen die Zeitpunkte der Behandlung mit 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  oder 1 ng/ml LPS, sowie 500 nM Curcumin oder 10  $\mu$ M Koffein an. Die Kontrolle bei den  $H_2O_2$ -Behandlungen wurde unbehandelt gelassen, bei der Behandlung mit LPS wurde dafür detoxifiziertes LPS genutzt.

### 3.7.1 Einfluss von Curcumin auf die Endothelzellseneszenz

Um zu untersuchen, ob Curcumin der Induktion der Endothelzellseneszenz entgegenwirken kann, wurden zuerst auf Transkriptionsebene die Gene untersucht, die Schlüsselpositionen in der Seneszenz, Redoxhomöostase und Endothelzellfunktion einnehmen. Die Auswahl des Zellzyklusinhibitors p21 (*cdkn1a*), der Seneszenz assoziierten (SA)- $\beta$ -Galaktosidase (*glb1*), des Redoxregulators Thioredoxin 1 (*txn1*), der Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD, *sod2*) und der endothelialen NO-Synthase (*nos3*) basiert auf deren zentraler Rolle in der Endothelzellseneszenz (*cdkn1a*, *glb1*), der Redoxhomöostase (*txn1*, *sod2*) und der Endothelfunktion (*nos3*). Dazu wurde in humanen Endothelzellen nach den zuvor beschriebenen Methoden Seneszenz durch  $H_2O_2$  induziert und parallel mit 500 nM Curcumin behandelt. Anschließend wurde die relative Expression der Gene mittels semi-quantitativer Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion analysiert; die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.



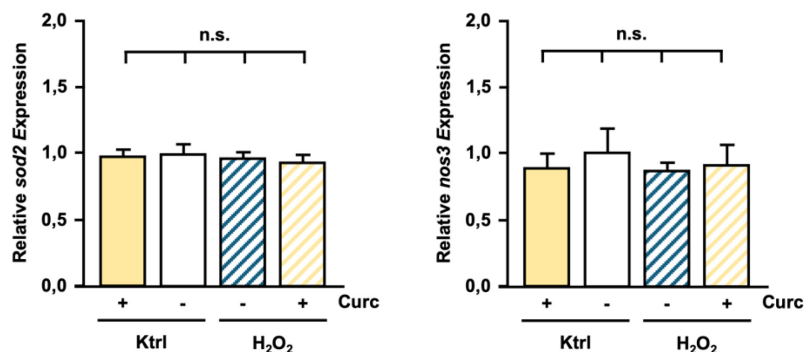


Abbildung 29: Relative Expression der Gene *cdkn1a*, *glb1*, *txn1*, *sod2* und *nos3* nach durch oxidativen Stress-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung. Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt oder als Kontrolle (Ktrl) unbehandelt gelassen; gleichzeitig wurden Curcumin (Curc) zu einer Endkonzentration von 500 nM (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle zugegeben. Die Expressionsdaten wurden auf RPL32 normalisiert und die mittlere relative Expression in den DMSO-behandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=4$ ; n.s.=nicht signifikant; one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

Wie in Abbildung 29 sichtbar, zeigt sich auf Transkriptionsebene durch die Stress-induzierte Seneszenz keine signifikante Veränderung in der relativen Expression der Gene *cdkn1a*, *glb1*, *txn1*, *sod2* und *nos3*. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass auch die Langzeit-Curcuminbehandlung keine Effekte auf die relative Expression der untersuchten Gene unter Bedingungen der Seneszenzinduktion, sowie unter Basalbedingungen hat.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde unter den Bedingungen der niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierten Seneszenz durch 1 ng/ml LPS genutzt (Abbildung 30).

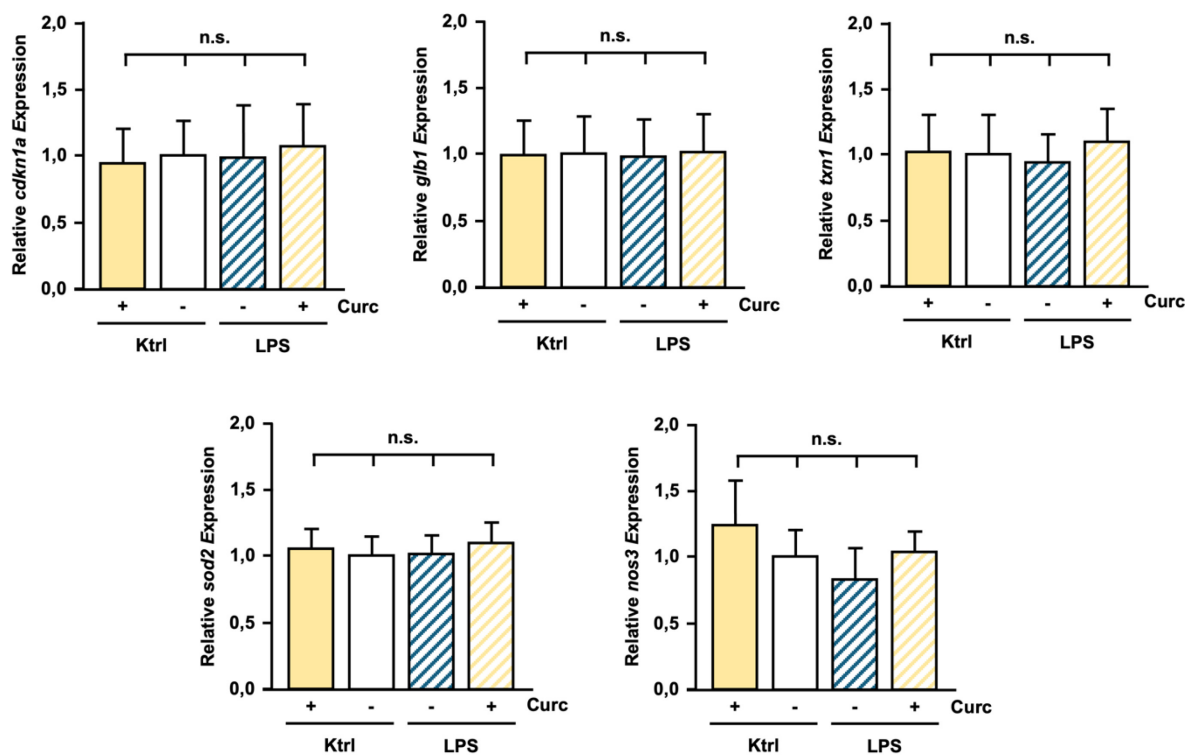


Abbildung 30: **Relative Expression der Gene *cdkn1a*, *glb1*, *txn1*, *sod2* und *nos3* nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml detoxifiziertem (Ktrl) oder aktivem LPS (LPS) behandelt; gleichzeitig wurden Curcumin (Curc) zu einer Endkonzentration von 500 nM (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle zugegeben. Die Expressionsdaten wurden auf RPL32 normalisiert und die mittlere relative Expression in den DMSO-behandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=5$ ; n.s.=nicht signifikant; one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

Auch unter den Bedingungen der niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierten Seneszenz zeigen die Daten keine signifikante transkriptionelle Regulation der Gene durch eine Langzeitbehandlung mit Curcumin.

Die anhand der Transkriptmengen erfasste Expression korreliert nicht notwendigerweise direkt mit der Proteinmenge, da diese auch durch Translationseffizienz und Proteindegradation bzw. -stabilität mitbestimmt wird (Maier et al., 2009). Deshalb wurde im Folgenden der Einfluss von Curcumin auf die Stress-induzierte Seneszenz auf Proteinebene untersucht.

Zuerst wurde der Seneszenzmarker p21 unter dem Einfluss der Stress-induzierten Seneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung analysiert. Dazu wurden Immunoblots angefertigt und semi-quantitativ ausgewertet (Abbildung 31).

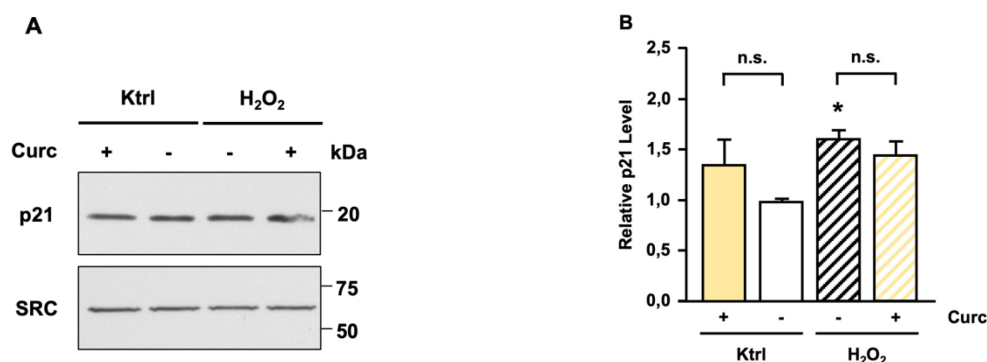


Abbildung 31: **Relative p21 Proteinlevel nach durch oxidativen Stress-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt oder als Kontrolle (Ktrl) unbehandelt gelassen; gleichzeitig wurden Curcumin (Curc) zu einer Endkonzentration von 500 nM (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle zugegeben; p21 wurde mittels Immunoblot detektiert, SRC diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse der p21 Menge.** Die p21 Menge wurden auf SRC normiert und der Mittelwert des p21 Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=5$ ; \*  $p < 0.05$  vs. Ktrl ohne Curcumin; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich ein signifikanter Anstieg des relativen p21 Proteinlevels nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was ein eindeutiges Indiz für die erfolgreiche Seneszenzinduktion ist. Eine zeitgleiche Behandlung mit 500 nM Curcumin kann die Hochregulation des p21 Proteinlevels allerdings nicht verhindern. Auch die alleinige Behandlung mit 500 nM Curcumin bewirkt keine Veränderung der relativen p21 Proteinmenge.

Nach Co-Behandlung mit LPS und Curcumin wurden analoge Untersuchungen durchgeführt (Abbildung 32).

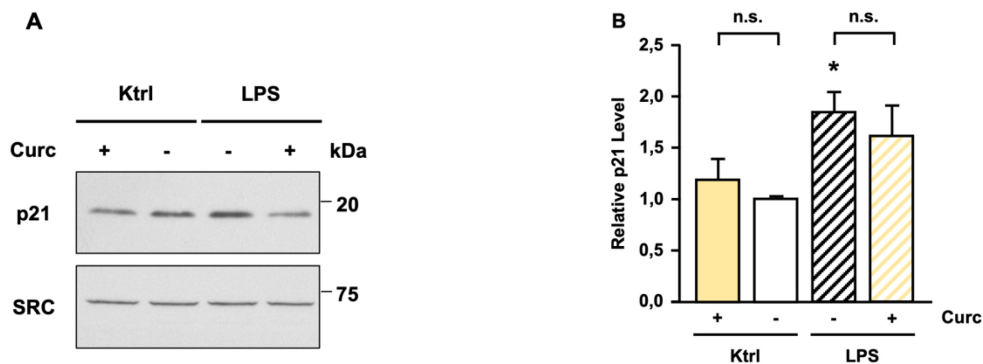


Abbildung 32: **Relative p21 Proteinlevel nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml LPS oder detoxifiziertem LPS (Ktrl) und 500 nM Curcumin (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle behandelt; p21 wurde mittels Immunoblot detektiert, SRC diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse der p21 Menge.** Die p21 Menge wurden auf SRC normiert und der Mittelwert des p21 Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=5$ ; \*  $p < 0.05$  vs. Ktrl ohne Curcumin; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

In Abbildung 32 zeigt sich auch nach wiederholter Behandlung mit 1 ng/ml LPS eine signifikante Hochregulation des relativen p21 Proteinlevels und somit eine erfolgreiche niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierte Seneszenz. Eine Behandlung mit 500 nM Curcumin kann der durch niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierten p21 Hochregulation nicht entgegenwirken. Zudem bewirkt eine Behandlung von Zellen, die detoxifiziertes LPS erhalten hatten, mit Curcumin keine Veränderung des relativen p21 Proteinlevels.

Ergänzend zu den Immunoblots, die nur die Menge des Proteins erfassen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von p21 vorgenommen. Diese Methode erlaubt es, die intrazelluläre Verteilung von p21 zu beurteilen, welches für seine Funktion als Zellzyklusinhibitor im Zellkern lokalisiert sein muss. Die Ergebnisse der p21-Immunfluoreszenzfärbung sind in Abbildung 33 dargestellt.

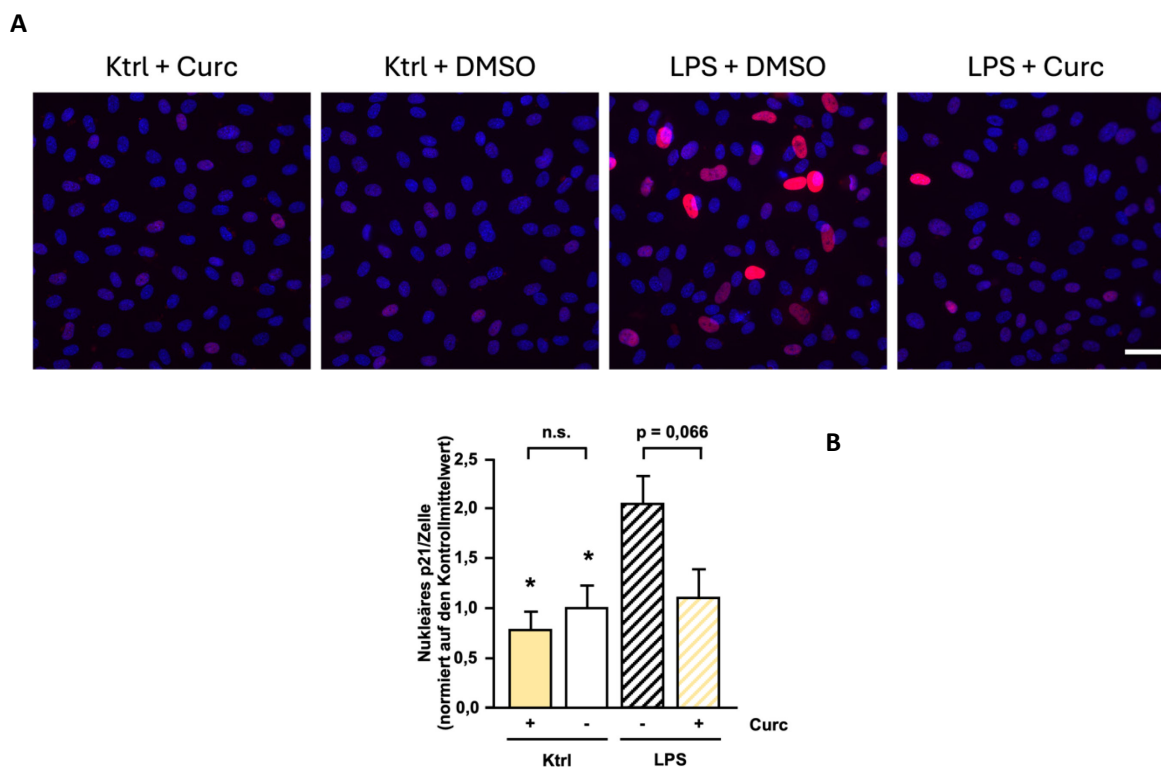


Abbildung 33: **Nukleäres p21 nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml LPS oder detoxifiziertem LPS (Ktrl) und 500 nM Curcumin (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die p21 Menge und Lokalisation wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. **(A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen.** Rot zeigt p21 positive Zellen, deren Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt wurden. Der Maßstabsbalken zeigt 50 µm an. **(B) Semi-quantitative Analyse von nukleärem p21.** Der Mittelwert der p21 positiven Zellkerne in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=6$ ; \*  $p < 0.05$  vs. LPS ohne Curcumin; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

Die niedrig-Dosis Endotoxämie induziert eine signifikante Akkumulation von p21 im Zellkern, was wiederum ein Nachweis für die Induktion zellulärer Seneszenz ist. Im Gegensatz zu den p21 Immunoblots geben die p21 Immunfluoreszenzfärbungen einen Hinweis darauf, dass Curcumin möglicherweise doch der Seneszenzinduktion entgegenwirken könnte.

Zur Beurteilung der Endothelzellfunktion während der Stress-induzierten Seneszenz wurde das relative eNOS Proteinlevel analysiert (Abbildung 34), da in diesem Modell schon gezeigt worden war, dass die eNOS Proteinmenge nach wiederholter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung abnimmt (Goy et al., 2014).

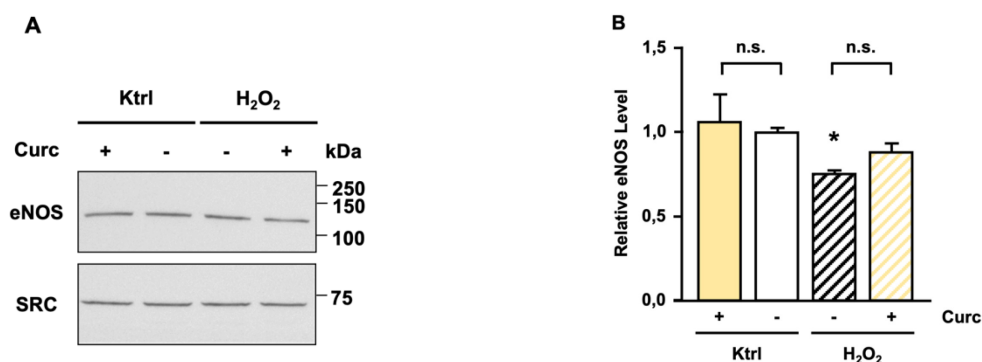


Abbildung 34: **Relative eNOS Proteinlevel nach durch oxidativen Stress-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt oder als Kontrolle (Ktrl) unbehandelt gelassen; gleichzeitig wurden Curcumin (Curc) zu einer Endkonzentration von 500 nM (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle zugegeben; eNOS wurde mittels Immunoblot detektiert, SRC diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse der eNOS Menge.** Die eNOS Menge wurden auf SRC normiert und der Mittelwert des eNOS Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (n=5; \* p < 0.05 vs. Ktrl ohne Curcumin; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

Die mit 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Seneszenz führt zu einer signifikanten Reduktion des relativen eNOS Proteinlevels. Eine Behandlung mit 500 nM Curcumin kann den Stress-induzierten eNOS-Verlust nicht aufheben. Eine alleinige Behandlung mit 500 nM Curcumin führt auch zu keiner Veränderung des relativen eNOS Proteinlevels.

Die gleichen Analysen wurden auch in dem niedrig-Dosis Endotoxämie-Modell durchgeführt (Abbildung 35).

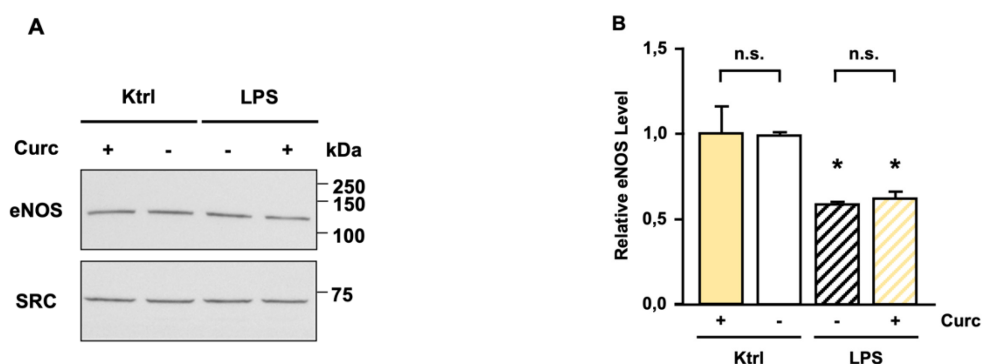
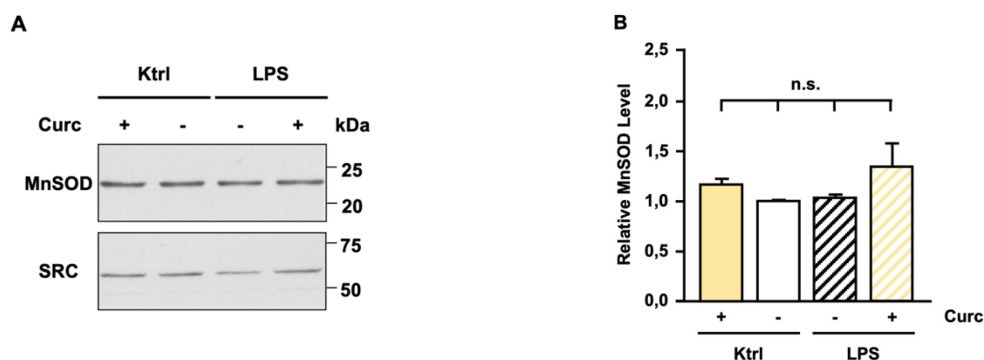


Abbildung 35: **Relative eNOS Proteinlevel nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml LPS oder detoxifiziertem LPS (Ktrl) und 500 nM Curcumin (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle behandelt; eNOS wurde mittels Immunoblot detektiert, SRC diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse der eNOS Menge.** Die eNOS Menge wurden auf SRC normiert und der Mittelwert des eNOS Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (n=5; \* p < 0.05 vs. Ktrl mit/ohne Curcumin; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

Das relative eNOS Proteinlevel zeigt auch durch die niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierte Seneszenz eine signifikante Minderung. Diese Abnahme des eNOS Proteinlevels kann durch eine Behandlung mit 500 nM Curcumin nicht ausgeglichen werden. Auch durch die alleinige Behandlung mit 500 nM Curcumin konnte keine Veränderung des relativen eNOS Proteinlevels beobachtet werden.

Bei p21 waren auf RNA-Ebene keine Unterschiede zwischen unbehandelten bzw. den mit detoxifiziertem LPS behandelten und den Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. aktivem LPS behandelt worden waren, erkennbar. In den Immunoblots dagegen zeigte sich allerdings immer die erwartete Hochregulation von p21. Gleiches galt für die Reduktion der eNOS Proteinmenge, die sich nicht im Transkriptlevel widerspiegelte. Um derartige mögliche Diskrepanzen auch für Proteine, die eine Rolle in der der Redoxhomöostase spielen, aufzudecken wurde auch MnSOD auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurde das Modell der LPS-induzierten Endothelzellseneszenz herangezogen und entsprechende Immunoblots durchgeführt (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Relative MnSOD Proteinlevel nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml LPS oder detoxifiziertem LPS (Ktrl) und 500 nM Curcumin (+) oder DMSO (-) als Lösungsmittelkontrolle behandelt; MnSOD wurde mittels Immunoblot detektiert, SRC diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse von MnSOD.** Der Mittelwert des MnSOD Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=4$ ; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test)

Es konnte gezeigt werden, dass die niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierte Seneszenz zu keiner signifikanten Änderung des relativen MnSOD Proteinlevels in Endothelzellen führt. Auch eine Langzeitbehandlung mit detoxifiziertem LPS und Curcumin beeinflusst die relative MnSOD Proteinmenge nicht. In diesem Fall decken sich somit die Expressionsdaten mit den Proteinmengen.

Weiterführend wurden die Ergebnisse der Immunoblots, die Auskunft über die relative Proteinmenge von eNOS und MnSOD geben, durch Immunfluoreszenzfärbungen ergänzt, welche zusätzlich die Beurteilung der subzellulären Lokalisierung dieser Proteine ermöglichen (Abbildung 37).

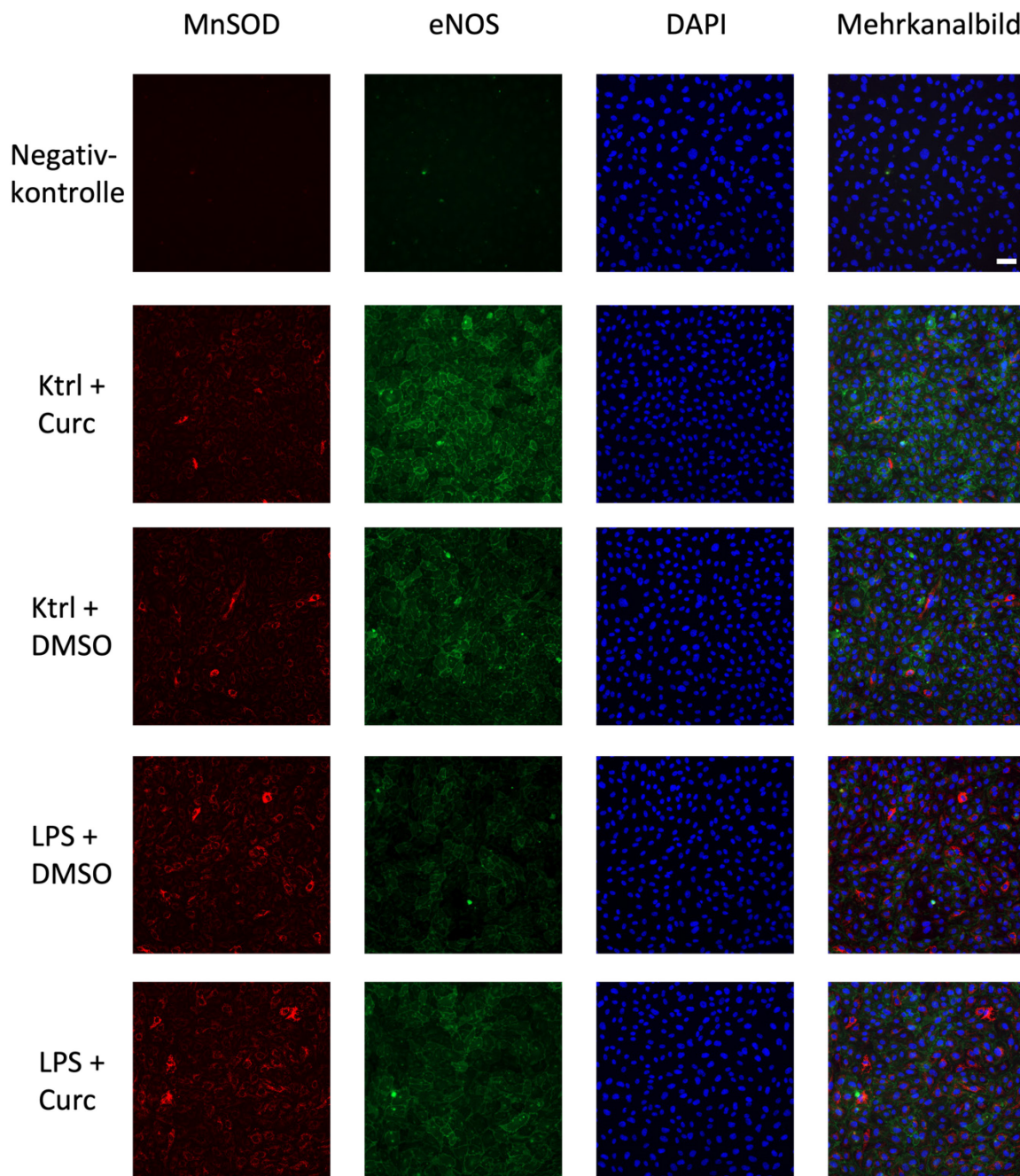


Abbildung 37: Immunfluoreszenzfärbung für MnSOD und eNOS nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Curcuminbehandlung. Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml LPS oder detoxifiziertem LPS (Ktrl) und 500 nM Curcumin oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden. Für die Negativkontrolle, bei der bei der Färbung keine Primärantikörper eingesetzt wurden, wurden Endothelzellen genutzt, die nur mit DMSO behandelt worden waren. Rot: MnSOD, grün: eNOS, blau: Zellkerne (DAPI), Mehrkanalbild: Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 100  $\mu\text{m}$  an.

Abbildung 37 zeigt identische MnSOD Level unabhängig von der Behandlung. Im Gegensatz dazu sinkt die eNOS Menge nach Behandlung der Endothelzellen mit LPS, was die Daten aus den Immunoblots

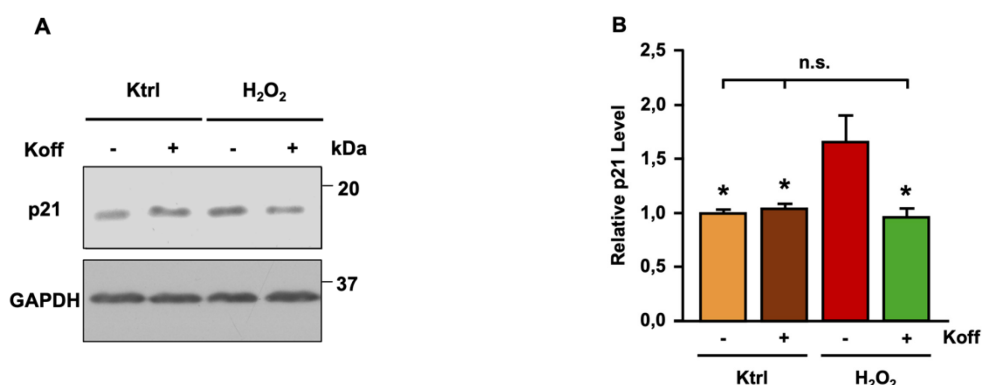
(Abbildung 35) untermauert. Wie schon in diesen gezeigt, hat die additive Behandlung mit Curcumin keinen Effekt auf das eNOS Level.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Curcumin in der hier verwendeten Konzentration möglicherweise der niedrig-Dosis Endotoxämie induzierten Endothelzellseneszenz auf der Ebene einzelner Zellen entgegenwirken könnte. Ob dies auch für die durch oxidativen Stress-induzierte Seneszenz Gültigkeit hat, muss noch untersucht werden. Allerdings scheint Curcumin nicht in der Lage zu sein dem Verlust von eNOS nach Langzeit LPS-Behandlung entgegenzuwirken. Anders als bei kurzzeitiger Applikation hat Curcumin in den Langzeitversuchen keinen Einfluss auf das Nrf2-Zielgen MnSOD.

### 3.7.2 Einfluss von Koffein auf die Endothelzellseneszenz

Neben Curcumin wurde auch der Einfluss von Koffein auf die Induktion der Endothelzellseneszenz untersucht. Allerdings wurden hier keine RNA-Daten erhoben, da im vorhergehenden Kapitel gezeigt wurde, dass die Seneszenzinduktion zu keiner Veränderung der Expression der untersuchten Gene führt. Dementsprechend wurde der Fokus auf Veränderungen der Level zweier Proteine gelegt, nämlich auf p21 als generellen Seneszenzmarker und eNOS als Indikator für essenzielle Endothelfunktionen.

Zunächst wurde p21 mittels Immunoblot in beiden Modellen, der Seneszenzinduktion durch repetitive  $H_2O_2$ -Behandlung und der niedrig-Dosis Endotoxämie, untersucht (Abbildung 38 und Abbildung 39).



**Abbildung 38: Relative p21 Proteinlevel nach durch oxidativen Stress-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Koffeinbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit  $50 \mu M H_2O_2$  behandelt oder als Kontrolle (Ktrl) unbehandelt gelassen; gleichzeitig wurden Koffein (Koff) zu einer Endkonzentration von  $10 \mu M$  Koffein zugegeben (+) oder nicht (-); p21 wurde mittels Immunoblot detektiert, GAPDH diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse der p21 Menge.** Die p21 Menge wurde auf GAPDH normiert und der Mittelwert des p21 Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=5$ ; \*  $p < 0.05$  vs.  $H_2O_2$  ohne Koffein; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-LSD-Test). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Merk, Jan Greulich und Annika Vierkant erhoben und wurden bereits veröffentlicht.

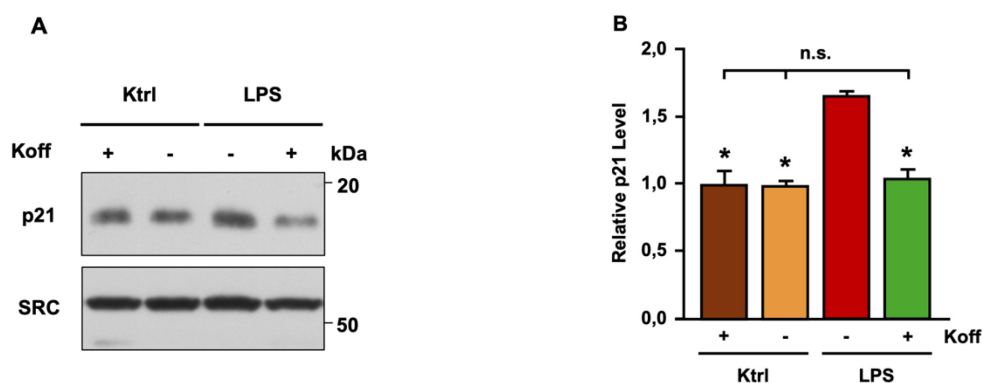


Abbildung 39: **Relative p21 Proteinlevel nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Koffeinbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml LPS oder detoxifiziertem LPS (Ktrl) behandelt; gleichzeitig wurde 10  $\mu$ M Koffein zugegeben (+) oder nicht (-); p21 wurde mittels Immunoblot detektiert, GAPDH diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse der p21 Menge.** Die p21 Menge wurde auf GAPDH normiert und der Mittelwert des p21 Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=5$ ; \*  $p < 0.05$  vs. LPS ohne Koffein; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-LSD-Test). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Merk, Jan Greulich und Annika Vierkant erhoben und wurden bereits veröffentlicht.

Nach repetitiver Behandlung mit 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  oder 1 ng/ml LPS über einen Zeitraum von insgesamt zwei Wochen zeigte sich eine signifikante Zunahme der p21 Menge im Vergleich zur unbehandelten bzw. mit detoxifiziertem LPS behandelten Kontrolle, was auf eine erfolgreiche Seneszenzinduktion hinweist. In beiden Modellen verhinderte die Koffeinbehandlung die Seneszenz-assoziierte p21 Hochregulation, wohingegen Koffein keinen Einfluss auf die p21 Menge unter den jeweiligen Kontrollbedingungen hatte. Dies zeigt eindeutig, dass Koffein spezifisch die Induktion von Endothelzellseneszenz verhindert.

Da Koffein die Seneszenzinduktion verhindert, war es von Interesse, ob es auch die Produktion von NO, einem essenziellen Mediator von Endothelzellfunktionen, unter oxidativem Stress oder in niedrig-Dosis Endotoxämie erhalten kann. Als erster Schritt zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das eNOS Level – wiederum mittels Immunoblot – analysiert (Abbildung 40 und Abbildung 41).

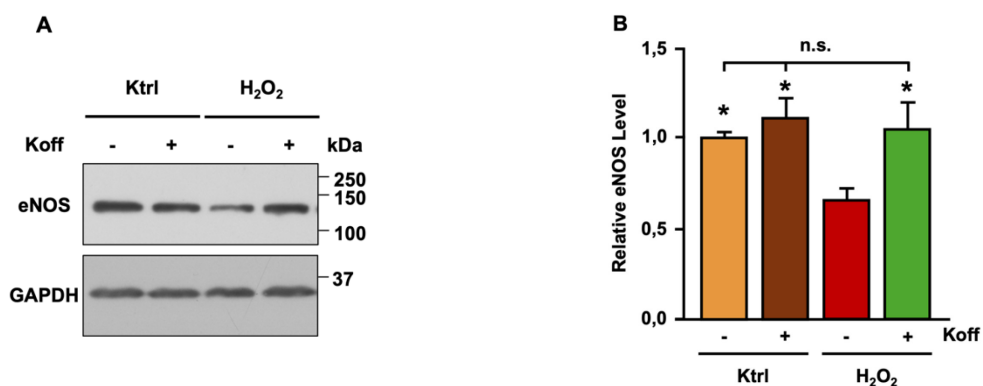


Abbildung 40: **Relative eNOS Proteinlevel nach durch oxidativen Stress-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Koffeinbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  behandelt oder als Kontrolle (Ktrl) unbehandelt gelassen; gleichzeitig wurden Koffein (Koff) zu einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M Koffein zugegeben (+) oder nicht (-); eNOS wurde mittels Immunoblot detektiert, GAPDH diente als Ladekontrolle. **(A) Repräsentative Immunoblots.** Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. **(B) Semi-quantitative Analyse der eNOS Menge.** Die eNOS Menge wurde auf GAPDH normiert und der

Mittelwert des eNOS Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=5$ ; \*  $p < 0.05$  vs.  $H_2O_2$  ohne Koffein; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-LSD-Test). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Merk, Jan Greulich und Annika Vierkant erhoben und wurden bereits veröffentlicht.

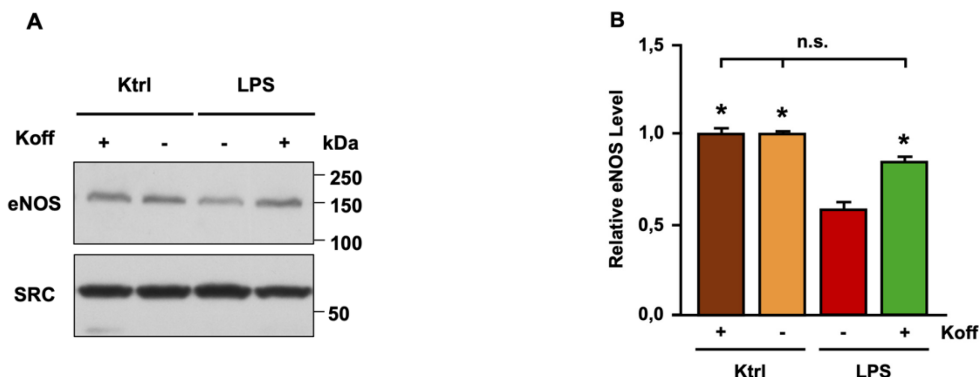


Abbildung 41: **Relative eNOS Proteinlevel nach niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierter Endothelzellseneszenz und Langzeit-Koffeinbehandlung.** Humane Endothelzellen wurden zwei Wochen lang jeden zweiten Tag mit 1 ng/ml LPS oder detoxifiziertem LPS (Ktrl) behandelt; gleichzeitig wurde 10  $\mu$ M Koffein zugegeben (+) oder nicht (-); eNOS wurde mittels Immunoblot detektiert, GAPDH diente als Ladekontrolle. (A) Repräsentative Immunoblots. Die Größen ausgewählter Proteine aus dem Protein Größenmarkers in kDa sind rechts dargestellt. (B) Semi-quantitative Analyse der eNOS Menge. Die eNOS Menge wurde auf GAPDH normiert und der Mittelwert des eNOS-Proteinlevels in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n=5$ ; \*  $p < 0.05$  vs. LPS ohne Koffein; n.s. = nicht signifikant, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-LSD-Test). Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Merk, Jan Greulich und Annika Vierkant erhoben und wurden bereits veröffentlicht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Koffein unabhängig vom verwendeten Stimulus die Induktion von Endothelzellseneszenz verhindern kann. Darüber hinaus wirkt es auch dem Seneszenz-assoziierten eNOS-Verlust entgegen und erhält somit die NO-Produktion.

Diese Daten zum inhibierenden Einfluss von Koffein auf Stress- und niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierte Endothelzellseneszenz wurden in Zusammenarbeit mit Dennis Merk, Jan Greulich und Annika Vierkant erhoben und publiziert (Merk et al., 2023).

### 3.8 Pilotstudie zum Einfluss von Curcumin und Koffein auf die Adipogenese

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.2) dargestellt, umgibt das perivaskuläre Fettgewebe (*perivascular adipose tissue*, PVAT) die äußere Gefäßwand größerer Arterien und Venen. Lange Zeit wurde es lediglich als stützendes Bindegewebe für Blutgefäße angesehen, jedoch wird es inzwischen als spezialisiertes, metabolisch aktives endokrines Organ angesehen (Hildebrand et al., 2018). Adipozyten des PVAT sezernieren ein breites Spektrum an Adipokinen, Zytokinen und vasoaktiven Faktoren, darunter Stickstoffmonoxid, und modulieren damit die Gefäßfunktion, Homöostase und mechanische Stabilität der Gefäße (Brown et al., 2014; Hillock-Watling & Gotlieb, 2022).

Unter physiologischen Bedingungen vermittelt PVAT überwiegend gefäßprotektive und antiinflammatorische Effekte, wohingegen eine Dysfunktion, beispielsweise bei Adipositas, mit einem proinflammatorischen, vasokonstriktorischem Sekretionsprofil, reduzierter NO-Bioverfügbarkeit durch

Entkopplung der in PVAT exprimierten eNOS, sowie erhöhter Superoxidproduktion und der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert ist (Niculescu et al., 2025; Xia et al., 2016). Diese Befunde unterstreichen, dass PVAT nicht als passives Fettpolster, sondern als Modulator der vaskulären Homöostase und endothelialen Funktion zu verstehen ist (Valentini et al., 2023; Whittaker et al., 2025).

Fettgewebe ist nicht homogen, sondern zeigt eine breite Phänotypenvielfalt, die unter anderem von der Lokalisation abhängig ist. Generell lässt sich Fettgewebe in drei Haupttypen einteilen: weißes Fettgewebe (WAT), das primär Energie speichert und hauptsächlich an subkutanen oder intraviszeralen Stellen zu finden ist, und braunes Fettgewebe (BAT), das durch sogenannte zitterfreie Thermogenese Wärme produziert und primär im Interskapularbereich lokalisiert ist (Foster & Frydman, 1978). Zitterfreie Thermogenese bedeutet, dass Wärme ohne Muskelaktivität generiert wird. Sie beruht auf der Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette von der ATP-Synthese. Hierfür verantwortlich sind Entkopplungsproteine (*uncoupling proteins, UCPs*), die den Protonenrückfluss aus dem mitochondrialen Intermembranraum unter Umgehung der ATP-Synthase erlauben, womit die dem chemiosmotischen Gradienten inhärente Energie als Wärme freigesetzt wird (Jones et al., 2024). Dies erklärt warum BAT reich an Mitochondrien sein muss. Der hohe mitochondriale Gehalt von BAT erklärt sowohl dessen metabolische Aktivität als auch den charakteristischen braunen Farbton (Cannon & Nedergaard, 2004). Daneben gibt es beiges Fettgewebe, das durch „Browning“ aus WAT entsteht, dort eingelagert ist und thermogene BAT-Eigenschaften übernimmt. Die unterschiedlichen Fettgewebe werden überwiegend von entsprechenden Adipozytentypen (weißen, braunen und beigen Adipozyten) aufgebaut.

PVAT zeigt je nach Gefäßlokalisierung variierende Phänotypen. Thorakales PVAT ähnelt BAT mit plurivakuolären Adipozyten, hoher Mitochondriendichte und Expression thermogener Gene wie *uncoupling protein 1 (ucp1)*. Abdominales PVAT ähnelt eher WAT mit univakuolären Zellen und geringer *ucp1* Expression (Hildebrand et al., 2018). Die exakte Klassifikation ob PVAT BAT, beiges Fettgewebe oder WAT zuzuordnen ist, bleibt jedoch unklar (Hildebrand et al., 2018).

Aktuelle Befunde deuten darauf hin, dass es im Rahmen von Adipositas und kardiovaskulären Erkrankungen zu einem funktionellen Umbau des PVAT in Richtung eines WAT-ähnlichen, dysfunktionalen Phänotyps („Whitening“) kommt. Dieser Umbau ist mit einer gestörten Redoxhomöostase, erhöhter Bildung von ROS sowie einer proinflammatorischen Sekretionsaktivität assoziiert und trägt zur Entwicklung vaskulärer Dysfunktion bei (Cheng et al., 2023). Im Gegensatz dazu gilt die Umwandlung von WAT in einen braun- oder beigeähnlichen Phänotyp („Browning“) als potenziell protektiv (Kaisanlahti & Glumoff, 2019).

Das Verständnis, wie Adipozytenvorläuferzellen zu reifen Adipozyten werden, ist grundlegend für die Entschlüsselung der Mechanismen der Fettgewebeentwicklung und der Energiehomöostase. Zur Untersuchung dieser Adipozytendifferenzierung (im Folgenden Adipogenese genannt) wurden die Adipozytenvorläuferzellen 3T3-L1, abgeleitet aus embryonalen Fibroblasten der Maus und allgemein als Präadipozyten bezeichnet, eingesetzt. Dieses Modell rekapituliert die Adipogenese von Fibroblasten zu reifen, lipidbeladenen Adipozyten durch die Zugabe differenzierungsfördernder Substanzen und eignet sich besonders zur Analyse von Lipidakkumulation und frühen Differenzierungsmarkern. Die Durchführung erfolgte gemäß dem im Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Protokoll. Als undifferenzierte

Kontrolle wurden die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum mit DMEM komplett Medium kultiviert. Um einen ersten Eindruck zum Einfluss von Curcumin und Koffein auf die Adipogenese zu gewinnen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich Pilotexperimente durchgeführt.

Zur Beurteilung der Differenzierung wurden zunächst lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen vor Durchführung der Öl Rot O Färbung angefertigt, um morphologische Unterschiede zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen darzustellen. Anschließend wurde die intrazelluläre Lipidakkumulation mittels Öl Rot O Färbung (Kapitel 2.2.2.5) analysiert (Abbildung 42).

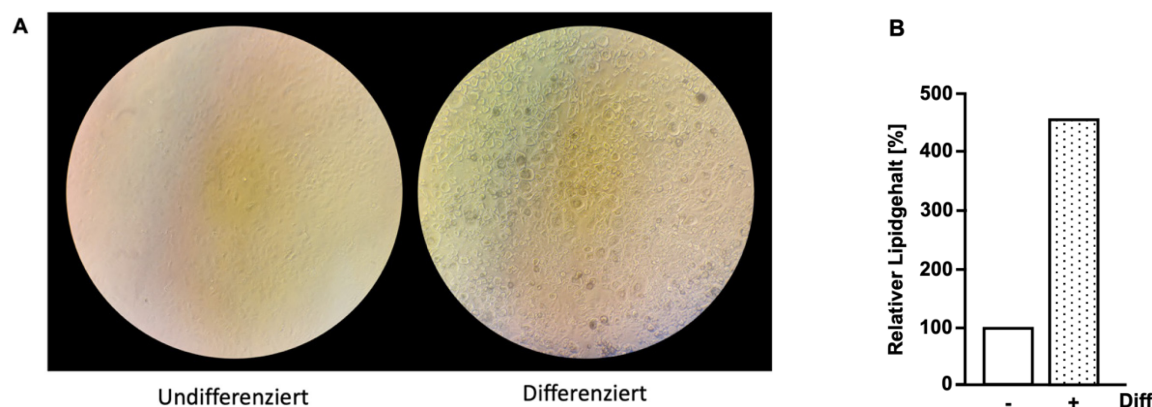


Abbildung 42: **Vergleich von undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen.** 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage entweder undifferenziert (Diff -) belassen oder differenziert (Diff +). (A) Repräsentative Bilder der Zellen im Durchlichtmikroskop. (B) Analyse des relativen Lipidgehalts nach Öl Rot O Färbung. Die zellulären Lipide wurden mit Öl Rot O gefärbt und der Lipidgehalt der undifferenzierten Zellen auf 100 % gesetzt. n=1

Wie aus Abbildung 42 A zu ersehen ist, weisen die undifferenzierten Präadipozyten eine Fibroblastenartige Morphologie auf, während differenzierte Zellen eine rundere Zellform annehmen und intrazelluläre Lipidtropfen ausbilden. Die Öl Rot O Färbung zeigte in den differenzierten Zellen zudem eine stark erhöhte Lipidakkumulation (Abbildung 42 B). Diese Beobachtungen sprechen für eine erfolgreiche Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten.

Angesichts der vaskulären Effekte natürlicher Pflanzenstoffe wie Curcumin und Koffein, deren Wirkungen auf die Endothelfunktion bereits in vorhergehenden Kapiteln beschrieben wurden, sowie des bestehenden Crosstalks zwischen Endothel und PVAT, wurden diese Stoffe hier auf ihre potenziellen Einflüsse auf die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten untersucht. Dazu wurden wiederum ausschließlich Pilotexperimente durchgeführt, die eine Grundlage für weiterführende, vertiefende Untersuchungen schaffen sollen.

Für die Experimente zur Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten in Adipozyten wurden die Zellen wie im Methodenteil 2.2.2.3 beschrieben kultiviert. Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch Zugabe des Differenzierungsmediums. Zeitgleich wurden die Zellen mit Curcumin oder Koffein in Endkonzentrationen von 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  behandelt. Als undifferenzierte Kontrolle wurden die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum in DMEM komplett

kultiviert. Die Behandlung mit Curcumin bzw. Koffein wurde bei jedem Mediumwechsel wiederholt (Abbildung 43).

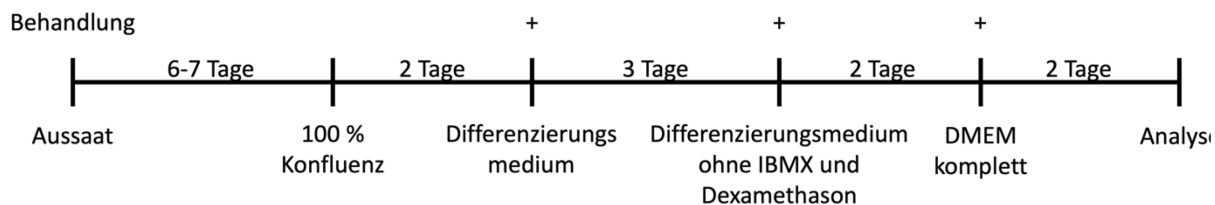


Abbildung 43: **Zeitstrahl des Differenzierungsmodells.** Schematische Darstellung des Verfahrens zur Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten. Die Pluszeichen oberhalb des Zeitstrahls markieren die Zeitpunkte der Behandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  Curcumin bzw. 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Koffein. Als undifferenzierte Kontrolle wurden die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum in DMEM komplett kultiviert. Die Anzahl der Tage gibt die Zeit zwischen den verschiedenen Verfahren an, die unter den vertikalen Linien erläutert werden.

### 3.8.1 Einfluss von Curcumin auf die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten

Nach Etablierung des Differenzierungsmodells wurde die Expression von Genen für ein Enzym, das essenziell für die Redoxhomöostase ist, einen generellen Indikator der Adipogenese sowie für charakteristische Marker der Mitochondrienbiogenese und thermogener Programme unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Curcumin mittels semi-quantitativer Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR) untersucht.

Als erstes wurde die Expression der mitochondrialen Superoxid-Dismutase (*sod2*) analysiert. SOD2 als zentrales antioxidatives Enzym der Mitochondrien spielt eine entscheidende Rolle bei der Detoxifizierung von ROS. Zur Initiation der Adipogenese sind allerdings erhöhte ROS-Level erforderlich, was dadurch gezeigt wurde, dass der Einsatz von Antioxidantien die Adipogenese von humanen Fettgewebestammzellen verhinderte, diese aber durch erhöhten endogenen oder exogenen oxidativen Stress verstärkt werden konnte. Dabei scheinen die erhöhten ROS-Level notwendig für die Lipidakkumulation zu sein. Interessanterweise kommt es dabei aber auch zu einer gleichzeitigen Hochregulation der Expression von anti-oxidativen Enzymen wie SOD2, um so anscheinend die generelle Redoxhomöostase aufrecht zu erhalten (Higuchi et al., 2013). In dieser Arbeit (Kapitel 3.4) konnte gezeigt werden, dass Curcumin die *sod2* Expression in Endothelzellen induziert. Vor diesem Hintergrund wurde *sod2* auch in dem Differenzierungsmodell von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten untersucht, um mögliche Effekte von Curcumin auf die mitochondriale Redox-Balance in der Adipogenese zu erfassen (Abbildung 44).

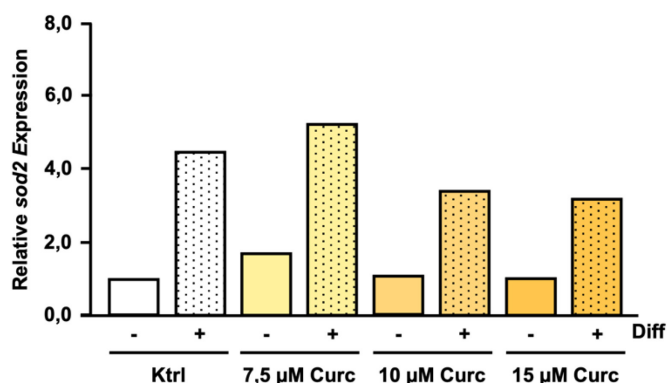


Abbildung 44: Relative *sod2* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Curcuminbehandlung. 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Curcumin (7,5 µM, 10 µM, 15 µM Curc) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Ktrl) behandelt. Die Expression von *sod2* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die mittlere relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Curcumin (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte (n=2).

Abbildung 44 zeigt eine erhöhte relative *sod2* Expression in differenzierten im Vergleich zu undifferenzierten 3T3-L1 Zellen über alle Bedingungen hinweg. Innerhalb der hier gezeigten Pilotexperimente lässt sich kein konzentrationsabhängiger Einfluss von Curcumin auf die relative *sod2* Expression während der Adipogenese erkennen.

Zur Ergänzung der RNA-Daten wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, um die SOD2 Expression auf Proteinebene zu beurteilen. Da keine Curcumin-abhängige Änderung der relativen *sod2* Expression festgestellt wurde, wurden hierbei undifferenzierte sowie differenzierte 3T3-L1 Zellen, die jeweils mit der höchsten Curcuminkonzentration von 15 µM behandelt wurden, untersucht, um den Einfluss der Differenzierung auf das SOD2 Proteinlevel zu betrachten (Abbildung 45).

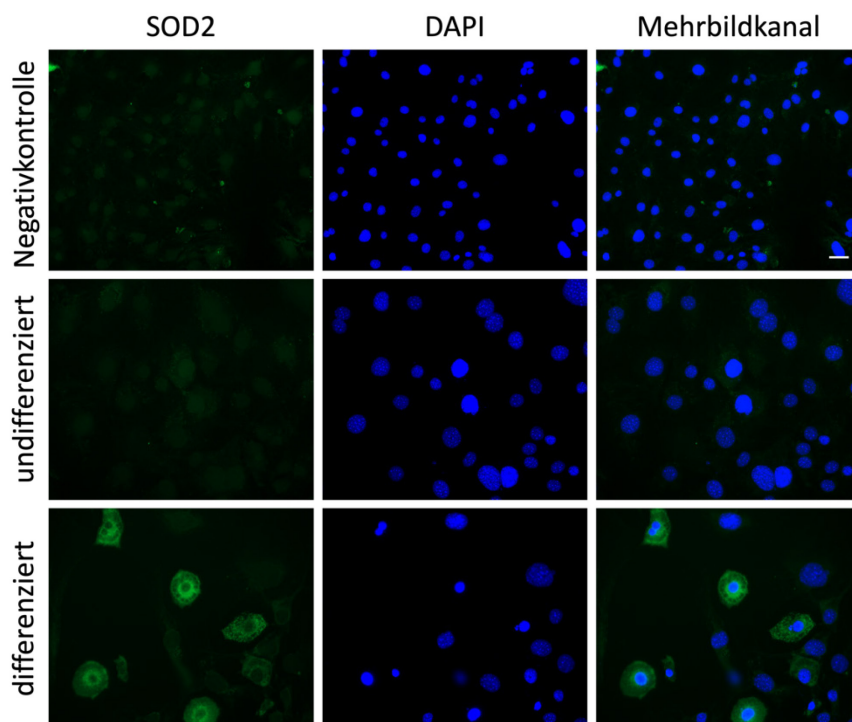


Abbildung 45: **Immunfluoreszenzfärbung für SOD2 in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 nach Curcuminbehandlung.** 3T3-L1 Zellen wurden sieben Tage lang entweder mit DMEM komplett (undifferenziert) oder Differenzierungsmedium (differenziert) und jeden zweiten Tag mit 15  $\mu\text{M}$  Curcumin behandelt. Für die Negativkontrolle wurden undifferenzierte 3T3-L1 Zellen verwendet, die mit DMSO anstelle von Curcumin behandelt und ohne Primärantikörper gefärbt wurden. Einzelkanäle: Nrf2 (rot), Sod2 (grün), DAPI (Zellkerne, blau); Mehrkanalbild: Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu\text{m}$  an.

Die Negativkontrolle zeigt keinerlei spezifische Signale. In der Immunfluoreszenzfärbung wird deutlich, dass die Menge von SOD2 durch den Prozess der Differenzierung erhöht wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse (Abbildung 44). Zusammenfassend zeigen die Daten eine konsistente Differenzierungs-abhängige Induktion der SOD2 Expression auf mRNA- und Proteinebene, ohne erkennbaren Einfluss von Curcumin.

Während der Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten kommt es zu einer komplexen Umstellung der Genexpression, die für die Lipidakkumulation und die funktionelle Reifung des Fettgewebes entscheidend ist (MacDougald & Lane, 1995). Eines der Gene, das in diesem Zusammenhang untersucht wurde, ist *cell death inducing DFFA like effector A (cidea)*. Cidea ist vor allem in weißem Fettgewebe exprimiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Expansion von Fettzellen durch die Regulation der Größe von Lipidtröpfchen (Abreu-Vieira et al., 2015). Um zu untersuchen, ob Curcumin die differenzierungsabhängige Regulation der *cidea* Expression und damit die Fähigkeit der Adipozyten zur Lipidlagerung beeinflussen könnte, wurde die relative *cidea* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen unter verschiedenen Curcuminkonzentrationen analysiert (Abbildung 46).

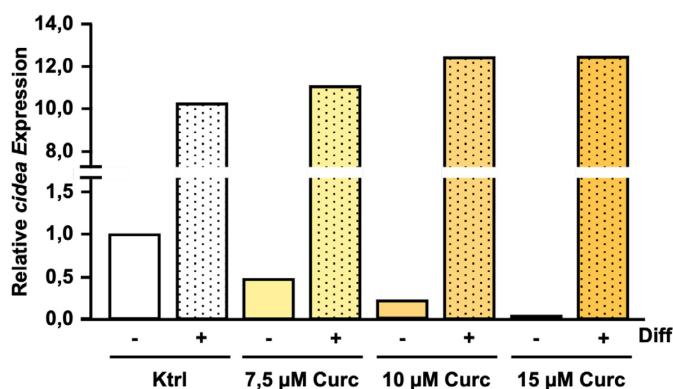


Abbildung 46: **Relative *cidea* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Curcuminbehandlung.** 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Curcumin (7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  Curc) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Ktrl) behandelt. Die Expression von *cidea* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Curcumin (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt.  $n=1$

Die relative Expression von *cidea* zeigt in undifferenzierten Zellen mit zunehmender Curcuminkonzentration eine abnehmende Expression. In differenzierten Zellen ist *cidea* im Vergleich zu undifferenzierten Zellen deutlich höher exprimiert, was in Einklang mit der verstärkten Lipideinlagerung ist. Eine zusätzliche Curcuminbehandlung scheint keinen weiteren Einfluss auf die differenzierungsabhängige Hochregulation zu haben.

Ein zentraler Regulator der Adipogenese ist der nukleäre Rezeptor *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma* (PPAR $\gamma$ ). Retrovirale Überexpression von PPAR $\gamma$ 2, einer Isoform von PPAR $\gamma$ , reicht

aus, um in ursprünglich nicht-adipogenen Fibroblasten ein vollständiges adipogenes Differenzierungsprogramm mit Lipidakkumulation zu induzieren (Tontonoz et al., 1994). Zudem zeigten Untersuchungen in chimären Mausmodellen, dass PPAR $\gamma$  *in vivo* und *in vitro* für die Ausbildung von Fettgewebe essenziell ist, da PPAR $\gamma$ -defiziente Zellen kaum oder gar nicht zum Fettgewebe beitragen (Rosen et al., 1999). Darüber hinaus ist PPAR $\gamma$  über die Koaktivatoren der PGC1-Familie in die Regulation der mitochondrialen Biogenese und der oxidativen Kapazität eingebunden, wodurch es eine funktionelle Verbindung zwischen adipogener Differenzierung und mitochondrialem Energiestoffwechsel herstellt (Hock & Kralli, 2009). Somit soll die Analyse der relativen *ppary* Expression während der Adipogenese unter dem Einfluss von Curcumin Aufschluss darüber geben, ob Curcumin die Aktivierung dieses zentralen adipogenen Transkriptionsfaktors beeinflusst (Abbildung 47).

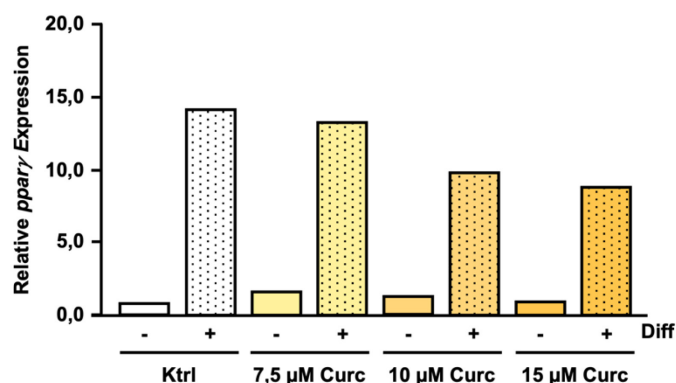


Abbildung 47: **Relative *ppary* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Curcuminbehandlung.** 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Curcumin (7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M Curc) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Ktrl) behandelt. Die Expression von *ppary* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert und die mittlere relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Curcumin (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte. n=2

Es ist eine deutlich erhöhte relative Expression von *ppary* auf RNA Level in differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen zu sehen. Eine Behandlung mit Curcumin scheint tendenziell diese Hochregulation mit zunehmender Konzentration zu verringern. Die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *ppary* nach Differenzierung untermauert auch auf dem molekularen Level die erfolgreiche Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten. Um potenzielle Veränderungen der PPAR $\gamma$  Expression und Lokalisation durch Curcumin auf Proteinebene zu bewerten, wurde Immunfluoreszenzfärbungen in differenzierten Zellen durchgeführt (Abbildung 48).

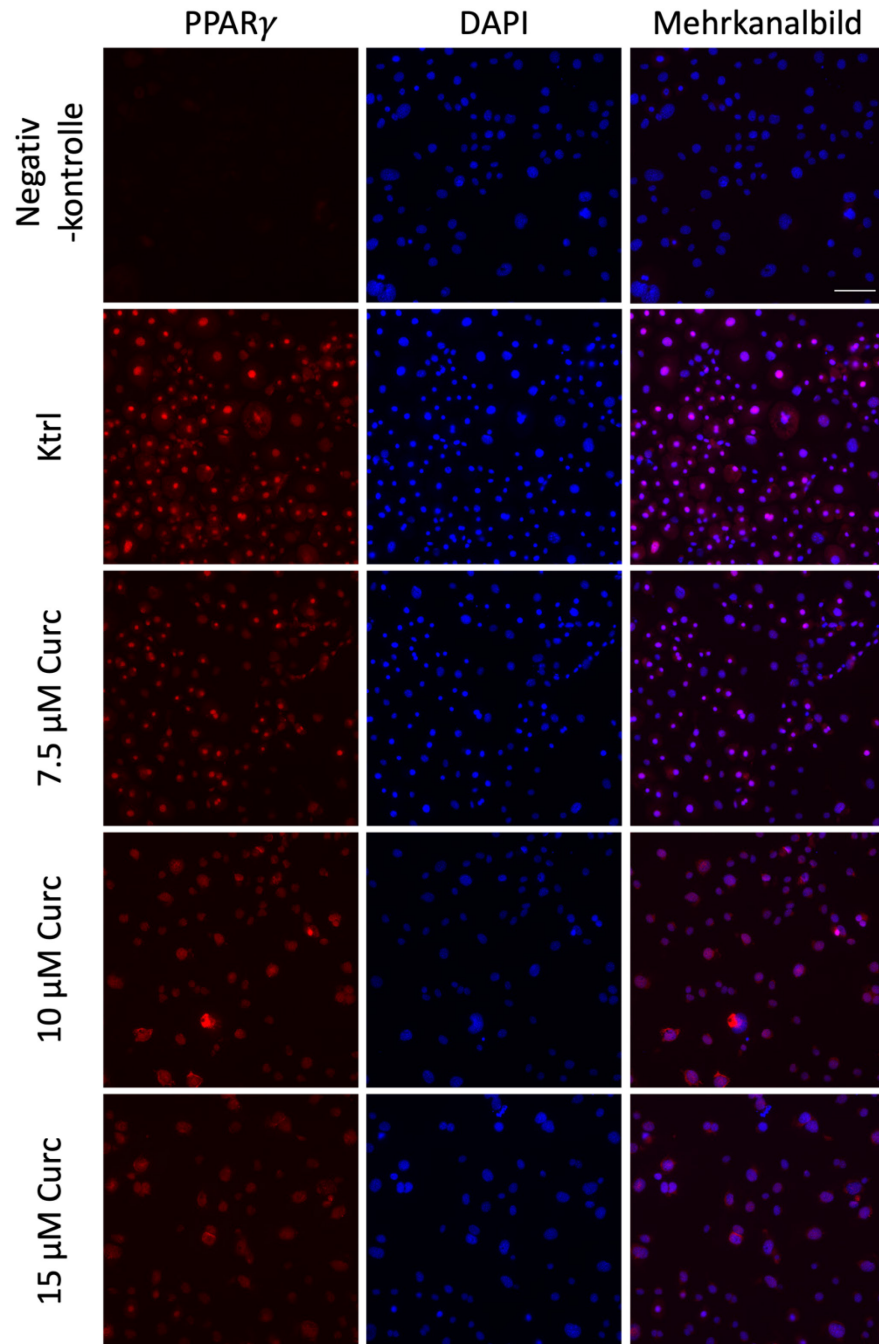


Abbildung 48: **Immunfluoreszenzfärbung für PPAR $\gamma$  in differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Curcuminbehandlung.** 3T3-L1 Zellen wurden über 7 Tage differenziert und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Curcumin (7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M Curc) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Ktrl) behandelt. Für die Negativkontrolle wurden differenzierte 3T3-L1 Zellen verwendet, die mit DMSO anstelle von Curcumin behandelt und ohne Primärantikörper gefärbt wurden. Einzelkanäle: PPAR $\gamma$  (rot), DAPI (Zellkerne, blau); Mehrkanalbild: Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 100  $\mu$ m an.

Das Fehlen eines Signals in der Negativkontrolle, in der ausschließlich der Sekundärantikörper eingesetzt wurde, beweist die Spezifität der PPAR $\gamma$ -Färbung. PPAR $\gamma$  zeigt eine überwiegend nukleäre Lokalisation und seine Menge scheint in Einklang mit den Expressionsdaten mit zunehmender Curcumin-Konzentration tendenziell abzunehmen, wenngleich aufgrund der geringen Zahl biologischer

Replikate keine belastbaren Aussagen zu Curcumin-abhängigen Veränderungen getroffen werden können.

Nach der Analyse von PPAR $\gamma$  als zentralen Transkriptionsfaktor der Adipogenese wurde ergänzend der *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 Alpha* (*pgc1 $\alpha$* ) untersucht, um die mitochondriale Funktionsebene differenzierter Adipozyten zu erfassen (Ventura-Clapier et al., 2008; Villena, 2015). *Pgc1 $\alpha$*  gilt als Schlüsselregulator der mitochondrialen Biogenese und der oxidativen Stoffwechselkapazität und steuert dadurch Energiehaushalt und Stoffwechselprogramme von Adipozyten wesentlich mit (Scarpulla et al., 2012; Villena, 2015). Da PGC1 $\alpha$  in braunem Fettgewebe maßgeblich an der Steuerung thermogener Programme beteiligt ist, ohne jedoch zwingend für die eigentliche Differenzierung brauner Adipozyten erforderlich zu sein, erlaubt seine Analyse eine funktionelle Einordnung der mitochondrialen Ausstattung und oxidativen Leistungsfähigkeit über den reinen Differenzierungsstatus hinaus (Uldry et al., 2006; Villena, 2015). Die Ergebnisse der relativen *pgc1 $\alpha$*  Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen unter verschiedenen Curcuminkonzentrationen mittels qRT-PCR ist in Abbildung 49 dargestellt.

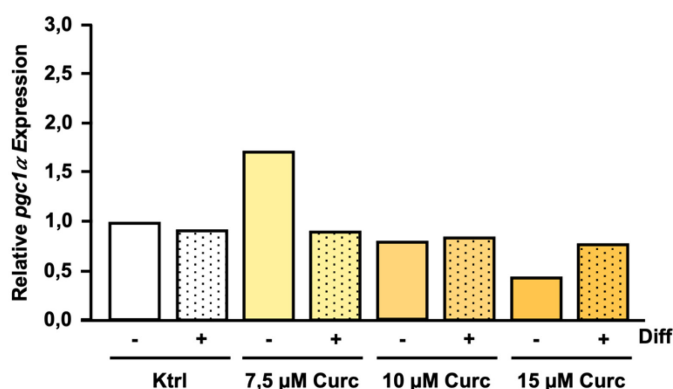


Abbildung 49: **Relative *pgc1 $\alpha$*  Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Curcuminbehandlung.** 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Curcumin (7,5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M Curc) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Ktrl) behandelt. Die Expression von *pgc1 $\alpha$*  wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die mittlere relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Curcumin (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte.  $n=2$

Die Abbildung 49 zeigt, dass *pgc1 $\alpha$*  in differenzierten 3T3-L1 Zellen im Vergleich zu den jeweiligen undifferenzierten Kontrollen keine Veränderung der relativen Expression aufweist. Auffällig ist lediglich ein tendenzieller Anstieg der *pgc1 $\alpha$*  Expression in undifferenzierten Zellen bei 7,5  $\mu$ M Curcumin. Insgesamt liefern die vorliegenden Daten keinen Hinweis darauf, dass sowohl das Differenzierungsmedium als auch Curcumin in diesem 3T3-L1 Modell eine ausgeprägte thermogene Programmierung über eine Regulierung der relativen *pgc1 $\alpha$*  Expression induzieren.

Da die *pgc1 $\alpha$*  Analyse keinen konsistenten Effekt ergab, wurde anschließend die Expression von *ucp1* als funktionellem Effektor der Thermogenese untersucht (Puigserver et al., 1998). Die *ucp1* Expression wird daher als Indikator für eine gesteigerte mitochondriale Aktivität und thermogene Kapazität herangezogen. Die relative Expression von *ucp1* in dem Differenzierungsmodell von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten unter Curcuminbehandlung ist in Abbildung 50 dargestellt.

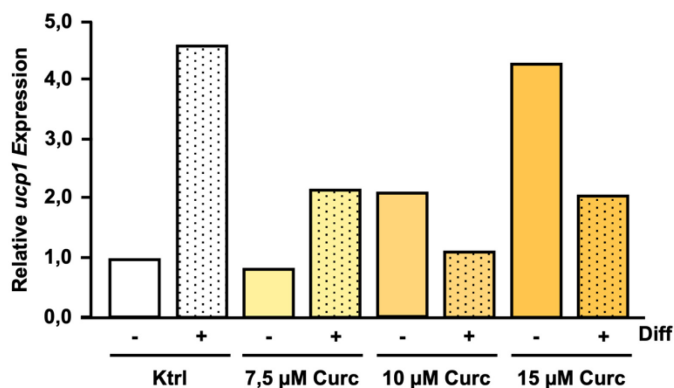


Abbildung 50: **Relative *ucp1* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Curcuminbehandlung.** 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Curcumin (7,5 μM, 10 μM, 15 μM Curc) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Ktrl) behandelt. Die Expression von *ucp1* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Curcumin (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt.  $n=1$

Die Abbildung 50 deutet auf eine Hochregulation von *ucp1* in differenzierten 3T3-L1 Zellen gegenüber der unbehandelten, undifferenzierten Kontrolle hin. Die alleinige Behandlung undifferenzierter Präadipozyten mit 15 μM Curcumin führt anscheinend zu einer relativen *ucp1* Expression, die der in der differenzierten Kontrolle ähnelt, was auf eine thermogene Umprogrammierung undifferenzierter 3T3-L1 Zellen hinweisen könnte.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Pilotdaten im 3T3-L1 Differenzierungsmodell eine konsistente Hochregulation der Gene *sod2*, *cidea*, *ppary* und *ucp1* durch die Adipogenese. Curcumin scheint unterschiedliche Effekte auszulösen. In undifferenzierten Präadipozyten scheint es die Expression von *cidea* konzentrationsabhängig zu verringern und in zwei unterschiedlichen der eingesetzten Konzentration die Transkriptmengen von *pgc1α* und *ucp1* zu erhöhen. In differenzierten Zellen hingegen scheint es die Expression von *ppary* abhängig von der Konzentration herabzusetzen. Aufgrund der geringen Zahl biologischer Replikate müssen diese Befunde jedoch als vorläufig betrachtet und in zukünftigen Studien mit größerer Stichprobe und funktionellen Analysen validiert werden.

Nach der Charakterisierung der Curcumin-abhängigen Effekte auf Differenzierung, Redoxhomöostase und thermogene Programmierung in 3T3-L1 Adipozyten wurde im nächsten Schritt derselbe Versuchsaufbau genutzt, um potenzielle Wirkungen von Koffein auf diese Prozesse zu untersuchen.

### 3.8.2 Einfluss von Koffein auf die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten

Da Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Adipogenese und der thermogenen Aktivität spielen (Wilson-Fritch et al., 2003) und Koffein mitochondriale Effekte in Endothelzellen zeigte, wurde untersucht, ob Koffein auch die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten beeinflussen kann.

Dazu wurde die Expression der gleichen Gene wie im Kapitel zuvor untersucht (Abbildung 51 bis Abbildung 55).

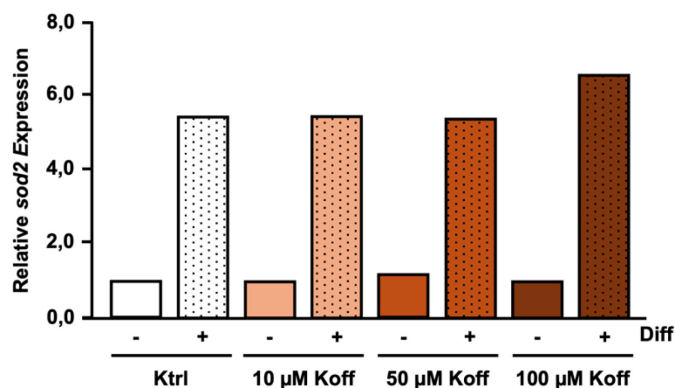


Abbildung 51: *Relative sod2 Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Koffeinbehandlung.* 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Koffein (10 µM, 50 µM, 100 µM Koff) behandelt. Die Kontrolle (Ktrl) blieb unbehandelt. Die Expression von *sod2* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die mittlere relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Koffein (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte. n=2

In Abbildung 51 zeigt sich in allen Bedingungen eine deutliche Hochregulation der relativen *sod2* Expression durch die Differenzierung, wohingegen Koffein keine Effekte hervorzurufen scheint.

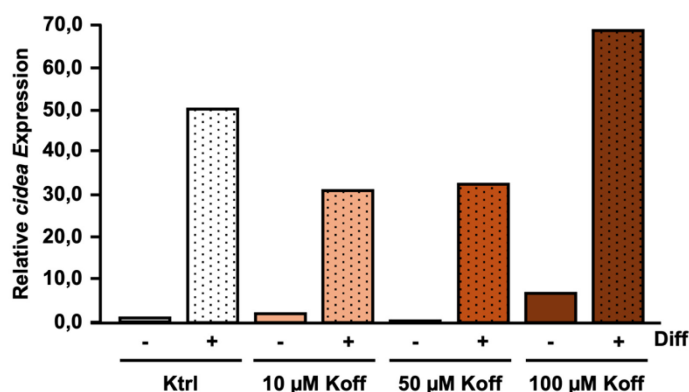


Abbildung 52: *Relative cidea Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Koffeinbehandlung.* 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Koffein (10 µM, 50 µM, 100 µM Koff) behandelt. Die Kontrolle (Ktrl) blieb unbehandelt. Die Expression von *cidea* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Koffein (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. n=1

Die *cidea* Expression in undifferenzierten 3T3-L1 Zellen ist sehr gering, steigt jedoch anscheinend unter 100 µM Koffein an. In differenzierten Zellen hingegen ist *cidea* deutlich höher exprimiert. Durch die Koffeinbehandlung kommt es in differenzierten Zellen bei 10 µM und 50 µM Koffein im Vergleich zur differenzierten Kontrolle anscheinend zu einer leicht verminderten *cidea* Expression, während 100 µM Koffein in diesen Pilotdaten mit einer weiteren Steigerung der relativen *cidea* Expression assoziiert zu sein scheint (Abbildung 52), was auf eine mögliche Verstärkung der Differenzierungsabhängigen Kapazität zur Lipidtröpfchen Expansion hinweist.

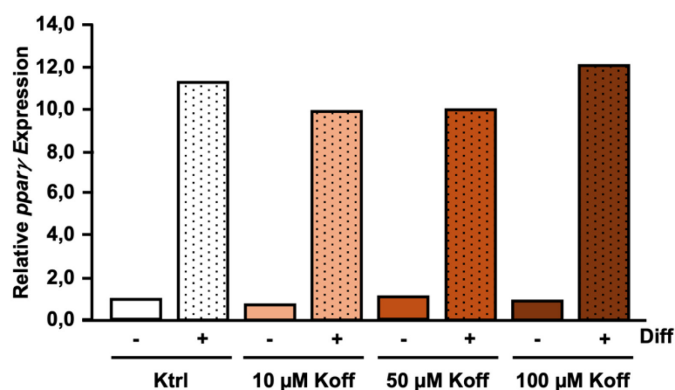


Abbildung 53: Relative *pparγ* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Koffeinbehandlung. 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Koffein (10 μM, 50 μM, 100 μM Koff) behandelt. Die Kontrolle (Ktrl) blieb unbehandelt. Die Expression von *pparγ* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die mittlere relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Koffein (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte.  $n=2$

In allen Bedingungen ist *pparγ* in differenzierten Zellen deutlich höher exprimiert als in den jeweiligen undifferenzierten Kontrollen, was die erfolgreiche adipogene Differenzierung widerspiegelt. Unter Koffeinbehandlung bleibt die Expression von *pparγ* in differenzierten Zellen auf einem vergleichbaren Niveau wie in der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 53).

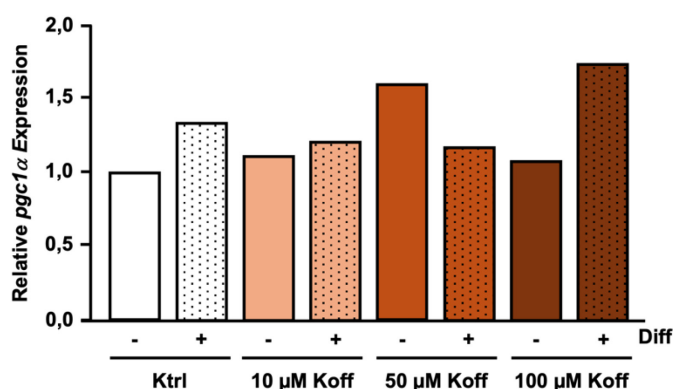


Abbildung 54: Relative *pgc1α* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Koffeinbehandlung. 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Koffein (10 μM, 50 μM, 100 μM Koff) behandelt. Die Kontrolle (Ktrl) blieb unbehandelt. Die Expression von *pgc1α* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die mittlere relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Koffein (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte.  $n=2$

Diese Pilotdaten zeigen weder in der Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten noch unter Koffeinbehandlung eine ausgeprägte Veränderung der relativen *pgc1α* Expression (Abbildung 54). Die beobachteten leichten Schwankungen bei einzelnen Konzentrationen sind gering und lassen sich nicht als konsistenter, Koffein-abhängiger Effekt interpretieren.

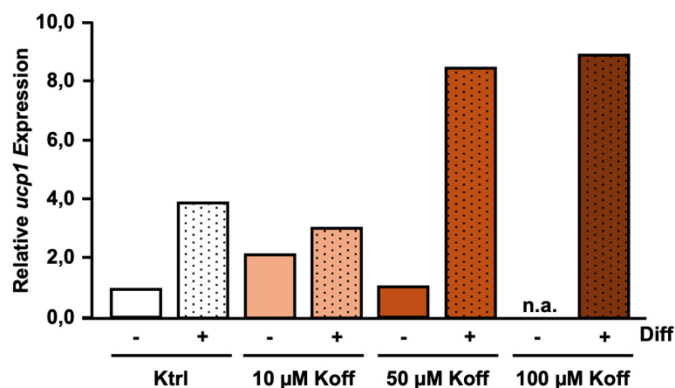


Abbildung 55: Relative *ucp1* Expression in undifferenzierten und differenzierten 3T3-L1 Zellen nach Koffeinbehandlung. 3T3-L1 Präadipozyten wurden über 7 Tage differenziert (Diff +) bzw. in Kontrollmedium belassen (Diff -) und jeden zweiten Tag mit verschiedenen Konzentrationen Koffein (10 µM, 50 µM, 100 µM Koff) behandelt. Die Kontrolle (Ktrl) blieb unbehandelt. Die Expression von *ucp1* wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR gemessen und auf RPL32 normalisiert; die relative Expression in den undifferenzierten Zellen ohne Koffein (Ktrl) wurde auf 1 gesetzt. n=1; n.a.= nicht auswertbar

In der unbehandelten Kontrolle ist die relative Expression von *ucp1* in differenzierten Zellen gegenüber undifferenzierten Zellen erhöht, ebenso unter 10 µM Koffein. Die Behandlung mit 50 µM und 100 µM Koffein ist in differenzierten Zellen mit einer ausgeprägten weiteren Zunahme der relativen *ucp1* Expression assoziiert. Für 100 µM Koffein in undifferenzierten Zellen können hingegen keine verlässlichen Angaben gemacht werden, da die qRT-PCR in dieser Bedingung keine zuverlässigen Werte lieferte. Insgesamt deuten die vorliegenden Pilotdaten damit darauf hin, dass höhere Koffeinkonzentrationen in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten die relative *ucp1* Expression und damit potenziell die thermogene Kapazität verstärken könnten.

Zusammenfassend zeigen auch diese Pilotdaten im 3T3-L1 Differenzierungsmodell, dass die Differenzierung selbst der primäre Einflussfaktor für die Hochregulation von *sod2*, *pparγ*, *cidea* und *ucp1* ist und durch Koffein insgesamt nur gering beeinflusst wird. Während die relativen Expressionen der *sod2* und *pparγ* in differenzierten Zellen konsistent erhöht sind und unter Koffein keine klaren, konzentrationsabhängigen Veränderungen aufweisen, deuten die Daten der relativen *cidea* Expression und insbesondere der relativen *ucp1* Expression auf eine mögliche Verstärkung der Lipidtröpfchen Expansion und thermogenen Kapazität durch hohe Koffeinkonzentrationen in differenzierten Adipozyten hin. Aufgrund der begrenzten Datengrundlage mit niedriger Replikatzahl müssen diese Effekte jedoch als vorläufige Hinweise gewertet und in zukünftigen Experimenten systematisch überprüft werden.

## 4. Diskussion

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss von den Pflanzeninhaltsstoffen Curcumin und Koffein auf das Endothel sowie auf Endothelzellseneszenz und in Pilotexperimenten zur Adipozytendifferenzierung. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen: Ein Nrf2-abhängiges Luziferase-Reportersystem wurde hergestellt und validiert, wobei 7,5 µM Curcumin in Kurzzeitbehandlungen die Nrf2-Aktivität sowie die MnSOD-Proteinmenge in humanen Endothelzellen steigerte, während 50 µM Koffein keinen Effekt auf die Nrf2-Aktivität oder MnSOD-Proteinmenge zeigte. Stress-induzierte und niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierte Endothelzellseneszenz führte zu keiner Änderung auf Transkriptionsebene von Genen die in der Endothelzellseneszenz, der Redoxhomöostase und der Endothelzellfunktion eine wesentliche Rolle spielen. Langzeitbehandlungen mit 500 nM Curcumin zeigte keinen Effekt in der Stress-induzierten Endothelzellseneszenz auf die Gesamtproteinmenge der untersuchten Proteine, jedoch schien es auf der Ebene einzelner Zellen dem entgegenwirken zu können. Koffein inhibierte die Endothelzellseneszenz Stimulus unabhängig. Pilotexperimente zur Adipozytendifferenzierung zeigten eine Hochregulation von *sod2*, *ppary*, *cidea* und *ucp1* durch die Differenzierung, sowie Effekte einzelner Curcumin- und Koffeinkonzentrationen, die noch bestätigt werden müssen. Im Folgenden werden diese Ergebnisse detailliert diskutiert.

### 4.1 Design und Testung des Nrf2-abhängigen Reportersystems

Bisherige Befunde zur Curcumin-induzierten Nrf2-Stabilisierung und MnSOD-Hochregulation in Endothelzellen stellten nur indirekte Hinweise auf die transkriptionelle Aktivität dar (Brinkmann et al., 2022). Zur direkten, sequenzspezifischen Messung wurde in dieser Arbeit ein Nrf2-abhängiges Luziferase-Reporterkonstrukt mit AREs und mutierten AREs als Spezifitätskontrolle etabliert, welches in diesem Format kommerziell nicht erhältlich ist.

Zur direkten Messung der Nrf2-abhängigen Transkription wurde ein Reportersystem basierend auf zwei in Tandem angeordneten Kopien eines AREs aus dem Promotor des Glutathion-S-Transferase alpha 1 (Ya) Gens (*GSTa1*) der Maus vor den Minimalpromotor des pTATA LUC+ Reportervektors (Altschmied & Duschl, 1997) kloniert. Die Funktionalität dieses AREs war in Reporterassays durch tBHQ-induzierte Aktivierung nachgewiesen worden (Wasserman & Fahl, 1997). Zudem sollte die Nutzung von zwei AREs – wie für andere transkriptionsregulatorische Elemente schon gezeigt – zu synergistischen Effekten führen (Schüle et al., 1988) und damit die Sensitivität des Reportersystems erhöhen. Zudem war gezeigt worden, dass die kooperative Bindung von Nrf2-sMaf-Heterodimeren an benachbarte AREs den Transkriptionskomplex stabilisiert und eine stärkere Induktion als bei Einzel-AREs bewirkt. Dies erklärt sich dadurch, dass die Besetzung eines AREs durch ein Nrf2-Maf Heterodimer das Binden der Transkriptionsfaktoren an benachbarter AREs erleichtert (Zhang et al., 2010).

Während in der Literatur tandemartige ARE-Reporter als etabliertes Werkzeug zur Untersuchung der Nrf2-Aktivität beschrieben worden waren (Ungvari et al., 2010; Zhang et al., 2013), erfolgte die Validierung der Spezifität dort meist ausschließlich über funktionelle Modulation des Nrf2-Signalweges, wie z.B. Keap1-Überexpression oder Nrf2-Knockdown (Ungvari et al., 2010). Eine direkte Kontrolle der

Sequenzspezifität des ARE-Elements wurde in solchen Systemen jedoch nicht vorgenommen. Um diese methodische Lücke zu schließen und Nrf2-abhängige Transkription unabhängig von genetischen Eingriffen am Signalweg zu erfassen, wurde in dieser Arbeit ein mutiertes Kontrollkonstrukt nach dem gleichen Design hergestellt. Die ARE-Sequenzen wurden gezielt an den invarianten Positionen der ARE-Konsensussequenz, basierend auf der Analyse von 57 funktionellen AREs (Wang et al., 2007), mutiert. Durch zusätzliche Punktmutationen in benachbarten Nukleotiden, die für die transkriptionelle Grundaktivität oder die Induzierbarkeit verantwortlich sind (Erickson et al., 2002; Wasserman & Fahl, 1997), wurde die Spezifitätskontrolle weiter optimiert.

Zunächst wurde durch Titration des Nrf2-Expressionsvektors gezeigt, dass bereits bei sehr niedrigen Plasmidmengen eine nukleäre Lokalisation von Nrf2 möglich ist, was ein essenzielles Kriterium für dessen transkriptionelle Aktivität darstellt. Das Pilotexperiment mit der Co-Transfektion des Reporterkonstrukt  $p(\text{ARE})_2\text{TATA LUC}+$  und dem mutierten Konstrukt  $p(\text{AREmut})_2\text{TATA LUC}+$  sowie einem Nrf2-Expressionsvektor demonstrierte, dass die Steigerung der Luziferaseaktivität ausschließlich auf die intakten ARE-Sequenzen zurückgeht. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Nrf2-spezifische Transkriptionsaktivierung unterstreicht die Funktionalität und Spezifität des entwickelten Reportersystems, das inzwischen auch in weiteren Studien erfolgreich angewandt wurde (Jakobs et al., 2024).

Allerdings ist zu bedenken, dass die ARE-Region des *GSTa1*-Promotors auch Bindemotive für den Transkriptionsfaktor AP-1 enthält (Friling et al., 1992). Da sich die Konsensussequenzen von ARE- und AP-1-Elementen teilweise überschneiden, reagieren beide auf ähnliche redoxabhängige Stimuli (Soriano et al., 2009). Ob AP-1 auch an die in dieser Arbeit eingesetzten, mutierten ARE-Sequenzen bindet, wurde bislang nicht experimentell untersucht. Aufgrund der eingeführten Punktmutationen an für die Nrf2-Erkennung konservierten Positionen sowie der in der Co-Transfektion mit dem Nrf2-Expressionsvektor beobachteten starken Aktivitätssteigerung ausschließlich im intakten Konstrukt ist eine relevante AP-1-abhängige Beteiligung jedoch unwahrscheinlich.

Mit der Etablierung des Nrf2-abhängigen Luziferase-Reportersystems konnten in dieser Arbeit erstmals in primären humanen Endothelzellen Aussagen zur sequenzspezifischen transkriptionellen Aktivierung durch Nrf2 getroffen werden. Dies stellt gegenüber häufig verwendeten, weniger spezifischen Readouts wie der Gesamt-Nrf2-Proteinmenge oder der Expression einzelner Zielgene einen methodischen Fortschritt dar. Dieses Design schließt die Lücke kommerzieller Reporter und bietet eine wertvolle Grundlage für die weitere Erforschung therapeutischer Ansätze, die auf die Modulation von Nrf2 abzielen.

## 4.2 Kurzzeitexperimente mit 7,5 $\mu\text{M}$ Curcumin

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Curcumin in primären humanen Endothelzellen den Transkriptionsfaktor Nrf2 funktionell aktiviert. Die Behandlung der Zellen mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin führte zu einer ausgeprägten Steigerung der Nrf2-abhängigen Luziferaseaktivität im neu etablierten Reportersystem. Parallel dazu zeigte die Immunfluoreszenzanalyse eine vermehrte Kernlokalisation von endogenem Nrf2, und in den Immunoblots ließ sich eine signifikante Hochregulation der MnSOD nachweisen. Zusammengefasst belegen diese Befunde, dass eine

einmalige Behandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin eine spezifische Aktivierung von Nrf2 in Endothelzellen vermittelt und nachgeschaltete antioxidative Zielgene stimuliert.

Curcumin wird seit vielen Jahren als potenziell gefäßprotektiver Pflanzenstoff diskutiert, da zahlreiche experimentelle und klinische Studien eine Verbesserung der Endothelfunktion, eine Abschwächung entzündlicher Prozesse und eine Reduktion oxidativen Stresses beschreiben (Changal et al., 2020; Cox et al., 2022; Karimian et al., 2017). In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Curcumin Nrf2 stabilisiert, dessen Kerntranslokation fördert und die Expression von MnSOD erhöht (Brinkmann et al., 2022). Die vorliegenden Daten ergänzen diese Befunde, indem sie mit Hilfe eines spezifischen Nrf2-Reportersystems einen direkten Nachweis der transkriptionellen Aktivität von Nrf2 nach Curcuminbehandlung liefern. Die Beobachtung, dass ausschließlich das Reporterplasmid mit intakten ARE-Sequenzen, nicht jedoch das mutierte Kontrollkonstrukt, auf Curcumin mit einer deutlichen Zunahme der Luziferaseaktivität reagiert, beweist die Spezifität.

Die durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesene Kerntranslokation von endogenem Nrf2 blieb trotz Transfektion des Reporterplasmids unbeeinträchtigt, was darauf hindeutet, dass das Reportersystem die physiologischen Regulationsmechanismen des Nrf2-Signalwegs nicht stört. Die parallel beobachtete Hochregulation der MnSOD-Proteinmenge liefert einen molekularen Beleg dafür, dass die Nrf2-Aktivierung nicht auf der Ebene der Reporterfunktion stehenbleibt, sondern in eine verstärkte Expression endogener Zielgene übersetzt wird. Dies spricht dafür, dass Curcumin unter diese Bedingungen die antioxidative Kapazität des Endothels stärkt und somit zur Stabilisierung der Redoxhomöostase beitragen kann.

Die Nrf2-Aktivierung durch Curcumin wurde in zahlreichen Arbeiten auf dessen elektrophile Eigenschaften zurückgeführt, die eine kovalente Modifikation des Keap1-Cysteins Cys151 ermöglichen und dadurch die Ubiquitinierung sowie den proteasomalen Abbau von Nrf2 hemmen (Shin et al., 2020). Ergänzend destabilisiert eine Protein Kinase C Delta (PKC $\delta$ )-vermittelte Phosphorylierung von p62 den Keap1-Nrf2-Komplex und fördert die nukleare Translokation von Nrf2 (Park et al., 2021). Diese Mechanismen wurden bisher vorwiegend in epidermalen und kortikalen Nervenzellen der Maus nachgewiesen. Die in dieser Arbeit durch sequenzspezifische ARE-Reporterkonstrukte nachgewiesene Nrf2-Transkriptionsaktivität sowie die parallele Hochregulation der MnSOD, einem klassischen Nrf2-Zielgen, legen nahe, dass Curcumin auch in primären humanen Endothelzellen über vergleichbare Signalwege wirkt. Eine direkte Überprüfung dieses Mechanismus erfordert jedoch weitere Experimente. Zur Validierung der Curcumin-induzierten Nrf2-Aktivierung könnten zukünftige Untersuchungen eine konstitutiv aktive Nrf2-Mutante einsetzen, die - analog zu den onkogenen Mutationen in Krebszellen beschrieben (Shibata et al., 2008) - Keap1-Bindungsstellen wie ETGE- oder DLG-Motive verändert und somit unabhängig von Keap1-reguliertem Abbau transkriptionell aktiv bleibt. Die Co-Transfektion dieser Mutante mit dem in dieser Arbeit etablierten ARE-Reporter würde eine Nrf2-abhängige Luziferaseaktivität ohne Curcumin-Behandlung erzeugen und klären, ob Curcumin primär über Keap1-Inhibition oder andere Mechanismen der Nrf2-Aktivierung wirkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit weiteren Studien, die Curcumin als Modulator von Transkriptionsfaktoren im Endothel beschreiben. So hemmt Curcumin proinflammatorische Signalwege wie NF- $\kappa\text{B}$  und reduziert die Expression von Adhäsionsmolekülen (Kim et al., 2007),

während antioxidative Signalwege über Nrf2 verstärkt werden. Darüber hinaus wurden für andere Polyphenole wie Resveratrol und Equol ebenfalls Nrf2-abhängige Effekte in Gefäßzellen beschrieben (Ungvari et al., 2010; Zhang et al., 2013), was die Bedeutung dieses Signalwegs als gemeinsamen Angriffspunkt pflanzlicher Inhaltsstoffe unterstreicht.

Zusammenfassend belegt die vorliegende Arbeit erstmals in primären humanen Endothelzellen eine direkte, sequenzspezifische Nrf2-Transkriptionsaktivierung durch Curcumin und liefert damit einen mechanistischen Beitrag zum Verständnis seiner gefäßprotektiven Wirkungen. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Untersuchung einer Langzeitbehandlung mit Curcumin in Endothelzellen.

### 4.3 Kurzzeitexperimente mit 50 $\mu$ M Koffein

In Kurzzeitexperimenten konnte gezeigt werden, dass Koffein im Gegensatz zu Curcumin weder die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 noch dessen subzelluläre Lokalisation in primären humanen Endothelzellen beeinflusst. Weder im Nrf2-abhängigen Luziferase-Reportersystem noch in der Immunfluoreszenzfärbung ergaben sich Hinweise auf eine erhöhte Nrf2-Stabilisierung oder vermehrte Kerntranslokation nach Behandlung mit 50  $\mu$ M Koffein. Auch die MnSOD-Proteinmenge blieb nach Kurzzeitbehandlung mit Koffein unverändert. Diese Befunde schließen eine Aktivierung des Nrf2-Signalwegs in Endothelzellen durch die Kurzzeitbehandlung mit 50  $\mu$ M Koffein aus.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, in denen für Koffein bei physiologisch relevanten Konzentrationen von 30 - 50  $\mu$ M vor allem eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion und der migratorischen Kapazität von Endothelzellen beschrieben wurde (Spyridopoulos et al., 2008). Ale-Agha et al. konnten zeigen, dass Koffein über eine Phosphorylierung und mitochondriale Translokation des Zellzyklusinhibitors p27 die Atmungskettenfunktion verbessert (Ale-Agha et al., 2018). Spyridopoulos et al. konnten die positiven Effekte von Koffein im Endothel über einen AMPK-abhängigen Signalweg zeigen. Orefice et al. beschreiben das regelmäßige Kaffeekonsum das Überleben und die Vitalität endothelialer Vorläuferzellen über den A2AR/SIRT3/AMPK-Signalweg fördert (Orefice et al., 2024). Obwohl ein AMPK-Nrf2-Crosstalk in der zellulären Homöostase beschrieben ist (Petsouki et al., 2022), schließen die fehlende Nrf2-Aktivierung mittels Reporterkonstrukt, nicht vorhandene Nrf2-Kerntranslokation und unveränderte MnSOD-Proteinmenge nach Koffeinbehandlung einen Nrf2-abhängigen Signalweg aus.

Zusammenfassend zeigte Koffein in den hier untersuchten Kurzzeitexperimenten im Gegensatz zu Curcumin weder eine Aktivierung von Nrf2 noch eine Zunahme der MnSOD-Proteinmenge, was darauf hinweist, dass die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte von Koffein auf Endothelfunktion und Mitochondrienfunktion über Nrf2-unabhängige Signalwege vermittelt werden.

### 4.4 Einfluss von Curcumin auf die Endothelzellseneszenz

In den Seneszenzexperimenten dieser Arbeit induzierte eine zweiwöchige Behandlung primärer humaner Endothelzellen mit niedrigen  $H_2O_2$ -Konzentrationen oder niedrig-Dosis Endotoxämie einen seneszenten Phänotyp, charakterisiert durch p21-Hochregulation und eNOS-Herunterregulation auf Proteinebene, während auf RNA-Ebene keine signifikanten Veränderungen beobachtet wurden. Die parallele Behandlung mit 500 nM Curcumin modulierte diese Marker jedoch weder auf RNA- noch auf Proteinebene signifikant.

Während die p21-Immunoblots der niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierten seneszenten Zellen keine Modulation durch Curcumin zeigten, deuteten die Immunfluoreszenzfärbungen jedoch auf eine potenzielle Hemmung der nukleären Lokalisation von p21 durch Curcumin hin. Diese Diskrepanz lässt sich u.a. durch methodische Unterschiede erklären: Immunoblots erfassen die Gesamtproteinmenge und sind wenig sensitiv für Veränderungen in Subpopulationen (Quadri, 2015), wohingegen die Immunfluoreszenzfärbung zelluläre Heterogenität sichtbar macht und auch Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von p21 abbildet (Waters, 2009). Generell könnte biologische Heterogenität eine Rolle spielen, da seneszente und nicht seneszente Zellen im Gefäß koexistieren. Curcumin könnte selektiv auf weniger stark vorgeschädigte Zellen wirken ohne aber den mittels Immunblot ermittelten Gesamtdurchschnitt an seneszenten und nicht seneszenten Zellen zu verändern (Seshadri et al., 2025). Zukünftig könnte die subzelluläre Verteilung von p21 auch im Immunblot nachgewiesen werden. Dadurch müsste zunächst eine Fraktionierung in nukleärer und nicht-nukleäre Zellfraktionen durchgeführt werden. Durch diese Vorgehensweise könnte untersucht werden, ob sich die in der Immunfluoreszenz erhobenen Daten bestätigt werden können.

Die Beobachtung, dass 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin in Kurzzeitexperimenten die Expression von MnSOD erhöht, während eine Langzeitbehandlung mit 500 nM Curcumin keinen Effekt auf die Gesamtproteinmenge zeigt, lässt sich durch dosis- und zeitabhängige Wirkungen erklären. Höhere Curcuminkonzentrationen stabilisieren den Transkriptionsfaktor Nrf2 und aktivieren die Expression antioxidativer Zielgene wie MnSOD, während niedrigere Konzentrationen in chronischen Experimenten möglicherweise nicht ausreichend starke Signale liefern, um eine messbare Hochregulation der MnSOD im Gesamtlisat zu induzieren (Zia et al., 2021). In Makrophagen wurde gezeigt, dass 5 und 25  $\mu\text{M}$  Curcumin initial Nrf2 aktiviert, was zur Hochregulation antioxidativer Gene führt, mit fortschreitender Exposition jedoch die Glutathion-Pools erschöpft werden und die Nrf2-Aktivität wieder abnimmt; GSH-Supplementation konnte diesen Effekt teilweise aufheben (Kunwar et al., 2009). Überträgt man diese Mechanismen auf seneszente Endothelzellen, für die bereits beschrieben wurde, dass reduzierte GSH Spiegel vorliegen (Han & Kim, 2023; Sun et al., 2018), könnte dies erklären, warum eine langfristige, niedrig dosierte Curcuminbehandlung keine Hochregulation von MnSOD in der untersuchten niedrig-Dosis Endotoxämie-induzierten Seneszenz zeigte.

Die Literatur zu Curcumin im Endothel zeichnet insgesamt ein widersprüchliches Bild, das stark vom experimentellen Kontext abhängt. Zahlreiche Studien beschreiben protektive Effekte insbesondere in Modellen akuten oxidativen Stresses. So konnte eine 24-stündige Vorbehandlung von Endothelzellen mit 25  $\mu\text{M}$  Curcumin eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte vorzeitige Seneszenz abschwächen, was sich in einer reduzierten SA- $\beta$ -Gal-Aktivität, verminderter p21 Expression und gesteigerter Zellproliferation äußerte; vermittelt wurden diese Effekte über die Aktivierung von SIRT1 und eine verbesserte Stressresistenz (Sun et al., 2015). Darüber hinaus zeigen weitere Arbeiten, dass Curcumin oxidativen Stress reduziert und entzündungsassoziierte Signalwege moduliert, unter anderem über AMPK-abhängige Mechanismen (Ouyang et al., 2019; Zhao et al., 2021). In akuten Stressmodellen schützt Curcumin die Endothelzellen, indem es die Pyroptose, eine entzündliche Form des programmierten Zelltods, hemmt und die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms reduziert (Yuan et al., 2022). Die Unterdrückung des NLRP3-Inflammasoms begrenzt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und wird als zentraler

Mechanismus der anti-inflammatorischen Wirkung von Curcumin diskutiert, insbesondere in Modellen akuter Entzündung oder Sepsis (Gong et al., 2015).

Demgegenüber existieren jedoch auch Studien, die einen hemmenden oder sogar schädlichen Einfluss von Curcumin auf Endothelzellen beschreiben. Grabowska et al. zeigten, dass Curcumin in humanen vaskulären Zellen dosisabhängig wirkt. Vergleichsweise hohe Konzentrationen von 2,5 - 5  $\mu\text{M}$  führten zu einer leichten Hemmung der Zellproliferation und einer Zunahme seneszenzassoziierter Marker, während noch höhere Dosen über 10  $\mu\text{M}$  zytotoxisch waren (Grabowska et al., 2015). Forschungen haben zudem gezeigt, dass 10  $\mu\text{M}$  Curcumin Seneszenz induzieren kann. Im Falle von Tumorzellen kann dies als eine Art der Krebsbekämpfung angesehen werden (Mosieniak et al., 2012). Jedoch in vaskulären Zellen konnten niedrige Curcuminkonzentrationen zwischen 0,1 und 1  $\mu\text{M}$  zwar die Expression von Sirtuinen erhöhen, jedoch nicht die Seneszenz verzögern (Grabowska et al., 2016). Dies unterstreicht, dass Curcumin zwar zelluläre Stressmechanismen moduliert, seine Wirkung auf seneszenzente Zellen jedoch begrenzt zu sein scheint, was mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit konsistent ist. Liu et al. beobachteten dass ein Curcumin-Analogon ab 20  $\mu\text{M}$  und höher potenziell die Angiogenese in Endothelzellen hemmt, indem es Migration, Tube Formation und Proliferation durch ROS-abhängigen Endothelzelltod stark inhibiert, was im Alter zur Dysfunktion führt (Graves & Baker, 2020; Liu et al., 2019). Weitere Arbeiten zeigten eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation endothelialer Vorläuferzellen im Bereich von 1 bis 50  $\mu\text{M}$  Curcumin (Vyas et al., 2015), was die vaskuläre Regeneration beeinträchtigen und Alterungsprozesse fördern kann (Reutersberg et al., 2022).

Ein zentraler Erklärungsansatz für diese widersprüchlichen Befunde ist die ausgeprägte Dosisabhängigkeit der Curcumin-Wirkung. Humanstudien zeigen positive Wirkungen von Curcumin auf die Endothelfunktion, wie Aggarwal et al. zusammenfassen, wo orale Dosen (4-8 g/Tag) proinflammatorische Biomarker wie TNF- $\alpha$  senken und vaskuläre Parameter verbessern (Aggarwal et al., 2013). Allerdings blieben in Studien mit niedrigen Serumkonzentrationen Effekte aus. Ringman et al. zeigten bei 2-4 g/Tag Serumspiegel von nur 7,32 ng/ml Curcumin ohne klinische oder biomarkerbasierte Verbesserungen bei Alzheimer-Patienten, und Baum et al. bei 1 g/Tag über 4 Monate keine Kognition- oder Biomarker-Veränderungen (Baum et al., 2008; Ringman et al., 2012). Die vorliegende Arbeit mit 500 nM Curcumin, welche physiologisch vergleichbar niedrig ist, zeigt daher wahrscheinlich keine Curcumineffekte. Dies unterstreicht die Notwendigkeit höherer Konzentrationen für therapeutische Effekte in gestressten Gefäßzellen.

Ein weiterer limitierender Faktor für die Wirksamkeit von Curcumin *in vivo* ist seine schlechte Wasserlöslichkeit und ausgeprägte Metabolisierung. Nach oraler Aufnahme wird Curcumin zügig in der Leber und im Darm metabolisiert, wodurch nur geringe Mengen des freien Wirkstoffs in den systemischen Kreislauf gelangen. Selbst hohe orale Dosen führen daher nur zu niedrigen Spiegeln im Serum, die zudem stark zwischen Individuen variieren (Cheng et al., 2001; Dei Cas & Ghidoni, 2019; Lao et al., 2006). Diese pharmakokinetischen Eigenschaften erschweren die direkte Übertragbarkeit beobachteter Effekte in Zellen auf den Organismus und unterstreichen die Notwendigkeit verbesserter Formulierungen wie Liposomen, Mizellen oder Nanopartikel, um die Bioverfügbarkeit zu erhöhen und

die Wirksamkeit von Curcumin zu optimieren (Prasad et al., 2014). Zudem deuten die leichten Effekte auf p21 auf Einzelzellebene an, dass Curcumin scheinbar Effekte hat, was zukünftige Untersuchungen im Hinblick auf präventive Strategien und verbesserte Formulierungen (z. B. Liposomen, Nanopartikel) relevant macht.

## 4.5 Einfluss von Koffein auf die Endothelzellseneszenz

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine zweiwöchige Behandlung primärer humaner Endothelzellen mit 10  $\mu$ M Koffein die Induktion von Seneszenz sowohl durch wiederholte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition als auch durch niedrig-Dosis Endotoxämie effektiv verhindert. Konkret verhinderte Koffein die Seneszenz-assoziierte Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21, während es unter Kontrollbedingungen keinen Einfluss auf die p21-Proteinmenge hatte. Parallel dazu konnte Koffein dem Verlust der eNOS entgegenwirken, der in seneszenten Zellen typischerweise auftritt, und somit potenziell die NO-Produktion erhalten. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Koffein auf Stress-induzierte Signalwege wirkt, die zur Etablierung des seneszenten Phänotyps führen, und gleichzeitig essenzielle Endothelfunktionen stabilisiert.

Diese experimentellen Ergebnisse korrespondieren mit epidemiologischen Studien, die einen Zusammenhang zwischen moderatem Kaffeekonsum und einer verminderten kardiovaskulären Mortalität aufzeigen (Freedman et al., 2012; Gunter et al., 2017). Allerdings ist hierbei zu beachten, dass Kaffee zahlreiche bioaktive Substanzen enthält und die Schutzwirkung nicht allein auf Koffein zurückgeführt werden kann. Klinische Studien mit reiner Koffeingabe konnten jedoch auch eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation, gesteigerte eNOS-Aktivität, erhöhte NO-Produktion und eine Reduktion von Entzündungsmarkern nachweisen (Shechter et al., 2011; Umemura et al., 2006). Diese Effekte werden durch die Befunde dieser Arbeit unterstützt, da Koffein auch unter Seneszenz-induzierenden Bedingungen die eNOS-Menge stabilisiert.

Ein zentraler Aspekt bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Endothelzellseneszenz ist die Rolle von mitochondrialer Dysfunktion und der daraus resultierenden vermehrten Produktion von ROS (Jendrach et al., 2005). Wie in der Einleitung beschrieben, führen strukturelle Veränderungen und eine reduzierte Effizienz der mitochondrialen Atmungskette zu erhöhten mtROS, welche DNA-Schäden verursachen und eine DNA-Schadensantwort auslösen (Moiseeva et al., 2009). Diese aktiviert den Tumorsuppressor p53 und den Zellzyklusinhibitor p21, um die Zelle im Zellzyklus zu arretieren. Gleichzeitig aktiviert der durch mitochondriale Dysfunktion bedingte ATP-Mangel die AMP-aktivierte Proteinkinase, wodurch unter anderem auch der proinflammatorische SASP verstärkt wird (Wiley et al., 2016; Ziegler et al., 2015). Dieser „vicious cycle“ aus mitochondrialer Schädigung und erhöhter ROS-Produktion trägt wesentlich zur Progression der Seneszenz bei (Fukui & Moraes, 2008).

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Koffein die Migrationsfähigkeit humaner Endothelzellen erhöht. Mechanistisch beruht dieser Effekt auf einer Translokation des Zellzyklusinhibitors p27 in die Mitochondrien, wobei sowohl die basale als auch die koffeininduzierte Migrationsfähigkeit endothelialer Zellen vollständig von mitochondrialem p27 abhängig ist (Ale-Agha et al., 2018; Spyridopoulos et al., 2008). *In vivo* verbesserte Koffein die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette im Herzen von Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in p27-defizienten Tieren. Besonders

ausgeprägt war dieser Effekt bei alten Mäusen, bei denen die Aktivität der Elektronentransportkette auf das Niveau junger Tiere angehoben werden konnte, was auf eine altersprotektive Wirkung von Koffein hinweist (Ale-Agha et al., 2018). Vor diesem Hintergrund fügen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schlüssig in dieses Modell ein, indem sie zeigen, dass Koffein die Hochregulation von p21 während der Induktion der Endothelzellseneszenz hemmt, möglicherweise durch eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass wir zudem zeigen konnten, dass die dauerhafte Expression von mitochondrialem p27 einen vergleichbaren Seneszenz-hemmenden Effekt zeigte (Merk et al., 2023).

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass Koffein eine vielversprechende Substanz zur Prävention von Endothelzellseneszenz darstellt. Zukünftige Studien sollten sich darauf konzentrieren, die Signalwege zu identifizieren, um zu klären, wie Koffein zur Unterbrechung des seneszenzfördernden „vicious cycle“ und so zur Entwicklung gezielter therapeutischer Strategien gegen vaskuläre Alterung beitragen kann.

## 4.6 Pilotstudie zum Einfluss von Curcumin und Koffein auf die Adipogenese

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Pilotexperimente im 3T3-L1 Differenzierungsmodell dienten der explorativen Untersuchung möglicher Effekte von Curcumin und Koffein auf adipogene, redoxregulatorische und thermogene Programme. Aufgrund der geringen Zahl biologischer Replikate und des explorativen Charakters der Versuche ist eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse erforderlich. Dennoch lassen sich mehrere konsistente Beobachtungen diskutieren, die Ansatzpunkte für weiterführende Studien liefern.

Zunächst bestätigen die vorliegenden Daten die erfolgreiche Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten zu reifen Adipozyten. Die morphologischen Veränderungen mit Ausbildung lipidreicher Zellen sowie die deutliche Hochregulation adipogener Marker wie *ppary* und *cidea* stehen im Einklang mit der etablierten Literatur zur 3T3-L1 Adipogenese (MacDougald & Lane, 1995; Tontonoz et al., 1994). Ergänzend zeigt die konsistente Induktion der relativen *sod2* Expression, dass die Differenzierung mit einer Anpassung der mitochondrialen Redoxhomöostase einhergeht, was den bekannten Anforderungen an einen erhöhten mitochondrialen Stoffwechsel während der Adipogenese entspricht (Higuchi et al., 2013).

Auffällig ist, dass nahezu alle untersuchten Marker, mit Ausnahme von *pgc1α*, durch die Differenzierung hochreguliert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Adipogenese im 3T3-L1 Modell zwar mit einer funktionellen Aktivierung thermogener Effektoren wie *ucp1* einhergeht, jedoch nicht zwingend eine ausgeprägte mitochondriale Biogenese im Sinne einer *pgc1α*-abhängigen Transkriptionsantwort erfordert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Befunden, die zeigen, dass PGC1α zwar die thermogene Kapazität steigert, jedoch nicht zwingend für die Differenzierung oder Basalexpression thermogener Gene erforderlich ist (Uldry et al., 2006; Villena, 2015). Die hier beobachtete Diskrepanz zwischen der *ucp1*-Induktion und unveränderter relativer *pgc1α* Expression spricht somit für ein thermogenes Programm, das zumindest teilweise unabhängig von einer klassischen mitochondrialen Biogenese aktiviert wird.

Im Hinblick auf die Effekte von Curcumin zeigen die Pilotdaten ein heterogenes Bild. Während Curcumin keinen konsistenten Einfluss auf die differenzierungsabhängige Induktion von *sod2* zeigt, deuten die Ergebnisse auf eine tendenzielle Abschwächung adipogener Programme hin. Insbesondere die verminderte relative *cidea* Expression in undifferenzierten Zellen sowie die konzentrationsabhängige Reduktion der relativen *ppary* Expression in differenzierten Zellen sprechen dafür, dass Curcumin adipogene Differenzierungsprozesse modulieren könnte. Auch in der Literatur werden die Effekte von Curcumin auf die Adipogenese kontrovers diskutiert. Es gibt Berichte, die Curcumin antiproliferative und differenzierungshemmende Effekte in verschiedenen Zelltypen zuschreiben (Lee et al., 2009), unter anderem durch eine Suppression von PPAR $\gamma$ -Signalwegen und eine Reduktion der Lipidakkumulation (Ejaz et al., 2009). Die in dieser Arbeit beobachtete tendenzielle Abnahme der relativen *ppary* Expression in differenzierten Zellen unter Curcuminbehandlung steht mit diesen Befunden in Einklang. Allerdings wurde in anderen Studien mit dem gleichen 3T3-L1 Modell eine Hochregulation von *ppary* durch ähnliche Curcuminkonzentrationen beobachtet (Lone et al., 2016). Gleichzeitig zeigen einzelne Konzentrationen Hinweise auf eine Induktion von *pgc1 $\alpha$*  und *ucp1* in undifferenzierten Zellen, was auf eine mögliche frühe metabolische oder thermogene Umprogrammierung hindeuten könnte. *In vivo* Studien an einem Leptinrezeptor-defizienten Mausmodell für Typ-2-Diabetes zeigen, dass Curcumin der mitochondrialen Dysfunktion in Leber- und Nierenmitochondrien entgegenwirkt, was die *ucp1* Hochregulation in diesen Pilotdaten unterstützt (Soto-Urquieta et al., 2014). Die zuvor genannte Studie von Lone et al., die konträre Ergebnisse in der *ppary* Expression fand, stimmt mit der hier gefundenen *ucp1* Hochregulation jedoch überein, was unterstreicht, dass die vorliegenden Ergebnisse aufgrund der geringen Replikatzahl und der fehlenden funktionellen Analysen nicht abschließend bewertet werden können.

Die Koffeinbehandlung zeigte insgesamt geringere Auswirkungen auf klassische adipogene Marker wie *ppary* und *sod2*, was darauf hindeutet, dass Koffein die Adipogenese selbst im 3T3-L1 Modell nicht wesentlich beeinflusst. Auffällig ist jedoch die Zunahme der *cidea* und insbesondere der *ucp1* Expression bei hohen Koffeinkonzentrationen in differenzierten Zellen. Diese Beobachtung könnte auf eine Verstärkung der thermogenen Kapazität reifer Adipozyten hindeuten, ohne dass die Differenzierung an sich verändert wird. Solche Effekte wären konsistent mit bekannten mitochondrien- und stoffwechselmodulierenden Eigenschaften von Koffein und könnten im Kontext eines „Browning“-ähnlichen Phänotyps relevant sein (Velickovic et al., 2019). Acheson und Kollegen zeigten bereits, dass Koffein bzw. Kaffee die metabolische Rate und die Lipidoxidation beim Menschen erhöht, ein Effekt, der über das sympathische Nervensystem vermittelt wird und für die Aktivierung von Thermogenese relevant ist (Acheson et al., 1980). Auch für die hier erhobenen Daten gilt jedoch, dass es sich um vorläufige Hinweise handelt, die in weiteren Untersuchungen validiert werden müssen.

Zusammenfassend zeigen die Pilotexperimente, dass die Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten der dominierende Faktor für die Hochregulation adipogener, redoxregulatorischer und thermogener Marker ist. Curcumin und Koffein scheinen, abhängig von Konzentration und Differenzierungsstatus, einzelne Aspekte dieser Programme zu modulieren, ohne die Adipogenese grundlegend zu verändern. Die Daten liefern damit erste Hinweise darauf, dass insbesondere hohe Koffeinkonzentrationen thermogene Effektorprogramme verstärken könnten, während Curcumin eher abschwächende Effekte

auf adipogene Signalwege zeigt. Diese vorläufigen Befunde sollten daher als Grundlage für zukünftige systematische Untersuchungen dienen.

## 4.7 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit etabliert erstmals ein Nrf2-spezifisches Reportersystem für humane Endothelzellen und belegt eine direkte transkriptionelle Aktivierung durch 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin, jedoch nicht durch 50  $\mu\text{M}$  Koffein. Kurzzeitige Behandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$  Curcumin kann die antioxidative Kapazität des Endothels stärken und somit zur Stabilisierung der Redoxhomöostase beitragen. Während niedrigdosierte Langzeit-Curcuminbehandlung mit 500 nM Seneszenzmarker nicht signifikant moduliert, inhibiert 10  $\mu\text{M}$  Koffein effektiv p21-Hochregulation und eNOS-Verlust in  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und LPS-induzierter Endothelzellseneszenz. Pilotdaten zur 3T3-L1 Adipogenese bestätigen Differenzierungsinduktion durch Hochregulation der Differenzierungsmarker. Curcumin zeigt heterogene Effekte, Koffein verstärkt dosisabhängig *ucp1* und *cidea* in differenzierten Zellen. Die Befunde positionieren Koffein als vielversprechenden Kandidaten zur Seneszenz-Prävention und thermogenen Modulation, während Curcumins therapeutisches Potenzial dosis- und kontextabhängig bleibt.

Dies eröffnet vielversprechende Forschungsrichtungen zur Translation pflanzlicher Inhaltsstoffe in die Prävention vaskulärer Alterung und metabolischer Dysregulation. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus der schützenden Wirkung von Koffein im Seneszenzmodell ist noch nicht vollständig aufgeklärt und könnte daher neue Ansatzpunkte für gezielte Interventionen eröffnen, um der Seneszenzinduktion entgegenzuwirken. Curcumin erfordert optimierte Formulierungen (Nanopartikel, Liposomen) sowie Untersuchung präventiver Strategien um die positiven Kurzzeitwirkungen auf das antioxidative System des Endothels auch in der vaskulären Alterung zu übertragen. Die Adipogenese-Pilotdaten bedürfen systematischer Erweiterung mit erhöhten Replikatzahlen und funktionellen Readouts.

Die vorliegenden Ergebnisse beleuchten das differenzierte Wirkpotenzial pflanzlicher Inhaltsstoffe bei der Regulation endothelialer Seneszenz und adipogener Differenzierung und schaffen die methodische sowie konzeptionelle Basis für zukünftige Forschungsansätze.

## 5. Quellenverzeichnis

- Abreu-Vieira, G., Fischer, A. W., Mattsson, C., de Jong, J. M., Shabalina, I. G., Rydén, M., Laurencikiene, J., Arner, P., Cannon, B., Nedergaard, J., & Petrovic, N. (2015). Cidea improves the metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Nat Commun*, 6, 7433. <https://doi.org/10.1038/ncomms8433>
- Acheson, K. J., Zahorska-Markiewicz, B., Pittet, P., Anantharaman, K., & Jéquier, E. (1980). Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 33(5), 989-997. <https://doi.org/10.1093/ajcn/33.5.989>
- Adriouch, S., Lampuré, A., Nechba, A., Baudry, J., Assmann, K., Kesse-Guyot, E., Hercberg, S., Scalbert, A., Touvier, M., & Fezeu, L. K. (2018). Prospective Association between Total and Specific Dietary Polyphenol Intakes and Cardiovascular Disease Risk in the Nutrinet-Santé French Cohort. *Nutrients*, 10(11), 1587. <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1587>
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Sung, B. (2013). Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *British Journal of Pharmacology*, 169(8), 1672-1692. <https://doi.org/10.1111/bph.12131>
- Ale-Agha, N., Goy, C., Jakobs, P., Spyridopoulos, I., Gonnissen, S., Dyballa-Rukes, N., Aufenvenne, K., von Ameln, F., Zurek, M., Spannbrucker, T., Eckermann, O., Jakob, S., Gorressen, S., Abrams, M., Grandoch, M., Fischer, J. W., Köhrer, K., Deenen, R., Unfried, K., . . . Haendeler, J. (2018). CDKN1B/p27 is localized in mitochondria and improves respiration-dependent processes in the cardiovascular system-New mode of action for caffeine. *PLoS Biology*, 16(6), e2004408. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004408>
- Alotaibi, B. S., Ijaz, M., Buabeid, M., Kharaba, Z. J., Yaseen, H. S., & Murtaza, G. (2021). Therapeutic Effects and Safe Uses of Plant-Derived Polyphenolic Compounds in Cardiovascular Diseases: A Review. *Drug Design, Development and Therapy*, 15, 4713-4732. <https://doi.org/10.2147/dddt.S327238>
- Altschmied, J., & Duschl, J. (1997). Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques*, 23(3), 436-438. <https://doi.org/10.2144/97233bm19>
- Altschmied, J., & Haendeler, J. (2009). Thioredoxin-1 and endothelial cell aging: role in cardiovascular diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(7), 1733-1740. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2379>
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Mohammadinejad, R., Farkhondeh, T., & Samarghandian, S. (2020). Curcumin Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection Against Oxidative Injury. *Current Molecular Medicine*, 20(2), 116-133. <https://doi.org/10.2174/1566524019666191016150757>
- Banerjee, P., Ali, Z., Levine, B., & Fowler, D. R. (2014). Fatal Caffeine Intoxication: A Series of Eight Cases from 1999 to 2009. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 865-868. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1556-4029.12387>
- Baum, L., Lam, C. W., Cheung, S. K., Kwok, T., Lui, V., Tsoh, J., Lam, L., Leung, V., Hui, E., Ng, C., Woo, J., Chiu, H. F., Goggins, W. B., Zee, B. C., Cheng, K. F., Fong, C. Y., Wong, A., Mok, H., Chow, M. S., . . . Mok, V. (2008). Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28(1), 110-113. <https://doi.org/10.1097/jcp.0b013e318160862c>
- Bloom, S. I., Islam, M. T., Lesniewski, L. A., & Donato, A. J. (2023). Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nature Reviews: Cardiology*, 20(1), 38-51. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00739-0>

- Brinkmann, V., Romeo, M., Larigot, L., Hemmers, A., Tschage, L., Kleinjohann, J., Schiavi, A., Steinwachs, S., Esser, C., Menzel, R., Giani Tagliabue, S., Bonati, L., Cox, F., Ale-Agha, N., Jakobs, P., Altschmied, J., Haendeler, J., Coumoul, X., & Ventura, N. (2022). Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent and -Independent Pathways Mediate Curcumin Anti-Aging Effects. *Antioxidants (Basel)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/antiox11040613>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277-359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Changal, K. H., Khan, M. S., Bashir, R., & Sheikh, M. A. (2020). Curcumin Preparations Can Improve Flow-Mediated Dilation and Endothelial Function: A Meta-Analysis. *Complement Med Res*, 27(4), 272-281. <https://doi.org/10.1159/000506180> (Curcuminhaltige Präparate können die flussvermittelte Vasodilatation und die Endothelfunktion verbessern: Eine Metaanalyse.)
- Chen, J., Huang, X., Halicka, D., Brodsky, S., Avram, A., Eskander, J., Bloomgarden, N. A., Darzynkiewicz, Z., & Goligorsky, M. S. (2006). Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(4), H1575-1586. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00364.2005>
- Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., Ho, Y. F., Shen, T. S., Ko, J. Y., Lin, J. T., Lin, B. R., Ming-Shiang, W., Yu, H. S., Jee, S. H., Chen, G. S., Chen, T. M., Chen, C. A., Lai, M. K., Pu, Y. S., Pan, M. H., Wang, Y. J., . . . Hsieh, C. Y. (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Research*, 21(4b), 2895-2900.
- Cheng, C. K., Ding, H., Jiang, M., Yin, H., Gollasch, M., & Huang, Y. (2023). Perivascular adipose tissue: Fine-tuner of vascular redox status and inflammation. *Redox Biol*, 62, 102683. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102683>
- Coban, D., Milenkovic, D., Chanut, A., Khallou-Laschet, J., Sabbe, L., Palagani, A., Vanden Berghe, W., Mazur, A., & Morand, C. (2012). Dietary curcumin inhibits atherosclerosis by affecting the expression of genes involved in leukocyte adhesion and transendothelial migration. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(8), 1270-1281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mnfr.201100818>
- Cosselman, K. E., Navas-Acien, A., & Kaufman, J. D. (2015). Environmental factors in cardiovascular disease. *Nature Reviews: Cardiology*, 12(11), 627-642. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.152>
- 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). <https://doi.org/10.3390/cells11030342>
- Daly, J. W. (2007). Caffeine analogs: biomedical impact. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(16), 2153-2169. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7051-9>
- Dehzad, M. J., Ghalandari, H., Nouri, M., & Askarpour, M. (2023). Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin/turmeric supplementation in adults: A GRADE-assessed systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Cytokine*, 164, 156144. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156144>
- Dei Cas, M., & Ghidoni, R. (2019). Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential. *Nutrients*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nu11092147>
- Duan, W., Yang, Y., Yan, J., Yu, S., Liu, J., Zhou, J., Zhang, J., Jin, Z., & Yi, D. (2012). The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Basic Research in Cardiology*, 107(3), 263. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0263-7>

- Ejaz, A., Wu, D., Kwan, P., & Meydani, M. (2009). Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *Journal of Nutrition*, 139(5), 919-925. <https://doi.org/10.3945/jn.108.100966>
- Elmenhorst, D., Meyer, P. T., Matusch, A., Winz, O. H., & Bauer, A. (2012). Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET. *Journal of Nuclear Medicine*, 53(11), 1723-1729. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.105114>
- Erickson, A. M., Nevarea, Z., Gipp, J. J., & Mulcahy, R. T. (2002). Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30730-30737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205225200>
- Farhat, N., Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Villeneuve, L., Mamarbachi, M., Perrault, L. P., Carrier, M., & Thorin, E. (2008). Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86(11), 761-769. <https://doi.org/10.1139/y08-082>
- Farrokh, S., Brillen, A. L., Haendeler, J., Altschmied, J., & Schaal, H. (2015). Critical regulators of endothelial cell functions: for a change being alternative. *Antioxidants and Redox Signaling*, 22(14), 1212-1229. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6023>
- Faudone, G., Arifi, S., & Merk, D. (2021). The Medicinal Chemistry of Caffeine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(11), 7156-7178. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00261>
- Fischer, E., & Ach, L. (1895). Synthese des cafeins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 28(3), 3135-3143.
- Fisone, G., Borgkvist, A., & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*, 61(7-8), 857-872. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3269-3>
- Fleenor, B. S., Sindler, A. L., Marvi, N. K., Howell, K. L., Zigler, M. L., Yoshizawa, M., & Seals, D. R. (2013). Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. *Experimental Gerontology*, 48(2), 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.10.008>
- Förstermann, U., & Münzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708-1714. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.105.602532>
- Foster, D. O., & Frydman, M. L. (1978). Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(1), 110-122. <https://doi.org/10.1139/y78-015>
- Freedman, N. D., Park, Y., Abnet, C. C., Hollenbeck, A. R., & Sinha, R. (2012). Association of Coffee Drinking with Total and Cause-Specific Mortality. *New England Journal of Medicine*, 366(20), 1891-1904. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa1112010>
- Friling, R. S., Bergelson, S., & Daniel, V. (1992). Two adjacent AP-1-like binding sites form the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), 668-672. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.89.2.668>
- Fukui, H., & Moraes, C. T. (2008). The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends in Neurosciences*, 31(5), 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.008>
- Fulop, G. A., Kiss, T., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Yabluchanskiy, A., Farkas, E., Bari, F., Ungvari, Z., & Csiszar, A. (2018). Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation. *Geroscience*, 40(5-6), 513-521. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0047-6>

- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>
- Gong, Z., Zhou, J., Li, H., Gao, Y., Xu, C., Zhao, S., Chen, Y., Cai, W., & Wu, J. (2015). Curcumin suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(11), 2132-2142. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500316>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., . . . Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Goy, C., Cypiorski, P., Altschmied, J., Jakob, S., Rabanter, L. L., Brewer, A. C., Ale-Agha, N., Dyballa-Rukes, N., Shah, A. M., & Haendeler, J. (2014). The imbalanced redox status in senescent endothelial cells is due to dysregulated Thioredoxin-1 and NADPH oxidase 4. *Experimental Gerontology*, 56, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.005>
- Grabowska, W., Kucharewicz, K., Wnuk, M., Lewinska, A., Suszek, M., Przybylska, D., Mosieniak, G., Sikora, E., & Bielak-Zmijewska, A. (2015). Curcumin induces senescence of primary human cells building the vasculature in a DNA damage and ATM-independent manner. *Age (Dordr)*, 37(1), 9744. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9744-y>
- Grabowska, W., Suszek, M., Wnuk, M., Lewinska, A., Wasiak, E., Sikora, E., & Bielak-Zmijewska, A. (2016). Curcumin elevates sirtuin level but does not postpone in vitro senescence of human cells building the vasculature. *Oncotarget*, 7(15), 19201-19213. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8450>
- Graves, S. I., & Baker, D. J. (2020). Implicating endothelial cell senescence to dysfunction in the ageing and diseased brain. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 127(2), 102-110. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13403>
- Green, H., & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5(1), 19-27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90087-2)
- Greenberg, J. A., Chow, G., & Ziegelstein, R. C. (2008). Caffeinated coffee consumption, cardiovascular disease, and heart valve disease in the elderly (from the Framingham Study). *American Journal of Cardiology*, 102(11), 1502-1508. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.07.046>
- Greenberg, J. A., Dunbar, C. C., Schnoll, R., Kokolis, R., Kokolis, S., & Kassotis, J. (2007). Caffeinated beverage intake and the risk of heart disease mortality in the elderly: a prospective analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 392-398. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.392>
- Gunter, M. J., Murphy, N., Cross, A. J., Dossus, L., Dartois, L., Fagherazzi, G., Kaaks, R., Kühn, T., Boeing, H., Aleksandrova, K., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Larsen, S. C., Redondo Cornejo, M. L., Agudo, A., Sánchez Pérez, M. J., Altzibar, J. M., Navarro, C., . . . Riboli, E. (2017). Coffee Drinking and Mortality in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study. *Annals of Internal Medicine*, 167(4), 236-247. <https://doi.org/10.7326/m16-2945>
- Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K., & Aggarwal, B. B. (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies [10.1039/C1NP00051A]. *Natural Product Reports*, 28(12), 1937-1955. <https://doi.org/10.1039/C1NP00051A>
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, J. F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2004). Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circulation Research*, 94(6), 768-775. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000121104.05977.F3>

- Haendeler, J., Mlynek, A., Büchner, N., Lukosz, M., Graf, M., Guettler, C., Jakob, S., Farrokh, S., Kunze, K., Goy, C., Guardiola-Serrano, F., Schaal, H., Cortese-Krott, M., Deenen, R., Köhrer, K., Winkler, C., & Altschmied, J. (2013). Two isoforms of Sister-Of-Mammalian Grainyhead have opposing functions in endothelial cells and in vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), 1639-1646. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.113.301428>
- Haendeler, J., Tischler, V., Hoffmann, J., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2004). Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Letters*, 577(3), 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.041>
- Han, Y., & Kim, S. Y. (2023). Endothelial senescence in vascular diseases: current understanding and future opportunities in senotherapeutics. *Experimental and Molecular Medicine*, 55(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00906-w>
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458-460. <https://doi.org/10.1038/345458a0>
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research*, 37, 614-636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., & Sedivy, J. M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science*, 311(5765), 1257. <https://doi.org/10.1126/science.1122446>
- Higuchi, M., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. T., Chan, E. C., & Liu, G. S. (2013). Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells and Development*, 22(6), 878-888. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0306>
- Hildebrand, S., Stümer, J., & Pfeifer, A. (2018). PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function. *Frontiers in Physiology*, 9, 70. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00070>
- Hillock-Watling, C., & Gotlieb, A. I. (2022). The pathobiology of perivascular adipose tissue (PVAT), the fourth layer of the blood vessel wall. *Cardiovascular Pathology*, 61, 107459. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2022.107459>
- His, W. (1865). *Die Häute und Höhlen des Körpers: akademisches Programm*. Schweighauser. <https://books.google.de/books?id=ayNCAAAAcAAJ>
- Hock, M. B., & Kralli, A. (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual Review of Physiology*, 71, 177-203. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163119>
- Huang, W., Hickson, L. J., Eirin, A., Kirkland, J. L., & Lerman, L. O. (2022). Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat Rev Nephrol*, 18(10), 611-627. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00601-z>
- Hwang, H. J., Kim, N., Herman, A. B., Gorospe, M., & Lee, J. S. (2022). Factors and Pathways Modulating Endothelial Cell Senescence in Vascular Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710135>
- Ireson, C., Orr, S., Jones, D. J., Verschoyle, R., Lim, C. K., Luo, J. L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W. P., & Gescher, A. (2001). Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Research*, 61(3), 1058-1064.
- Jakobs, P., Rafflenbeul, A., Post, W. B., Ale-Agha, N., Groß, V. E., Pick, S., Dolata, S., Cox, F. F., von Ameln, F., Eckermann, O., Altschmied, J., Prömel, S., & Haendeler, J. (2024). The Adhesion GPCR ADGRL2/LPHN2 Can Protect Against Cellular and Organismal Dysfunction. *Cells*, 13(22). <https://doi.org/10.3390/cells13221826>

- Jendrach, M., Pohl, S., Vöth, M., Kowald, A., Hammerstein, P., & Bereiter-Hahn, J. (2005). Morphodynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(6-7), 813-821. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.03.002>
- Jones, S. A., Ruprecht, J. J., Crichton, P. G., & Kunji, E. R. S. (2024). Structural mechanisms of mitochondrial uncoupling protein 1 regulation in thermogenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 49(6), 506-519. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2024.03.005>
- Kadl, A., & Leitinger, N. (2005). The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(11-12), 1744-1754. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1744>
- Kaisanlahti, A., & Glumoff, T. (2019). Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 75(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0658-5>
- Karimian, M. S., Pirro, M., Johnston, T. P., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2017). Curcumin and Endothelial Function: Evidence and Mechanisms of Protective Effects. *Current Pharmaceutical Design*, 23(17), 2462-2473. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170222122822>
- Kim, Y., Je, Y., & Giovannucci, E. (2019). Coffee consumption and all-cause and cause-specific mortality: a meta-analysis by potential modifiers. *European Journal of Epidemiology*, 34(8), 731-752. <https://doi.org/10.1007/s10654-019-00524-3>
- Kim, Y. S., Ahn, Y., Hong, M. H., Joo, S. Y., Kim, K. H., Sohn, I. S., Park, H. W., Hong, Y. J., Kim, J. H., Kim, W., Jeong, M. H., Cho, J. G., Park, J. C., & Kang, J. C. (2007). Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-alpha-stimulated human endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 50(1), 41-49. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31805559b9>
- Kim, Y. S., Gupta Vallur, P., Phaëton, R., Mythreye, K., & Hempel, N. (2017). Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer. *Antioxidants*, 6(4), 86. <https://www.mdpi.com/2076-3921/6/4/86>
- Klagsbrun, M., & D'Amore, P. A. (1996). Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7(3), 259-270. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(96\)00027-5](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(96)00027-5)
- Kløve, K., & Petersen, A. (2025). A systematic review and meta-analysis of the acute effect of caffeine on attention. *Psychopharmacology*, 242(9), 1909-1930. <https://doi.org/10.1007/s00213-025-06775-1>
- Krogh, A. (1929). *The anatomy and physiology of capillaries* (Vol. 18). Yale University Press.
- Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>
- Kunwar, A., Sandur, S. K., Krishna, M., & Priyadarsini, K. I. (2009). Curcumin mediates time and concentration dependent regulation of redox homeostasis leading to cytotoxicity in macrophage cells. *European Journal of Pharmacology*, 611(1-3), 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.060>
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*, 100(6), 782-794. <https://doi.org/doi:10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e>
- Lao, C. D., Ruffin, M. T. t., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., & Brenner, D. E. (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-10>
- Lasley, R. D., Jahania, M. S., & Mentzer, R. M. (2001). Beneficial effects of adenosine A2a agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280(4), H1660-H1666. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1660>

- Lee, S. E., Park, H. R., Jeon, S., Han, D., & Park, Y. S. (2020). Curcumin Attenuates Acrolein-induced COX-2 Expression and Prostaglandin Production in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J Lipid Atheroscler*, 9(1), 184-194. <https://doi.org/10.12997/jla.2020.9.1.184>
- Lee, Y. K., Lee, W. S., Hwang, J. T., Kwon, D. Y., Surh, Y. J., & Park, O. J. (2009). Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK $\alpha$ -PPAR- $\gamma$  in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK $\alpha$ -COX-2 in cancer cells. *J Agric Food Chem*, 57(1), 305-310. <https://doi.org/10.1021/jf802737z>
- Lener, B., Koziel, R., Pircher, H., Hütter, E., Greussing, R., Herndler-Brandstetter, D., Hermann, M., Unterluggauer, H., & Jansen-Dürr, P. (2009). The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *Biochemical Journal*, 423(3), 363-374. <https://doi.org/10.1042/bj20090666>
- Li, H., Sureda, A., Devkota, H. P., Pittalà, V., Barreca, D., Silva, A. S., Tewari, D., Xu, S., & Nabavi, S. M. (2020). Curcumin, the golden spice in treating cardiovascular diseases. *Biotechnology Advances*, 38, 107343. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.010>
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Vadiveloo, M., Hu, F. B., Kris-Etherton, P. M., Rebholz, C. M., Sacks, F. M., Thorndike, A. N., Van Horn, L., & Wylie-Rosett, J. (2021). 2021 Dietary Guidance to Improve Cardiovascular Health: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 144(23), e472-e487. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000001031>
- Lin, K., Hsu, P.-P., Chen, B. P., Yuan, S., Usami, S., Shyy, J. Y.-J., Li, Y.-S., & Chien, S. (2000). Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9385-9389. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.170282597>
- Lindstrom, M., DeCleene, N., Dorsey, H., Fuster, V., Johnson, C. O., LeGrand, K. E., Mensah, G. A., Razo, C., Stark, B., Varieur Turco, J., & Roth, G. A. (2022). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks Collaboration, 1990-2021. *Journal of the American College of Cardiology*, 80(25), 2372-2425. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2022.11.001>
- Liu, B., Cui, L. S., Zhou, B., Zhang, L. L., Liu, Z. H., & Zhang, L. (2019). Monocarbonyl curcumin analog A2 potently inhibits angiogenesis by inducing ROS-dependent endothelial cell death. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(11), 1412-1423. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0224-x>
- Liu, K., Chen, H., You, Q. S., Ye, Q., Wang, F., Wang, S., Zhang, S. L., Yu, K. J., & Lu, Q. (2017). Curcumin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Oncotarget*, 8(67), 112051-112059. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23002>
- Liu, Y., & Min, W. (2002). Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circulation Research*, 90(12), 1259-1266. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000022160.64355.62>
- Lone, J., Choi, J. H., Kim, S. W., & Yun, J. W. (2016). Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.006>
- Lopes, C. R., & Cunha, R. A. (2024). Impact of coffee intake on human aging: Epidemiology and cellular mechanisms. *Ageing Res Rev*, 102, 102581. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102581>
- MacDougald, O. A., & Lane, M. D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 345-373. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.002021>
- Maier, T., Güell, M., & Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters*, 583(24), 3966-3973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>
- Merk, D., Cox, F. F., Jakobs, P., Prömel, S., Altschmied, J., & Haendeler, J. (2024). Dose-Dependent Effects of Lipopolysaccharide on the Endothelium-Sepsis versus Metabolic Endotoxemia-

- Induced Cellular Senescence. *Antioxidants* (Basel), 13(4).  
<https://doi.org/10.3390/antiox13040443>
- 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. <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/6/1244>
- Micek, A., Godos, J., Del Rio, D., Galvano, F., & Grosso, G. (2021). Dietary Flavonoids and Cardiovascular Disease: A Comprehensive Dose-Response Meta-Analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(6), e2001019. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202001019>
- Mijit, M., Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. (2020). Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*, 10(3), 420. <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/3/420>
- Minamino, T., & Komuro, I. (2007). Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circulation Research*, 100(1), 15-26. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000256837.40544.4a>
- Mitchell, J. A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L., & Harrington, L. S. (2008). Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Experimental Physiology*, 93(1), 141-147. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.038588>
- Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., & Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol*, 29(16), 4495-4507. <https://doi.org/10.1128/mcb.01868-08>
- Mosieniak, G., Adamowicz, M., Alster, O., Jaskowiak, H., Szczepankiewicz, A. A., Wilczynski, G. M., Ciechomska, I. A., & Sikora, E. (2012). Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: Link between senescence and autophagy. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(6), 444-455. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.05.004>
- Muller-Delp, J. M., Gurovich, A. N., Christou, D. D., & Leeuwenburgh, C. (2012). Redox balance in the aging microcirculation: new friends, new foes, and new clinical directions. *Microcirculation*, 19(1), 19-28. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00139.x>
- Ng, T. P., Nyunt, S. Z., Gao, Q., Gwee, X., Chua, D. Q. L., & Yap, K. B. (2024). Curcumin-rich curry consumption and life expectancy: Singapore longitudinal ageing study. *Geroscience*, 46(1), 969-980. <https://doi.org/10.1007/s11357-023-00842-1>
- Niculescu, R., Stoian, A., Arbănași, E. M., Russu, E., Babă, D. F., Manea, A., Stoian, M., Gliga, F. I., Cocuz, I. G., Sabău, A. H., Szabo, D. A., & Cotoi, O. S. (2025). The Dual Role of Perivascular Adipose Tissue in Vascular Homeostasis and Atherogenesis: From Physiology to Pathological Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(17). <https://doi.org/10.3390/ijms26178320>
- Orefice, V., Ceccarelli, F., Barbati, C., Buoncuore, G., Pirone, C., Alessandri, C., & Conti, F. (2024). Caffeine improves systemic lupus erythematosus endothelial dysfunction by promoting endothelial progenitor cells survival. *Rheumatology*, 64(4), 1886-1893. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keae453>
- Ouyang, J., Li, R., Shi, H., & Zhong, J. (2019). Curcumin Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells against H(2)O(2)-Induced Cell Injury. *Pain Res Manag*, 2019, 3173149. <https://doi.org/10.1155/2019/3173149>
- Park, J.-Y., Sohn, H.-Y., Koh, Y. H., & Jo, C. (2021). Curcumin activates Nrf2 through PKCδ-mediated p62 phosphorylation at Ser351. *Scientific Reports*, 11(1), 8430. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87225-8>
- Parmar, M. P., Kaur, M., Bhavanam, S., Mulaka, G. S. R., Ishfaq, L., Vempati, R., C, M. F., Kandepi, H. V., Er, R., Sahu, S., & Davalgi, S. (2023). A Systematic Review of the Effects of Smoking on the

- Cardiovascular System and General Health. *Cureus*, 15(4), e38073. <https://doi.org/10.7759/cureus.38073>
- Petsouki, E., Cabrera, S. N. S., & Heiss, E. H. (2022). AMPK and NRF2: Interactive players in the same team for cellular homeostasis? *Free Radical Biology and Medicine*, 190, 75-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.014>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Poole, D. C., Kano, Y., Koga, S., & Musch, T. I. (2021). August Krogh: Muscle capillary function and oxygen delivery. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 253, 110852. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110852>
- Poredos, P. (2002). Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 32(5-6), 274-277. <https://doi.org/10.1159/000073580>
- Prasad, S., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2014). Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Research and Treatment*, 46(1), 2-18. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.46.1.2>
- Priyadarsini, K. I., Maity, D. K., Naik, G. H., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K., Satav, J. G., & Mohan, H. (2003). Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(5), 475-484. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00325-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00325-3)
- Pu, Y., Zhang, H., Wang, P., Zhao, Y., Li, Q., Wei, X., Cui, Y., Sun, J., Shang, Q., Liu, D., & Zhu, Z. (2013). Dietary curcumin ameliorates aging-related cerebrovascular dysfunction through the AMPK/uncoupling protein 2 pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32(5), 1167-1177. <https://doi.org/10.1159/000354516>
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829-839. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81410-5)
- Quadri, S. M. (2015). Single-cell western blotting. *Methods in Molecular Biology*, 1312, 455-464. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7\\_46](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_46)
- Rafiee, S., Bagherniya, M., Askari, G., Sathyapalan, T., Jamialahmadi, T., & Sahebkar, A. (2021). The Effect of Curcumin in Improving Lipid Profile in Patients with Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review of Clinical Trials. *Adv Exp Med Biol*, 1291, 165-177. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-56153-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-56153-6_10)
- Reutersberg, B., Düppers, P., Menges, A. L., Schrimpf, C., Zimmermann, A., & Pelisek, J. (2022). [Age-related vascular changes exemplified by the carotid artery]. *Gefasschirurgie*, 27(4), 231-238. <https://doi.org/10.1007/s00772-022-00901-5> (Alterungsbedingte Gefäßveränderungen am Beispiel der Arteria carotis.)
- Ribé, D., Sawbridge, D., Thakur, S., Hussey, M., Ledent, C., Kitchen, I., Hourani, S., & Li, J. M. (2008). Adenosine A2A receptor signaling regulation of cardiac NADPH oxidase activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(7), 1433-1442. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.035>
- Ringman, J. M., Frautschy, S. A., Teng, E., Begum, A. N., Bardens, J., Beigi, M., Gylys, K. H., Badmaev, V., Heath, D. D., Apostolova, L. G., Porter, V., Vanek, Z., Marshall, G. A., Helleman, G., Sugar, C., Masterman, D. L., Montine, T. J., Cummings, J. L., & Cole, G. M. (2012). Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimer's Research & Therapy*, 4(5), 43. <https://doi.org/10.1186/alzrt146>
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., & Mortensen, R. M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in

- vivo and in vitro. *Molecular Cell*, 4(4), 611-617. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80211-7)
- Rosen, E. M., Mueller, S. N., Noveral, J. P., & Levine, E. M. (1981). Proliferative characteristics of clonal endothelial cell strains. *Journal of Cellular Physiology*, 107(1), 123-137. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041070114>
- Runge, F. (1821). *Neueste phytochemische Entdeckungen zur Begründung einer wissenschaftlichen Phytochemie*. Reimer.
- Santos-Parker, J. R., Strahler, T. R., Bassett, C. J., Bispham, N. Z., Chonchol, M. B., & Seals, D. R. (2017). Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress. *Aging*, 9(1), 187-208. <https://doi.org/10.18632/aging.101149>
- Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(9), 459-466. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.006>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schüle, R., Muller, M., Kaltschmidt, C., & Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science*, 242(4884), 1418-1420. <https://doi.org/10.1126/science.3201230>
- Schulz, E., Gori, T., & Münzel, T. (2011). Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension Research*, 34(6), 665-673. <https://doi.org/10.1038/hr.2011.39>
- Seshadri, V., Chng, C., Tyler, J., Adikerta, C., Baghaei, K., Wang, Y., Gueven, N., Ricardo, S., & Azimi, I. (2025). Single-Cell Fluorescence Imaging Reveals Heterogeneity in Senescence Biomarkers and Identifies Rapamycin-Responsive Sub-Populations. *Aging Cell*, 24(10), e70209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/accel.70209>
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1955-1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Shechter, M., Shalmon, G., Scheinowitz, M., Koren-Morag, N., Feinberg, M. S., Harats, D., Sela, B. A., Sharabi, Y., & Chouraqui, P. (2011). Impact of acute caffeine ingestion on endothelial function in subjects with and without coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*, 107(9), 1255-1261. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.12.035>
- Sherr, C. J., Beach, D., & Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discovery*, 6(4), 353-367. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-15-0894>
- Shibata, T., Ohta, T., Tong, K. I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., & Hirohashi, S. (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13568-13573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806268105>
- Shin, J. W., Chun, K. S., Kim, D. H., Kim, S. J., Kim, S. H., Cho, N. C., Na, H. K., & Surh, Y. J. (2020). Curcumin induces stabilization of Nrf2 protein through Keap1 cysteine modification. *Biochemical Pharmacology*, 173, 113820. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113820>
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., & Srinivas, P. S. (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica*, 64(4), 353-356. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957450>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

- Singh, D., & Chaudhuri, P. K. (2018). Structural characteristics, bioavailability and cardioprotective potential of saponins. *Integr Med Res*, 7(1), 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2018.01.003>
- Smellie, F. W., Davis, C. W., Daly, J. W., & Wells, J. N. (1979). Alkylxanthines: inhibition of adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices and of brain phosphodiesterase activity. *Life Sciences*, 24(26), 2475-2482. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90458-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90458-2)
- Soriano, F. X., Baxter, P., Murray, L. M., Sporn, M. B., Gillingwater, T. H., & Hardingham, G. E. (2009). Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin. *Molecules and Cells*, 27(3), 279-282. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0050-y>
- Soto-Urquieta, M. G., López-Briones, S., Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A., González-Hernández, G. A., & Ramírez-Emiliano, J. (2014). Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. *Biological Research*, 47(1), 74. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-74>
- Spyridopoulos, I., Fichtlscherer, S., Popp, R., Toennes, S. W., Fisslthaler, B., Trepels, T., Zerneck, A., Liehn, E. A., Weber, C., Zeiher, A. M., Dimmeler, S., & Haendeler, J. (2008). Caffeine enhances endothelial repair by an AMPK-dependent mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), 1967-1974. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.108.174060>
- Sun, Y., Hu, X., Hu, G., Xu, C., & Jiang, H. (2015). Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Premature Senescence via the Activation of SIRT1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(8), 1134-1141. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00012>
- Sun, Y., Zheng, Y., Wang, C., & Liu, Y. (2018). Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death & Disease*, 9(7), 753. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0794-4>
- Thomas, S. R., Witting, P. K., & Drummond, G. R. (2008). Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(10), 1713-1765. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2027>
- Tikkanen, E., Gustafsson, S., & Ingelsson, E. (2018). Associations of Fitness, Physical Activity, Strength, and Genetic Risk With Cardiovascular Disease: Longitudinal Analyses in the UK Biobank Study. *Circulation*, 137(24), 2583-2591. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.117.032432>
- Tontonoz, P., Hu, E., & Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79(7), 1147-1156. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90006-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90006-x)
- Toussaint, O., Medrano, E. E., & von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8), 927-945. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00180-7)
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metabolism*, 3(5), 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.002>
- Umemura, T., Ueda, K., Nishioka, K., Hidaka, T., Takemoto, H., Nakamura, S., Jitsuiki, D., Soga, J., Goto, C., Chayama, K., Yoshizumi, M., & Higashi, Y. (2006). Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *American Journal of Cardiology*, 98(11), 1538-1541. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.06.058>
- Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F. A., Sonntag, W. E., Pearson, K., de Cabo, R., & Csiszar, A. (2010). Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299(1), H18-24. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2010>

- Valentini, A., Cardillo, C., Della Morte, D., & Tesauro, M. (2023). The Role of Perivascular Adipose Tissue in the Pathogenesis of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases and Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomedicines*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11113006>
- Velickovic, K., Wayne, D., Leija, H. A. L., Bloor, I., Morris, D. E., Law, J., Budge, H., Sacks, H., Symonds, M. E., & Sottile, V. (2019). Caffeine exposure induces browning features in adipose tissue in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, *9*(1), 9104. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45540-1>
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular Research*, *79*(2), 208-217. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn098>
- Villena, J. A. (2015). New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS Journal*, *282*(4), 647-672. <https://doi.org/10.1111/febs.13175>
- Vogel, A., & Pelletier, J. (1815). Examen chimique de la racine de Curcuma. *J. Pharm*, *1*, 289-300.
- Vyas, D., Gupta, S., Dixit, V., Anita, K., & Kaur, S. (2015). To study the effect of curcumin on the growth properties of circulating endothelial progenitor cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *51*(5), 488-494. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9852-0>
- Wadström, B. N., Pedersen, K. M., Wulff, A. B., & Nordestgaard, B. G. (2023). Elevated remnant cholesterol, plasma triglycerides, and cardiovascular and non-cardiovascular mortality. *European Heart Journal*, *44*(16), 1432-1445. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac822>
- Wang, J. C., & Bennett, M. (2012). Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circulation Research*, *111*(2), 245-259. <https://doi.org/10.1161/circresaha.111.261388>
- Wang, X., Tomso, D. J., Chorley, B. N., Cho, H. Y., Cheung, V. G., Kleeberger, S. R., & Bell, D. A. (2007). Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome. *Human Molecular Genetics*, *16*(10), 1188-1200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm066>
- Wasserman, W. W., & Fahl, W. E. (1997). Functional antioxidant responsive elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(10), 5361-5366. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5361>
- Waters, J. C. (2009). Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology*, *185*(7), 1135-1148. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903097>
- Whittaker, O. R., Lynes, M. D., Pinz, I., & Liaw, L. (2025). Promotion of Cardiovascular Homeostasis by the Perivascular Adipose Tissue Secretome. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(20). <https://doi.org/10.3390/ijms262010173>
- Wiley, C. D., & Campisi, J. (2021). The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab*, *3*(10), 1290-1301. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00483-8>
- Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., & Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*, *23*(2), 303-314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>
- Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloso, S., Czech, M., & Corvera, S. (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, *23*(3), 1085-1094. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.3.1085-1094.2003>
- Xia, N., Horke, S., Habermeier, A., Closs, E. I., Reifensberg, G., Gericke, A., Mikhed, Y., Münzel, T., Daiber, A., & Förstermann, U. (2016). Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in perivascular adipose tissue of diet-induced obese mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *36*(1), 78-85.

- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163), 411-415. <https://doi.org/10.1038/332411a0>
- Yetik-Anacak, G., & Catravas, J. D. (2006). Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 45(5), 268-276. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.08.002>
- Yuan, Y., Zhang, C., He, Y., Yuan, L., Zhao, Q., Liu, Y., & Long, S. (2022). Curcumin improves the function of umbilical vein endothelial cells by inhibiting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced pyroptosis. *Mol Med Rep*, 25(6). <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12730>
- Zhang, Q., Pi, J., Woods, C. G., & Andersen, M. E. (2010). A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol*, 244(1), 84-97. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.018>
- Zhang, T., Liang, X., Shi, L., Wang, L., Chen, J., Kang, C., Zhu, J., & Mi, M. (2013). Estrogen Receptor and PI3K/Akt Signaling Pathway Involvement in S(-)-Equol-Induced Activation of Nrf2/ARE in Endothelial Cells. *PloS One*, 8(11), e79075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079075>
- Zhao, L., Luo, R., Yu, H., Li, S., Yu, Q., Wang, W., Cai, K., Xu, T., Chen, R., & Tian, W. (2021). Curcumin protects human umbilical vein endothelial cells against high oxidized low density lipoprotein-induced lipotoxicity and modulates autophagy. *Iran J Basic Med Sci*, 24(12), 1734-1742. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.59969.13297>
- Zia, A., Farkhondeh, T., Pourbagher-Shahri, A. M., & Samarghandian, S. (2021). The role of curcumin in aging and senescence: Molecular mechanisms. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 134, 111119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111119>
- Ziegler, D. V., Wiley, C. D., & Velarde, M. C. (2015). Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell*, 14(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/acer.12287>

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Jojo und Yogi für die beste Betreuung bedanken, die ich mir vorstellen konnte. Ich habe mich seit dem Beginn meiner wissenschaftlichen Karriere bei euch in den Arbeitsgruppen, die sich immer wie eine große Familie angefühlt haben, super aufgehoben gefühlt. Trotz all der parallelen Verpflichtungen habt ihr euch immer Zeit für mich genommen, mich fachlich gefördert und mir mit unermüdlicher Geduld durch Experimente und Diskussionen geholfen. Die kulinarischen Labmeetings waren einzigartig und behalte ich in schöner Erinnerung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Maria Grandoch für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt zusätzlich der ganzen Laborfamilie für die schöne und lustige Zeit. Danke Flo für die Musikeinlagen im Labor; danke Nilo alias Mikroskopfee für dein offenes Ohr und die wissenschaftlichen Diskussionen im Büro und Labor, sowie die kreativen Bastelstunden; danke coolster Sitznachbar Olaf dafür, dass du immer für einen oder auch zwei und mehr Lacher zur Verfügung stehst; danke Pfillib für die super Essen/-sberatung und sonst auch witzigen Unterhaltungen und Kommentare; danke Nadine für deine sportliche Begleitung; danke Anne für den ausgeglichenen Spaß im Laboralltag; danke Jan und Dennis, den besten PhDs, die ich mir für diese gemeinsame Zeit wünschen konnte. Ich werde diese Zeit mit euch allen nie vergessen und bin jedem von euch zutiefst dankbar, dass ihr mit euren einzigartigen Persönlichkeiten sie so besonders gemacht habt. Eure Mampffred(erike)

Ein ganz großer Dank gilt auch allen Mitgliedern des IRTG1902, insbesondere Dr. Sandra Berger und Janett Schindler. Der dadurch ermöglichte Forschungsaufenthalt an der University of Virginia hat nicht nur meinen wissenschaftlichen, sondern vor allem auch persönlichen Horizont erweitert.

Last but not least, möchte ich meiner Familie und all meinen Freunden danken, die mich in der Zeit begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich kann mich immer auf euch verlassen und ihr habt mich immer ermutigt mein Bestes zu geben. Ich bin sehr froh euch zu haben. Auf Wunsch gebührt eine ganz besondere Erwähnung und Dank meinem Bruderherz Maximilian Paul Gerhard Cox.

Vielen lieben Dank!