



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Die Effekte von Rosmarinsäurederivaten und deren
Metaboliten auf die Proliferation vaskulärer glatter
Muskelzellen“

verfasst von / submitted by

Hannah Katharina Graf

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2021 / Vienna 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch

Danksagungen

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch dafür bedanken, dass ich in ihrer Arbeitsgruppe am Department für Pharmakognosie meine Diplomarbeit machen durfte, bei der ich einen spannenden Einblick in die Forschungsarbeit mit Zellkulturen erhalten habe.

Weiters möchte ich mich bei Mag. Dr. Tina Blazevic bedanken, die mir während meiner Arbeit im Labor zur Seite stand und mir mit Ratschlägen und konstruktiver Kritik über schwierige Phasen hinweggeholfen hat. Generell danke ich dem ganzen Team der Molecular Target Group für die angenehme und unterstützende Arbeitsatmosphäre, besonders auch dafür, dass es immer jemanden gab meine Fragen zu beantworten.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Mutter, bedanken, die mich während des ganzen Studiums unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	9
Abstract.....	10
Einleitung	11
1. Atherosklerose	11
1.1. Pathogenese	11
1.2 Plaqueruptur und Thrombose	12
1.3 Therapie	13
2. Restenose.....	13
2.1 Pathophysiologie	14
2.2 Therapie	14
3. Die Rolle von VSMC bei Atherosklerose und Restenose	15
3.1 Eigenschaften der Phänotypen.....	15
3.2 Die Rolle der VSMC bei der Atherosklerose	17
3.3 Die Rolle der VSMC bei der Restenose.....	18
3.4 Hemmung der Proliferation von VSMC als Prophylaxe.....	19
4. Rosmarinsäure.....	20
Ziel dieser Arbeit	21
1. Vorausgegangene Studien.....	21
2. Fragestellung dieser Arbeit	22
Materialien und Methoden.....	24
1. Zellkultivierung und Passagierung der Zellen	24
1.1. Durchführung.....	24
1.2. Materialien.....	25
2. Resazurin-Konversionsassay.....	26

2.1. Prinzip	26
2.2. Versuchsaufbau.....	27
2.3. Materialien.....	27
3. Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	28
3.1. Prinzip	28
3.2. Versuchsaufbau.....	29
3.3. Materialien.....	30
4. Kristallviolett Assay	31
4.1. Prinzip	31
4.2. Versuchsaufbau.....	31
4.3. Materialien.....	32
5. Western blot.....	33
5.1. Prinzip	33
5.2. Versuchsaufbau.....	34
5.3. Materialien.....	37
6. Software.....	41
7. Statistik	41
Ergebnisse.....	42
1. Antiproliferativer Effekt der RA-Derivate und Metaboliten.....	42
1.1. Einfluss von RA-Derivaten und Metaboliten auf die PDGF-induzierte VSMC Proliferation	42
1.2. Wirkung von RA-Derivaten und Metaboliten auf mit NBS stimulierte VSMC	43
1.3. IC50 der Rosmarinsäureester.....	44
2. Effekt der RA-Derivate auf den Zellzyklus von VSMC	48
3. RA-Derivate wirken in höheren Konzentrationen stark antiproliferativ und verändern die Morphologie der VSMC.....	52

4. Die Wirkung der RA-Derivate auf die Phosphorylierung von Rb.....	55
Diskussion	59
1. Antiproliferativer Effekt der Rosmarinsäure-Derivate.....	60
2. Hinweise auf eine mögliche Toxizität langkettiger RA-Ester	61
3. Effekt der RA-Derivate auf Rb.....	61
4. Outlook	62
Literaturverzeichnis.....	63
Abkürzungen.....	69
Abbildungsverzeichnis	72
Tabellenverzeichnis	74

Zusammenfassung

Die Atherosklerose gehört in unserer westlichen Gesellschaft zu den Volkskrankheiten und ihre Folgen Herzinfarkt und Schlaganfall gehören zu den häufigsten Todesursachen. Bisherige Therapieansätze vermindern die Risikofaktoren (durch Diät, Bewegung), behandeln Vorerkrankungen (wie Hypertonie, Diabetes etc.) oder öffnen durch invasive Methoden bereits verschlossene Gefäße. [1–3]

Die durch Entzündungsprozesse in den Gefäßen zum Wachstum angeregten VSMC verstärken auf mehrere Arten die Bildung von atherosklerotischen Plaques, u.a. durch die Produktion von ECM und die Freisetzung von Zytokinen, welche den Entzündungsprozess und die Einlagerung von LDL in die Gefäßwand fördern. Daher ist die Hemmung proliferierender VSMC ein potenzieller Therapieansatz, der die Progression der Atherosklerose vermindern könnte. [4–6] Eine antiproliferative Therapie kann außerdem das Risiko einer Restenose nach einer Angioplastie vermindern, da die erneute Verengung des Gefäßes zum Großteil von den VSMC verursacht wird. [7]

Ausgehend von einer Studie zur antiproliferativen Wirkung von RAME (Rosmarinsäuremethylester) auf VSMC (vaskuläre glatte Muskelzellen) wurde in dieser Arbeit der Effekt von Rosmarinsäure, fünf ihrer Ester (RAME, RAET, RABU, RAOCT, RADOD) und ihrer Metaboliten auf das Wachstum von VSMC untersucht.

Dabei zeigten alle getesteten Ester im Resazurin- und Kristallviolett-Assay eine antiproliferative Wirkung auf mit PDGF stimulierte VSMC, die – wie die Zellzyklusanalyse ergab - in der G0/G1 Phase arretiert werden. Die Metaboliten der Rosmarinsäure hemmten das Wachstum der Zellen hingegen nicht. Mit Ausnahme von RADOD zeigten alle Ester eine konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung. Die ähnlichen IC50-Werte von RAME, RAET, RABU und RAOCT zeigten, dass die Stärke der Wirkung nicht von der Kettenlänge der Esterseitenkette abhängt.

Fragmentierte DNA in den Proben bei der Zellzyklusanalyse sowie die Morphologie der Zellen im Mikroskop gaben jedoch auch erste Hinweise auf eine toxische Wirkung der länger-kettigen Ester. Mit Hilfe des Western Blots wurde gezeigt, dass die untersuchten RA-Derivate genauso wie RAME die Phosphorylierung von Rb an Ser807/811 hemmen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die kurz-kettigen RA-Ester interessante Kandidaten für weitere Studien sind, während für die länger-kettigen zuerst eine mögliche Toxizität ausgeschlossen werden muss.

Abstract

Atherosclerosis is a widespread disease throughout Western society and its consequences - heart attack and stroke belong to the most common causes of death. Present therapeutical strategies lower risk factors (e.g. introducing diet, exercise), treat co-morbidities (like hypertension or diabetes) or surgically widen narrowed vessels. [1–3]

VSMC, which are stimulated to proliferate by intravascular inflammatory processes, enforce the formation of atherosclerotic plaques in multiple ways. These include the production of ECM and liberation of cytokines, which promote inflammation and storage of LDL in the intima of blood vessels. Therefore, the inhibition of proliferating VSMC is a potential therapeutic approach, which helps to reduce the progression of atherosclerosis. [4–6] Moreover, since the re-narrowing of the vessel is mainly caused by VSMC proliferation, antiproliferative treatment can potentially reduce the risk of restenosis after angioplasty. [7]

Based on a study on the antiproliferative effect of RAME (rosmarinic acid methyl ester) on VSMC (vascular smooth muscle cells), for this thesis I tested rosmarinic acid, five of its esters (RAME, RAET, RABU, RAOCT, RADOD) and its metabolites for their effect on VSMC proliferation.

All tested esters showed an antiproliferative effect on VSMC in both Resazurin and Crystal Violet Assay and arrested the cells in the G0/G1 phase of the cell cycle according to the cell cycle analysis. In contrast, RA metabolites did not inhibit cell proliferation. Except for RADOD, the antiproliferative effect was concentration-dependent. Similar IC50 values of RAME, RAET, RABU and RAOCT showed that the effectiveness does not correlate to the length of the ester side chain. Detection of fragmented DNA in samples during the cell cycle analysis and the changed morphology of cells under the microscope indicated a potential toxic effect of RA esters with longer side chains. Results from the Western Blot showed that the tested RA derivatives inhibit phosphorylation of Rb in Ser807/811 the same way RAME did previously.

All in all, the results of this thesis indicate that RA esters with shorter side chain are interesting candidates for further examination, whereas for esters with longer side chains, toxicity has to be ruled out first.

Einleitung

1. Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronische, entzündliche Erkrankung vor allem größerer und mittlerer Arterien, die durch die Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand verengt werden. [8] Die Folgen der Atherosklerose Myokardinfarkt und Schlaganfall gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Der Lebensstil moderner westlicher Gesellschaften mit wenig Bewegung und hyperkalorischer Kost steigert das Auftreten von Risikofaktoren für Atherosklerose wie Hyperlipoproteinämie, Adipositas, Hypertonie und Diabetes mellitus. [1] Unter diesen Risikofaktoren ist die Hyperlipoproteinämie der ausschlaggebende Faktor, da Personen mit sehr niedrigem Plasmalipidspiegel auch in Anwesenheit anderer Risikofaktoren nur selten eine Atherosklerose entwickeln. [9]

1.1. Pathogenese

Die Entstehung atherosklerotischer Plaques ist ein sehr komplexer Prozess, an dem Lipoproteine, Endothelzellen, Leukozyten und vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) beteiligt sind. [8] Auslösend ist die Einlagerung von Lipoproteinen (LDL) in das subendotheliale Gewebe der Gefäßwand. Zum Auslösemechanismus gibt es unterschiedliche Hypothesen, die unter anderem Endothelschäden oder den erhöhten Lipoproteinspiegel selbst als Ursache für die vermehrte Einlagerung von LDL in die Arterienwand ansehen. [10]

In der subendothelialen Schicht der Gefäßwand wird LDL modifiziert (z.B. oxidiert) und dadurch proatherogen. Dies induziert in den Endothelzellen die vermehrte Expression von chemotaktischen Cytokinen (z.B. MCP-1), Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1), wodurch es zur Rekrutierung von Leukozyten, vor allem Monozyten, kommt. Die Monozyten wandeln sich in Makrophagen um, nehmen die atherogenen Lipoproteine über scavenger Rezeptoren auf und verwandeln sich in lipidreiche Schaumzellen. Diese setzen ebenfalls die oben genannten Faktoren frei und verstärken dadurch die Entzündungsreaktion. Im weiteren Verlauf sterben die Makrophagen ab und es bildet sich ein unorganisierter lipidreicher Kern. [2, 8, 11]

Die freigesetzten Wachstumsfaktoren und atherogenen Cytokine führen außerdem zur Dedifferenzierung der VSMC vom kontraktilen zu einem proliferativen Phenotyp. Die VSMC werden zu Wachstum und Migration angeregt, wandern in die Intima ein und bilden eine fibröse Kappe über dem Lipidkern, die aus den Muskelzellen selbst sowie großen Mengen extrazellulärer Matrix (ECM), die von den VSMCs gebildet wird, besteht. [2] Auf die komplexe Rolle der VSMC in diesem Prozess wird in Kapitel 3 noch genauer eingegangen.

1.2 Plaqueruptur und Thrombose

Die gefährlichste durch atherosklerotische Plaques verursachte Komplikation ist deren Ruptur. [11] Dabei wird der lipidreiche Kern der Plaque freigelegt, wodurch thrombogene Faktoren (z.B. Komponenten der ECM) die Aktivierung der Gerinnungskaskade induzieren und es zur Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten kommt. [12] Im günstigen Fall führt die folgende Thrombozytenaggregation lediglich zu einer Vergrößerung der Plaque, wobei die VSMC erneut eine Kappe über dieser bilden. [8, 11] In anderen Fällen kommt es zu einem kompletten Gefäßverschluss und in weiterer Folge zu einem Infarkt. So wird ein Großteil aller tödlichen Herzinfarkte durch eine koronare Thrombose verursacht. [8]

Plaques mit einem besonders hohen Risiko für eine Ruptur teilen im Gegensatz zu jenen mit einem geringen Risiko vor allem folgende Eigenschaften: a) einen großen unorganisierten lipidreichen Kern, der von einer dünnen fibrösen Kappe mit einer geringeren Anzahl an VSMC umgeben ist und einer verringerten Bildung von ECM, b) eine hochgradige Entzündung mit einer hohen Anzahl an Makrophagen in der Kappe, c) Neovaskularisation mit instabilen Gefäßen und dadurch Einblutungen in die Plaque. [2, 12]

1.3 Therapie

Da die Atherosklerose eine Folge diverser Vorerkrankungen und Risikofaktoren ist, werden primär diese behandelt. Eine zentrale Rolle spielt eine Veränderung des Lebensstils (Bewegung, Ernährungsumstellung, Raucherentwöhnung, Vermeidung von Stress etc.) sowie die medikamentöse Behandlung von Hypercholesterinämie, Hypertonie und Diabetes mellitus. Zur Verminderung des Thromboserisikos werden Antikoagulantien eingesetzt. [2, 3]

Standardtherapie bei coronaren Gefäßverschlüssen ist heute eine Perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA), bei der das verschlossene Gefäß mittels eines Ballonkatheders aufgedehnt wird. Häufig wird dabei auch ein Stent implantiert, um das Gefäß offenzuhalten. [13]

Verwendet werden einerseits unbeschichtete bare-metal stents (BMS) und andererseits sogenannte drug eluting stents (DES), welche mit einem Polymer beschichtet sind, das im Körper einen Wirkstoff (Paclitaxel, Sirolimus und dessen Derivate Everolimus und Zotarolimus) freisetzt. Diese sollen die Zellproliferation von VSMC und dadurch eine Restenose des Gefäßes, eine häufige Komplikation dieses Eingriffs, verhindern. [14, 15] Durch die Entwicklung der DES gelang es, die Zahl der Restenosen nach einer Stentangioplastie zu vermindern. Die eingesetzten Wirkstoffe, verhindern jedoch nicht nur die Proliferation von VSMC, sondern auch die Reendothelialisierung des Gefäßes, wodurch es zu einem erhöhten Risiko für eine Stent-Thrombose kommt. [13, 14]

2. Restenose

Unter einer Restenose versteht man eine erneute Verengung eines durch Angioplastie erweiterten Gefäßes. [16] Das Risiko ist bei der PTCA ohne die Verwendung eines Stents am höchsten, beträgt bei BMS jedoch immer noch 20-35%. Die Entwicklung von DES konnte das Risiko weiter vermindern. Mit 5-10% ist es jedoch immer noch relativ hoch. [17]

2.1 Pathophysiologie

Verursacht wird die Restenose durch die Verletzung der Endothelschicht bei der Angioplastie, auf welche der Körper mit vaskulärem Remodeling und einer neointimalen Hyperplasie reagiert. Als erste Reaktion innerhalb von Minuten nach dem Eingriff kommt es außerdem zu einem „early elastic recoil“, bei dem das Gefäß durch elastische Rückstellkräfte wieder bis zu 40% verengt wird. Während die Wiederverengung durch elastic recoil und vaskulärem Remodeling vor allem bei Eingriffen ohne Stentimplantation vorkommt, führen BMS häufiger zur Neointimahyperplasie, die mit einer Migration und Proliferation von VSMC verbunden ist. [15] Durch die Freilegung des subendothelialen Gewebes wird der Wundheilungsprozess angeregt, bei dem es zur Thrombozytenaggregation, der Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen und zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren kommt. Dadurch werden die VSMC zu Migration in die Neointima und zur Proliferation angeregt. [14, 17]

Die Wirkstoffe in DES (Paclitaxel, Sirolimus und Derivate) sind in der Lage die Proliferation der VSMC zu hemmen und das Risiko für eine Restenose zu vermindern. Sie sind aber mit erheblichen Nachteilen verbunden, da sie auch die Proliferation der Endothelzellen unterdrücken. [16] Dadurch wird die Reendothelialisierung des Gefäßes verlangsamt (48 Monate statt 3-6) und es besteht ein höheres Risiko für eine Stent-Thrombose. Darüber hinaus erhöht die persistierende Endothelläsion die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Einlagerung von LDL und somit der Bildung einer neuen Plaque in der Neointima. [17]

2.2 Therapie

Die Restenose ist bis heute ein Problem. Es gibt einige Therapieansätze von der intravaskulären Brachytherapie (Einbringen von radioaktiven Isotopen in das verschlossene Gefäß), die vor allem vor der Entwicklung der DES verwendet wurde, bis hin zum Setzen eines neuen Stents (bevorzugt DES zweiter Generation), was heute als Mittel der Wahl angesehen wird. Metaanalysen haben ergeben, dass von allen zurzeit verfügbaren Methoden, eine erneute Stentangioplastie mit DES oder eine DCB (drug coated balloon) Angioplastie die besten Ergebnisse erzielen. [17, 18]

3. Die Rolle von VSMC bei Atherosklerose und Restenose

VSMC sind einerseits für die Kontraktion der Gefäßmuskulatur verantwortlich, und haben andererseits auch eine gefäßaufbauende Funktion. [19] Je nach Funktion liegen sie in unterschiedlichen Phänotypen vor, die sich in ihrer Morphologie, Zellteilungsrate, Beweglichkeit und der Expression von Zellmarkern unterscheiden. Dies hängt sowohl von genetischen als auch von Faktoren in der Umgebung der Muskelzelle ab, woraus sich eine große Variation von Phänotypen ergibt, welche jedoch nach ihrer Funktion entweder einem kontraktilem oder einem proliferativen Typ zugeordnet werden können. [19, 20] In gesunden Gefäßen überwiegen kontraktile VSMC, während proliferative nur in jenem Maß vorhanden sind, wie sie für physiologische Erneuerungs- und Umbauprozesse notwendig sind. [20]

3.1 Eigenschaften der Phänotypen

VSMC vom kontraktilem Typ befinden sich im Ruhezustand (G₀-Phase des Zellzyklus) und exprimieren vor allem Proteine, die für die Muskelkontraktion wichtig sind. Im Gegensatz dazu führt die Umwandlung in den proliferativen Typ zum Übergang in die G₁-Phase des Zellzyklus und zum Abbau dieser kontraktilem Proteine, wodurch sie sich als Marker für die Unterscheidung der Phänotypen eignen. [20] Die Merkmale der beiden Phänotypen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Eigenschaften der kontraktilem und proliferativen Phänotypen von VSMC; zusammengefasst aus [20]

	Kontraktilem Phänotyp	Proliferativer Phänotyp
Morphologie	Länglich, spindelförmig Kontraktile Filamente ersetzen Proteinsynthetisierende Organellen	Kürzer und rhomboide Form Viele Organellen, die Proteine synthetisieren
Wachstumsrate	niedrig	hoch
Migrationsrate	niedrig	hoch
Marker	u.a. α -smooth muscle actin (α -SMA), smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC) = Proteine der Kontraktionsfilamente	Abwesenheit der Marker

3.1.1 Der Zellzyklus

Im Zellzyklus wechseln sich kontinuierlich DNA-Synthese (S-Phase) und Zellteilung (Mitose) ab. Dazwischen gibt es jeweils Gap-Phasen (G1 und G2), in denen sich die Zelle auf die folgende Phase vorbereitet. Die Abfolge der Phasen unterliegt einer Regulation durch sogenannte Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und deren Regulatoren, den Cyclinen, welche die CDK durch Komplexbildung aktivieren. Im Gegensatz zu den CDK werden die Cycline im Laufe des Zellzyklus in unterschiedlichem Maß synthetisiert und wieder abgebaut, wodurch der richtige Ablauf des Zyklus gewährleistet wird. Die Aktivität der Cyclin/CDK-Komplexe wird außerdem durch CDK-Inhibitoren (CKI) und weitere regulatorische Faktoren gesteuert. Zu diesen zählt u.a. der Tumorsuppressor p53. [4, 21]

Für den Übergang von der G1 zur S-Phase sind Cyclin D/CDK4 und Cyclin E/CDK2 verantwortlich. Diese führen unter anderem zur Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (Rb), welches daraufhin den Transkriptionsfaktor E2F freisetzt, der für die Transkription von Genen, die für die S-Phase wichtig sind (z.B. für die Cycline A und E sowie für CDK1), verantwortlich ist. Umgekehrt verhindert nicht phosphoryliertes Rb, dass die Zelle in die S-Phase übergeht. Der Übergang von der G2- in die Mitosephase wird schließlich durch Cyclin A/CDK2 und Cyclin B/CDK1 reguliert. [22, 23]

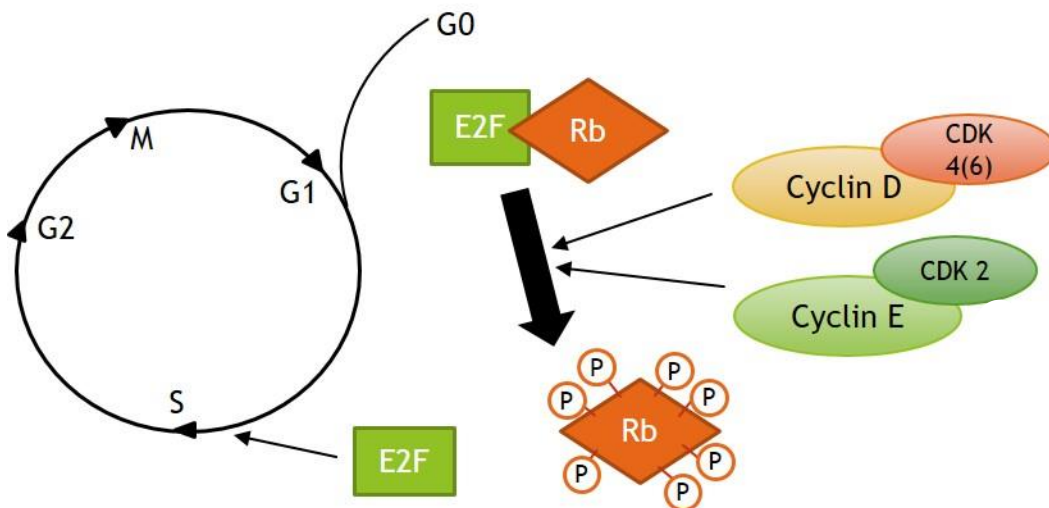


Abbildung 1: Die Rolle des Retinoblastoma Proteins im Zellzyklus; die Phosphorylierung von Rb durch Cyclin/CDK-Komplexe führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und dadurch zum Übergang der Zelle in die S-Phase, modifiziert aus [22]

3.1.2 Faktoren die den Übergang vom kontraktilen in den proliferativen Phänotyp fördern

Zum Verständnis der Rolle der VSMC bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques ist es wichtig, zu verstehen welche Faktoren die Umwandlung der Zellen vom kontraktilen in den proliferativen Phänotyp fördern. Dies sind einerseits Wachstumsfaktoren wie PDGF und Botenstoffe wie zum Beispiel Angiotensin II und andererseits physikalische Faktoren wie z.B. mechanische Beanspruchung der Gefäßwand, die durch Zirkulationsstörungen oder hohen Blutdruck ausgelöst wird. [20, 24] Der PDGF spielt dabei eine besondere Rolle, weil er die VSMC nicht nur zur Proliferation anregt, sondern auch zur Expression von Chemokinen, die durch Rekrutierung von Leukozyten das Entzündungsgeschehen in der Plaque verstärken, führt. [25]

Komponenten der extrazellulären Matrix haben ebenfalls Einfluss auf die Phänotypen der VSMC. So fördern etwa die unterschiedlichen Kollagen-Typen jeweils einen der Phänotypen und beeinflussen auch die Ansprechbarkeit auf PDGF-B. [20]

3.2 Die Rolle der VSMC bei der Atherosklerose

Die Entstehung atherosklerotischer Plaques ist ein sehr komplexer Prozess, an dem VSMC in mehrfacher Weise beteiligt sind. Initiale Entzündungsprozesse in der Gefäßwand setzen Mediatoren (Wachstumsfaktoren, Zytokine) frei, die einen Phenotype-Switch von VSMC vom kontraktilen in den proliferativen Typ fördern. Diese VSMC wandern von der Media in die Intima ein. [5, 26]

Der wichtigste Beitrag der VSMC vom proliferativen Typ zur Bildung atherosklerotischer Plaques ist die vermehrte Produktion von ECM. Damit tragen sie zur Bildung einer schützenden und stabilisierenden Kappe über dem nekrotischen Kern der Plaque bei. [5]

Andererseits fördern VSMC durch die Freisetzung von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen die (weitere) Einwanderung von Makrophagen in die atherosklerotische Plaque mit denen sie auch direkt interagieren und vor einer Apoptose schützen. Auf diese Weise spielen VSMC nicht nur eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen, sondern halten sie auch in der arteriosklerotischen Läsion zurück. [6, 27]

Im Tierversuch wurde gezeigt, dass VSMC auch selbst Lipide aufnehmen und speichern können. Obwohl der Großteil der Schaumzellen aus Makrophagen entsteht, wandeln sich auch mit Lipiden aufgeladene VSMC in Schaumzellen um. Deren Apoptose führt zu einer Ansammlung von Lipiden im Extrazellulärraum und somit zu einem Anwachsen des Kerns bzw. zur Steigerung der Vulnerabilität der atherosklerotischen Plaque. [6]

Die von VSMC freigesetzte ECM in atherosklerotischen Plaques trägt ebenfalls zur Anhäufung von Lipoproteinen in der Plaque bei. Durch den Einfluss der Cytokine produzieren die VSMC Proteoglycane und Fibronectin, die eine erhöhte Affinität zu Lipoproteinen haben, wodurch zusätzliches LDL in der ECM festhalten wird, welches rasch oxidiert wird und von Makrophagen und Schaumzellen aufgenommen werden kann. [6, 28]

3.3 Die Rolle der VSMC bei der Restenose

Die Stentangioplastie hat die Überlebenschancen bei (drohenden) Verschlüssen der Herzkranzgefäße deutlich verbessert. Eine Komplikation dieser Behandlung stellt die Restenose des aufgedehnten Gefäßes durch eine In-Stent-Restenose dar. Für einen Großteil eines erneuten Gefäßlumenverlustes sind dabei VSMC verantwortlich. [15, 17]

Migration und Proliferation von VSMC sind Teil jedes Wundheilungsprozesses. Ein solcher Prozess setzt auch beim Einwachsen eines Stents ein. Die von Thrombozyten, Leukozyten und von proliferierenden VSMC selbst freigesetzten Wachstumsfaktoren wie PDGF führen zu einer weiteren Dedifferenzierung von VSMC in den proliferierenden Typ. Es kommt zur Zellproliferation und zur Bildung von ECM, die im Stentlumen zur Bildung einer neuen Intima führen, die mit der Zeit das Gefäß wieder verschließen kann. [14, 16]

3.4 Hemmung der Proliferation von VSMC als Prophylaxe

Da proliferierende VSMC eine große Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques sowie bei der Entstehung von In-Stent-Restenosen spielen, könnte die Hemmung der Proliferation von VSMC - und damit die Hemmung der Freisetzung von EMC und Cytokinen - ein wichtiger Aspekt in der Prophylaxe insbesondere zur Vermeidung von erneuten Gefäßverschlüssen nach einer Stentangioplastie sein. [7]

Die Beschichtung von Stents mit die Proliferation von Zellen hemmenden Substanzen wie Paclitaxel und Sirolimus hat die Rate an In-Stent-Restenosen deutlich reduziert. Diese Substanzen führen jedoch zu einer langsameren Reendothelialisierung, was das Risiko einer In-Stent-Thrombose erhöht. [17]

Es ist daher sinnvoll, nach Substanzen zu suchen, die spezifisch die Proliferation von VSMC hemmen. [7] Sie sollten aber nicht toxisch für die VSMC sein, da eine Apoptose der VSMC mit einem erhöhten Risiko einer Plaqueruptur assoziiert ist. [29]

4. Rosmarinsäure

Zahlreiche Kräuter speziell des Mittelmeerraumes wie Rosmarin, Oregano, Melisse, Thymian u.a. werden seit langem wegen ihrer entzündungshemmenden, antiviralen und antibakteriellen Wirkung in der Volksmedizin eingesetzt. 1958 haben italienische Chemiker die Rosmarinsäure als einen der in den Pflanzen enthaltenen Wirkstoffe isoliert. [30] In zahlreichen Studien wurden seither entzündungshemmende, antioxidative und antiproliferative Effekte der Rosmarinsäure nachgewiesen. [31–34]

Eine Studie untersuchte zusätzlich, welchen Effekt eine Veresterung auf die antioxidative Wirkung der RA und deren Aufnahme in die Zellen hat. Methyl- und andere Ester der Rosmarinsäure weisen eine verstärkte antioxidative Wirkung und verbesserte Aufnahme in die Zelle auf. Dieser Effekt hängt von der Länge der Alkylketten ab, wobei Octyl- und Decylreste in Studien die größte Wirksamkeit zeigten und es ab einer gewissen Kettenlänge zu einer Abschwächung der Wirkung kam. [35]

Rosmarinsäure (RA) ist ein Ester der Kaffeesäure mit der 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-milchsäure (DHPL). Sie kommt in zahlreichen Vertretern der Lamiaceae (z.B. *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum* sp., *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*, *Thymus* sp., *Salvia officinalis*, *Oriaganum vulgare* u.v.a.) vor. [36]

Bei oraler Gabe wird sie rasch, aber nur zu einem sehr kleinen Teil resorbiert und auch rasch wieder eliminiert. [37, 38] Studien zur Pharmakokinetik bei Ratten zeigen, dass die Rosmarinsäure im Darm von Bakterien in die beiden Säurebestandteile Kaffeesäure und DHPL gespalten wird. Bei der weiteren Metabolisierung wird die Kaffeesäure dann in Ferulasäure und m-Cumarsäure umgewandelt. [36, 39, 40] Beim Menschen wurden neben diesen Metaboliten auch RA selbst und der Methylester (RAME) detektiert. [37]

Ziel dieser Arbeit

1. Vorausgegangene Studien

Diese Arbeit basiert auf Forschungsergebnissen der Molecular Targets Group der Universität Wien, die unter dem Titel „Constituents of Mediterranean spices counteracting vascular smooth muscle cell proliferation: identification and characterization of rosmarinic acid methyl ester as a novel inhibitor“ [41] in Molecular Nutrition & Food Research publiziert wurden.

Für diese Studie wurden Rosmarinsäure sowie 11 weitere Polyphenole pflanzlichen Ursprungs auf ihre Wirkung auf die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen (VSMC) in vitro getestet, von denen Rosmarinsäuremethylester (RAME) mit einer IC₅₀ von 3,12 µM die höchste Wirksamkeit zeigte. In weiterer Folge wurde RAME auf seine Zytotoxizität auf VSMC, die Wirkung auf die Proliferation von Endothelzellen und mögliche molekulare Wirkmechanismen getestet, sowie Zellzyklusanalysen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Wirkung von RAME auf die Neointimaproliferation in einem „murine femoral artery cuff model“ in vivo untersucht.

Dabei konnte weder ein zytotoxischer Effekt auf VSMC in Konzentrationen bis 30 µM, noch ein Einfluss auf die Proliferation der Endothelzellen festgestellt werden. Die Zellzyklusanalyse zeigte einen Arrest der VSMC in der G₀/G₁ und frühen S-Phase. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden molekulare Wirkmechanismen untersucht, die in diesen Phasen des Zellzyklus eine wichtige Regulationsfunktion haben. Es wurde gezeigt, dass RAME die Phosphorylierung vom Retinoblastom-Protein (Rb) hemmt und die CDK2 direkt inhibiert. Die in vivo Tests zeigten eine signifikant verminderte Neointimabildung bei Behandlung mit RAME.

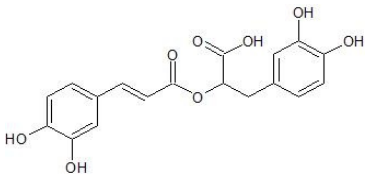
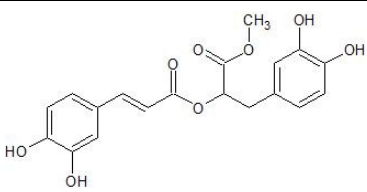
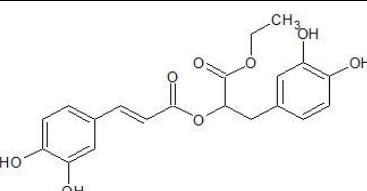
2. Fragestellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung weiterer Rosmarinsäure-Derivate auf die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen zu untersuchen.

Für RAME liegen bisher keine Daten zu ihrer Bioverfügbarkeit vor. Die bisherigen Studien zu RA selbst zeigen eine schlechte orale Bioverfügbarkeit in Ratten. [42] Derivate der Rosmarinsäure mit einer besseren Bioverfügbarkeit wären interessante Kandidaten für eine vasoprotektive Therapie der Atherosklerose, sofern die Wirksamkeit mit RAME vergleichbar ist. Die veränderte Struktur kann jedoch auch einen Einfluss auf Wirkung, Effektivität und Toxizität haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rosmarinsäure, fünf Rosmarinsäureester mit unterschiedlicher Kettenlänge sowie vier Metaboliten der Rosmarinsäure untersucht. In einem ersten Schritt wurde getestet, welche dieser Substanzen die Proliferation von VSMC hemmen. In weiterer Folge wurden die wirksamen Verbindungen weiter untersucht und die Resultate mit den bestehenden Forschungsergebnissen verglichen. Die untersuchten Substanzen wurden von Dr. Rongxia Liu (Yantai Universität, China) zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Strukturen der untersuchten Verbindungen

Rosmarinsäure	RA	
Rosmarinsäuremethylester	RAME	
Rosmarinsäureethylester	RAET	

Rosmarinsäurebutylester	RABU	
Rosmarinsäureoctylester	RAOCT	
Rosmarinsäuredodecylester	RADOD	
3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure	DHPL	
Kaffeesäure	CA	
Ferulasäure	FA	
m-Cumarsäure	m-CoumA	

Materialien und Methoden

1. Zellkultivierung und Passagierung der Zellen

1.1. Durchführung

Für die Experimente wurden vaskuläre glatte Muskelzellen aus Ratten verwendet, die nach ihrer Isolation in flüssigem Stickstoff kryokonserviert wurden. Für die Kultivierung wurden sie wieder aufgetaut und in Nährmedium bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden einmal pro Woche passagiert. Vor der Passagierung wurden die Kulturflaschen unter dem Mikroskop auf Kontamination überprüft.

Zuerst wurde das Nährmedium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen von der Flaschenwand zu lösen wurden sie mit 4 ml Trypsin/EDTA behandelt und ca. 5 min. inkubiert. Die Ablösung wurde unter dem Mikroskop überprüft. Das Trypsin wurde daraufhin mit insgesamt 16 ml Nährmedium inaktiviert und die Zellsuspension in einen 50 ml Falcon überführt. Um das Trypsin zu entfernen wurde die Zellsuspension für 4 min bei 410 g zentrifugiert und der Überstand der Flüssigkeit abpipettiert. Das bei der Zentrifugierung entstandene Zell-Pellet wurde in 10ml frischem Nährmedium resuspendiert. Ca. 600 µl wurden entnommen, um mit dem Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyser die Anzahl der Zellen zu bestimmen.

Mit dieser Information wurden die nötigen Mengen an Zellsuspension und Nährmedium für das Aussäen in Kulturflaschen und Mikrotiterplatten für Experimente berechnet. Die entsprechenden Mengen wurden ausgesät und der Rest der Zellsuspension verworfen. Für neue Passagen in Zellkulturflaschen wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 20 ml Nährmedium ausgesät. Für die Experimente wurden die Passagen 6 bis 12 verwendet.

1.2. Materialien

Tabelle 3: Medien für die Zellkultivierung

Medien	Substanz	Menge	Hersteller
Nährmedium	DMEM/F12 1:1	400 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	Hitzeinaktiviertes FBS	100 ml	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)
	GA-1000	0,5 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
Alternatives Nährmedium	DMEM	200 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	Ham F12	200 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	200 mM L-Glutamin	10 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	Phenolrot	1,5 ml	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
	Hitzeinaktiviertes FBS	100 ml	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)
	GA-1000	0,5 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
Diätmedium	DMEM/F12 1:1	500 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	Hitzeinaktiviertes FBS	0,5 ml	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)
	GA-1000	0,5 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	BSA	1 g	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Alternatives Diätmedium	DMEM	250 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	Ham F12	250 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	L-Glutamin	10 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	Phenolrot	1,5 ml	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
	Hitzeinaktiviertes FBS	0,5 ml	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)
	GA-1000	0,5 ml	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
	BSA	1 g	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 4: Lösungen für die Passagierung von Zellen

Lösung	Zusammensetzung	Menge
PBS	NaCl	36,0 g
	Na ₂ HPO ₄	7,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,15 g
	ddH ₂ O	5000 ml
		pH auf 7,4 eingestellt
Trypsin/EDTA	Trypsin	0,5 g
	Na ₂ -EDTA	0,2 g
	PBS	1000 ml

2.2. Versuchsaufbau

In eine 96 well-Mikrotiterplatte wurden etwa 5000 Zellen in 200 µl Nährmedium pro well ausgesät. 4 wells wurden nur mit Nährmedium gefüllt (no cells control). Während für das Screening aller Substanzen ein Teil der Zellen mit PDGF und ein Teil mit NBS stimuliert wurde, wurden für die Bestimmung der IC50-Werte der wirksamen Rosmarinsäureester alle Zellen mit PDGF stimuliert. Nach dem Aussäen wurden die Zellen 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend das Nährmedium durch 200 µl Diätmedium ersetzt, um die Zellen in der G₀/G₁-Phase zu synchronisieren.

Nach erneut 24 h Inkubation wurde zuerst das Diätmedium abgesaugt und durch je 100 µl frisches Diätmedium ersetzt. Anschließend wurden die einzelnen wells mit 80 µl der in Diätmedium gelösten Testsubstanzen (bzw. nur DMSO als Lösungsmittelkontrolle) nach Plan behandelt. Dabei wurden die Proben und DMSO zuvor so verdünnt, dass sie in den gewünschten Konzentrationen vorlagen und die DMSO-Konzentration in allen wells gleich war (0,1%). Die Platte wurde erneut für 30 min. inkubiert und dann mit PDGF (20 ng/ml) oder NBS (10%) nach Plan stimuliert.

Nach 48h Inkubation wurden die wells zuerst mit PBS gewaschen und danach mit Resazurin-Lösung versetzt (10 µg/ml in Diätmedium). Nach 2-stündiger Inkubation wurde mit Hilfe des Tecan Spark® Pro die Fluoreszenz bei 580 nm gemessen (Anregungs-Wellenlänge: 535 nm).

2.3. Materialien

Tabelle 6: Substanzen für den Resazurin Assay

Substanz	Konzentration	Hersteller
DMSO	100%	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
PDGF-BB	1 ng/µl (in ddH ₂ O und 0,2% BSA in PBS)	Bachem (Weil am Rhein, Deutschland)
NBS	100%	Lonza Group Ltd. (Basel, Schweiz)
Resazurin	100 µg/ml (in PBS)	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)

Tabelle 7: Geräte für den Resazurin Assay

Gerät	Hersteller
Tecan Spark®	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)

3. Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

3.1. Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen einzeln durch eine Messzelle geschickt wo sie durch einen Laserstrahl wandern. Das dabei entstehende Streulicht wird detektiert und gibt Informationen über Größe und Granularität der Zelle. Außerdem kann Fluoreszenz detektiert werden. Dies wird auch bei der Zellzyklusanalyse genutzt. [45]

Für diese Arbeit wurden die Zellen für die Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid gefärbt. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA einlagert. Unter isotonen Bedingungen kann er nicht durch die Zellmembran in die Zelle gelangen, sondern färbt nur die DNA toter Zellen. Damit kann der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Probe bestimmt werden. In einer hypotonen Lösung gelangt PI jedoch in die Zelle und liefert Informationen über die Menge der DNA. Da sich die Menge der DNA während des Zellzyklus verändert (sie wird in der S-Phase verdoppelt und bei der Mitose auf die beiden Tochterzellen verteilt), kann daraus abgelesen werden, in welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle befindet. Die sogenannte Sub-G0 Phase bezeichnet den Anteil der fragmentierten DNA in der Probe. [46–48]

Es werden 10.000 Zellen pro Probe vermessen und die Anteile der Zellen in den verschiedenen Phasen berechnet.

3.2. Versuchsaufbau

In drei 6 well-Mikrotiterplatten wurden etwa $0,3 \times 10^6$ Zellen in 2 ml Nährmedium pro well ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24h wurde das Nährmedium durch 2 ml Diätmedium ersetzt, um die Zellen in der G₀/G₁-Phase zu synchronisieren.

Nach erneut 24h Inkubation wurde die Platte mit den verschiedenen Substanzen behandelt. Zuerst wurde das Diätmedium abgesaugt und dann je 1800 µl frisches Diätmedium dazugegeben. Anschließend wurden die einzelnen wells mit 100 µl der in Diätmedium gelösten Testsubstanzen (bzw. nur DMSO als Kontrolle) nach Plan behandelt. Dabei wurden die Proben und DMSO zuvor so verdünnt, dass sie in den gewünschten Konzentrationen vorlagen und die DMSO-Konzentration in allen wells gleich war (0,1%). Die Platten wurden erneut für 30 min. inkubiert und dann mit PDGF (20 ng/ml) nach Plan stimuliert. Schließlich wurden die Platten für weitere 16 h inkubiert.

Am Tag der Messung wurden die Zellen in FC- (flow cytometry) Röhrchen überführt. Damit die toten Zellen in den Proben nicht verloren gingen, wurden alle verwendeten Lösungen und Medien in den Röhrchen zusammengeführt. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und in die Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA für 5 min inkubiert, um die Zellen vom Plattenboden zu lösen. Das Trypsin wurde mit Nährmedium inaktiviert und die Zellsuspension ebenfalls in die Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Röhrchen für 4 min bei 410 g zentrifugiert und der Überstand der Flüssigkeit abgegossen. Danach wurden die Zellen mit 250 µl hypotoner PI-Lösung (50 µg/ml) gefärbt und im FACSCalibur™ vermessen.

3.3. Materialien

Tabelle 8: Substanzen für die Zellzyklusanalyse

Substanz	Konzentration	Hersteller
DMSO	100%	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
PDGF-BB	1 ng/µl (in ddH ₂ O und 0,2% BSA in PBS)	Bachem (Weil am Rhein, Deutschland)

Tabelle 9: Lösungen für die Zellzyklusanalyse

Lösung	Substanzen	Menge
Propidiumiodid-Lösung	Propidioumiodid (2mg/ml)	125 µl
	HFS	4875 µl
HFS	Triton X-100	1 g
	Sodium Citrate	1 g
	PBS	1000 ml
FACS-Puffer	NaCl	40,6 g
	KH ₂ PO ₄	1,3 g
	Na ₂ HPO ₄	11,75 g
	KCl	1,4 g
	LiCl	2,15 g
	NaN ₃ (Na- Azid)	1,0 g
	Na ₂ EDTA	1,8 g
	ddH ₂ O	5000 ml
	pH auf 7,37 eingestellt	

Tabelle 10: Geräte für die Zellzyklusanalyse

Gerät	Hersteller
FACSCalibur™	BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA)

4. Kristallviolett Assay

4.1. Prinzip

Kristallviolett ist ein violetter Farbstoff, der an Proteine und DNA bindet, und photometrisch detektiert werden kann. Diese Färbemethode wird ebenfalls verwendet, um die Zellanzahl zu bestimmen. Die Intensität der Färbung korreliert mit der Anzahl der Zellen. Da tote Zellen ihre Haftung an Oberflächen verlieren, können sie vor der Färbung entfernt werden, sodass nur die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt wird. [49, 50]

4.2. Versuchsaufbau

In eine 96 well-Mikrotiterplatte wurden etwa 5000 Zellen in 200 µl Nährmedium pro well ausgesät. 4 wells wurden nur mit Nährmedium gefüllt. Um die Zellen in der G0/G1-Phase zu synchronisieren, wurde das Nährmedium nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durch 200 µl Diätmedium ersetzt und die Platte erneut 24 h inkubiert

Danach wurde die Platte mit den verschiedenen Substanzen behandelt. Dafür wurde zuerst das Diätmedium abgesaugt und durch je 100 µl frisches Diätmedium ersetzt. Anschließend wurden die einzelnen wells mit 80 µl der in Diätmedium gelösten Testsubstanzen oder Digitonin (100 µg/ml) bzw. nur DMSO als Kontrolle nach Plan behandelt. Dabei wurden die Proben, Digitonin und DMSO zuvor so verdünnt, dass sie in den gewünschten Konzentrationen vorlagen und die DMSO-Konzentration in allen wells gleich war (0,1%). Die Platte wurde erneut für 30 min. inkubiert und dann mit PDGF (20 ng/ml) stimuliert.

Nach weiteren 24h Inkubation wurde der Kristallviolett-Assay durchgeführt. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen. Es wurden 50 µl 0,1%ige Kristallviolett-Lösung pro well dazugegeben und die Platte für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde 3 Mal mit Wasser ausgewaschen, um das ungebundene Kristallviolett zu entfernen. Danach wurden die wells mit je 100 µl 1%iger SDS-Lösung gefüllt und die Platte 15 min am Shaker geschüttelt, um das gebundene Kristallviolett zu lösen. Schließlich wurde die Absorption bei 570 nm im Tecan Spark gemessen.

4.3. Materialien

Tabelle 11: Substanzen für den Kristallviolett Assay

Substanz	Konzentration	Hersteller
DMSO	100%	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
Digitonin	5 mg/ml	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
PDGF-BB	1 ng/ μ l (in ddH ₂ O und 0,2% BSA in PBS)	Bachem (Weil am Rhein, Deutschland)

Tabelle 12: Lösungen für den Kristallviolett Assay

Lösung	Substanzen	Menge
Kristallviolett-Lösung 0,1%	Kristallviolett-Lösung 1%	500 μ l
	ddH ₂ O	4,5 ml
SDS 1%	Natriumdodecylsulfat	1 g
	ddH ₂ O	100 ml

Tabelle 13: Geräte für den Kristallviolett Assay

Gerät	Hersteller
Tecan Spark®	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)

5. Western blot

5.1. Prinzip

Für die Detektion von Proteinen werden die Zellen zuerst lysiert und die Proteine von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Die Proteine werden mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Stoff, der stark an Proteine bindet, versetzt, sodass alle Proteine stark negativ geladen sind. In der Gelelektrophorese wandern sie dadurch im elektrischen Feld zur Anode und werden nur anhand ihrer Größe getrennt. Das so entstandene Auftrennungsmuster wird elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, auf der die Proteine anschließend mittels Antikörper detektiert werden können. Dazu werden primäre Antikörper, die spezifisch an das gewünschte Protein binden, und sekundäre Antikörper, die an den primären Antikörper binden und enzymgekoppelt (an Meerrettichperoxidase - HRP) sind, verwendet. Durch die Zugabe von Substrat (Luminol) findet eine Lumineszenzreaktion statt, durch die das Protein detektierbar wird. Die Menge des emittierten Lichts ist dabei proportional zur Proteinmenge. Es ist jedoch nur ein semiquantitativer Vergleich der Proteinmengen möglich, aber keine absolute Bestimmung der Konzentration, da diese von einigen Faktoren wie der Beladung des Gels mit Proteinsuspension oder der Transferrate auf die Membran beeinflusst wird. [51] Um die Messergebnisse vergleichbar zu machen, werden sie in Bezug zu einer Ladungskontrolle gesetzt. Für die Experimente wurden Aktin bzw. α/β -Tubulin als Ladungskontrolle verwendet.

5.2. Versuchsaufbau

In vier 6 well-Mikrotiterplatten wurden etwa $0,3 \times 10^6$ Zellen in 2 ml Nährmedium pro well ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24h wurde das Nährmedium durch 2 ml Diätmedium ersetzt, um die Zellen in Ruhephase zu versetzen.

Nach erneut 24 h Inkubation wurde die Platte mit den verschiedenen Substanzen behandelt. Zuerst wurde das Diätmedium abgesaugt und dann je 1800 µl frisches Diätmedium dazugegeben. Anschließend wurden die einzelnen wells mit 100 µl der in DMSO gelösten Testsubstanzen (bzw. nur DMSO als Kontrolle) nach Plan behandelt. Dabei wurden die Proben und DMSO zuvor so verdünnt, dass sie in den gewünschten Konzentrationen vorlagen und die DMSO-Konzentration in allen wells gleich war (0,1%). Die Platten wurden erneut für 30 min. inkubiert und dann mit PDGF (20 ng/ml) nach Plan stimuliert.

5.2.1. Zelllyse und Proteinextraktion

Die Zellen der DMSO-Kontrolle wurden sofort nach Behandlung (0 h), die Zellen der anderen Proben nach 3, 6 und 24 h lysiert. Dafür wurden die Mikrotiterplatten auf Eis gelegt, das Medium abgesaugt und die wells mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurden sie mit jeweils 50 µl Lysispuffer für 10 min. auf Eis inkubiert. Mit einem Schaber wurden die Zellen vom Boden der wells gekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Darin wurden sie für 20 min. bei 16000 und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in frische Eppendorf-Gefäße überführt und 5 µl davon für den Bradford-Assay 1:10 mit ddH₂O verdünnt. Die restliche Protein-Suspension wurde mit jeweils 30 µl 3x SDS-sample buffer versetzt und 10 min. bei 95°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Eppendorf-Gefäße kurz zentrifugiert und bis zur Durchführung der Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

5.2.2. Bradford-Assay

Für die Vergleichbarkeit der Banden im Western Blot wird bei der Gelelektrophorese in jede Tasche die gleiche Menge Protein aufgetragen. Dafür ist es nötig, die Proteinkonzentration in den Proben zu bestimmen. Dies wird im Bradford-Assay mittels Photometrie gemacht.

Das Bradford-Assay basiert auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue mit Proteinen. Die Bindung von Proteinen an den Farbstoff führt zum Übergang von einer kationischen in eine anionische Sulfatform und dadurch zu einer Shift im Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595 nm. [52]

Für die Berechnung der genauen Proteinkonzentrationen wird gemeinsam mit den Proben eine Verdünnungsreihe von Albumin bekannter Konzentration vermessen und aus den Messergebnissen eine Kalibrierkurve berechnet.

In eine 96-well Platte wurden 190 µl pro well Roti-Quant-Lösung sowie 10 µl pro well verdünnte Probe oder Albumin-Verdünnung (jeweils dreifach) pipettiert und die Platte bei 595 nm im Tecan Sunrise vermessen.

5.2.3. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 7,5%ige Tris-HCl-Gele hergestellt, die aus einem Trenn- (unten) und einem Sammelgel (oben) bestanden. Die 7,5% beziehen sich auf die Konzentration des Polyacrylamids (PAA) im Sammelgel und wurden gewählt, um eine gute Auftrennung der relevanten Proteine zu gewährleisten.

Die Gele wurden in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur gegeben und die Apparatur mit 1x Elektroporesepuffer angefüllt. Es wurden jeweils 20 µg Protein (oder so viel Protein wie möglich, da einige Proben wegen der sehr niedrigen Anzahl an Zellen nur wenig Protein enthielten) sowie Marker (1x pro Gel) in die Taschen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromspannung durchgeführt. Zu Beginn wurde die Spannung auf 60 V gestellt, bis die Proben das Trenngel erreichten, danach wurde sie auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die blaue Front das Ende des Gels erreicht hatte.

5.2.4. Blotting

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran übertragen, um sie detektieren zu können. Dafür wurden die Membranen zuerst mit Methanol und mit Blotting-Puffer befeuchtet. Der Kontakt mit dem Methanol ist notwendig, um eine gute Befeuchtung mit Blotting-Puffer zu gewährleisten, da die Membranen stark hydrophob reagieren. Anschließend wurden die Membranen mit dem Gel zwischen zwei ebenfalls mit Blotting-Puffer befeuchtete Filtermembranen in der Apparatur platziert. Diese wurde mit Blotting-Puffer gefüllt. Mittels Kühllakku und Magnetrührer wurde eine konstante Temperatur gewährleistet. Der Western Blot wurde bei einer konstanten Stromstärke von 110 mA (90 min.) durchgeführt.

5.2.5. Proteindetektion

Die Membranen wurden anschließend für eine Stunde mit 5%iger Milchpulver-Lösung (in TBST) bei Raumtemperatur inkubiert, um alle freien Stellen auf der Membran zu blockieren, damit es zu keiner unspezifischer Bindung bei der folgenden Inkubation mit Antikörper kommen konnte. Danach wurden die Membranen 3 Mal mit 1x TBST gewaschen.

Die Membranen wurden zuerst mit primärem (gegen pRb) und dann mit sekundärem Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 18). Dies geschah entweder bei Raumtemperatur für 1 bzw. 2 h oder bei 4°C über Nacht. Dazwischen wurden die Membranen immer 3 Mal mit 1x TBST gewaschen. Als Ladungskontrolle wurden die Aktin- oder α/β -Tubulinbanden detektiert. Dies geschah auf die gleiche Weise wie die Detektion von pRb.

Detektiert wurde mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion im IMAGE Reader LAS3000. Für die Detektion wurden die Detektionslösungen 1 und 2 (siehe Tabelle 19) separat hergestellt. Erst direkt vor der Detektion wurden sie vermischt und die Membran damit versetzt. Die darauffolgende Evaluierung geschah mit dem AIDA Image Analyzer und der Normalisierung der Bandenintensitäten von pRb zu den Intensitäten der entsprechenden Aktin- bzw. α/β -Tubulinbanden. Diese Proteine dienen als Ladungskontrollen, da sie in den Zellen in großen Mengen vorhanden sind. So können die Banden auch verglichen werden, wenn nicht die gleiche Menge Protein verwendet wird.

5.3. Materialien

5.3.1. Probenvorbereitung und Bradford Assay:

Tabelle 14: Substanzen für die Behandlung und Stimulation der Zellen

Substanz	Konzentration	Hersteller
DMSO	100%	Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
PDGF-BB	1 ng/μl (in ddH ₂ O und 0,2% BSA in PBS)	Bachem (Weil am Rhein, Deutschland)

Tabelle 15: Lösungen für Zellyse und Bradford Assay

Lösung	Substanzen	Menge
PBS	NaCl	36,0 g
	Na ₂ HPO ₄	7,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,15 g
	ddH ₂ O	5000 ml
		pH auf 7,4 eingestellt
Lysis-Puffer	RIPA buffer	106 μl
	Complete	4,5 μl
	PMSF	1,1 μl
	Na ₃ VO ₄	0,6μl
	NaF	0,6 μl
RIPA-Puffer	NaCl	438,3 mg
	Tis- HCl	394,0 mg
	Nonidet P 40	500,0 mg
	Deoxycholat	125,0 mg
	SDS	50,0 mg
	ddH ₂ O	ad. 50,0 ml
Roti-Quant-Lösung (Firma: Carl Roth)	Roti-Quant	4 ml
	ddH ₂ O	16 ml
BSA-Stocklösung	BSA	1 mg
	ddH ₂ O	1 ml
3x SDS Samplebuffer	0,5M Tris- HCl pH 6,8	37,5 ml
	SDS	6,0 g
	Glycerol	30,0 ml
	Bromphenolblau	15,0 mg
	ddH ₂ O	Ad 100 ml

5.3.2. Gelelektrophorese, Western blot & Detektion:

Tabelle 16: Gele für die Gelelektrophorese

Gel	Lösungen	Menge
Trenngel (7,5%) für 5 Gele	PAA 30%	9,375 ml
	1,5M TRIS HCl pH 8,8	9,375 ml
	10% SDS	375 µl
	H ₂ O	18,375 ml
	TEMED	37,5 µl
	APS	187,5 µl
Sammelgel für 5 Gele	PAA 30%	3,2 ml
	1,25M TRIS HCl pH 6,8	1875 µl
	10% SDS	187,5 µl
	H ₂ O	13,12 ml
	TEMED	37,5 µl
	APS	187,5 µl

Tabelle 17: Puffer für Gelelektrophorese, Blotting und Detektion

Puffer	Substanzen	Menge
1x Elektrophoresepuffer	10x Elektrophoresepuffer	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
10x Elektrophoresepuffer	Tris- Base	30 g
	Glycine	144 g
	SDS	10 g
	ddH ₂ O.	Ad 1000 ml
1x Blotting Puffer	5x Blotting Puffer	200 ml
	Methanol	200 ml
	ddH ₂ O	600 ml
5x Blotting Puffer	Tris- Base	15,169 g
	Glycine	72,9 g
	ddH ₂ O	Ad 1000 ml
1x TBST	10x TBST	100 ml
	ddH ₂ O	900 ml
10x TBST	Tris- Base	30 g
	NaCl	111 g
	Tween 20	10 ml
	ddH ₂ O	Ad 1000 ml
		pH auf 8,0 eingestellt

Tabelle 18: primäre Antikörper für die Proteindetektion

Primäre AK	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
phosphor Rb (Ser807/811)	rabbit, polyclonal	1:1000 in 5% BSA in 1x TBST	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
actin	mouse, monoclonal	1:10000 in 5% Milchpulver in 1x TBST	Millipore (Burlington, MA, USA)
α/β -tubulin	rabbit, polyclonal	1:1000 in 5% BSA in 1x TBST	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)

Tabelle 19: sekundäre Antikörper für die Proteindetektion

Sekundäre AK	Verdünnung	Hersteller
HRP-linked rabbit	1:2000 in 5% Milchpulver in 1x TBST	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
HRP-linked mouse	1:1000 in 5% Milchpulver in 1x TBST	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)

Tabelle 20: weitere Substanzen für die Proteindetektion

Substanz	Hersteller
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 21: Detektionslösungen

	Substanz	Menge
Detektionslösung 1	ddH ₂ O	4500 µl
	ECL Puffer	500 µl
	p-Cumarsäure (Stammlösung)	22,5 µl
	Luminol (Stammlösung)	50 µl
Detektionslösung 2	ddH ₂ O	4500 µl
	ECL Puffer	500 µl
	H ₂ O ₂	3 µl
p-Cumarsäure-Stammlösung	p-Cumarsäure	0,15 g
	DMSO	10 ml
Luminol-Stammlösung	Luminol	0,44 g
	DMSO	10 ml

Tabelle 22: Geräte für den Western blot

Gerät	Hersteller
Biological Safety Cabinets Herasafe™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)
Heracell™ 150 Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)
Tecan Sunrise™	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
LAS-3000™ Luminescent Image Analyzer	Fujifilm (Tokio, Japan)

6. Software

Tabelle 23: Software

Software	Hersteller
Vi-Cell™ XR 2.03	Beckmann Coulter, Fullerton (CA, USA)
Tecan SparkControl Magellan	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
XFluor4™ Software	Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
Image Reader LAS-3000™ 2.21	Fujifilm (Tokyo, Japan)
Multi Gauge 3.0	Fujifilm (Tokyo, Japan)
CellQuest™ Pro software	BD Bioscience Pharmingen (SanDiego, CA, USA)
GraphPad PRISM 4.03	GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA, USA)
Microsoft® Office Excel 2010	Microsoft
ACD/ChemSketch (Freeware) 2017 2.1	Advanced Chemistry Development Inc. (Toronto, Kanada)
EndNote X7	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, CA, USA)

7. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software Graphpad PRISM 4.03 verwendet. Die Signifikanz wurde mit one way ANOVA und dem Bonferroni post test berechnet, wobei Ergebnisse mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet wurden. Alle Experimente, die statistisch ausgewertet wurden, wurden mindestens drei Mal durchgeführt.

Ergebnisse

1. Antiproliferativer Effekt der RA-Derivate und Metaboliten

Der Methylester der Rosmarinsäure hat einen stärkeren antiproliferativen Effekt auf VSMC als die Säure selbst. [41] Zunächst wurde untersucht, ob andere Ester der RA eine vergleichbare antiproliferative Wirkung haben und ob ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Wachstumshemmung und der Kettenlänge der Esterseitenkette besteht. Zusätzlich wurden auch 4 Metaboliten der Rosmarinsäure getestet, ob sie ebenfalls die Proliferation der VSMC hemmen können.

Zuerst wurden alle Probesubstanzen in der gleichen Konzentration (10 μM) im Resazurin-Assay getestet mit Ausnahme von Rosmarinsäuremethylester (RAME) und Kaffeesäure (CA). RAME wurde in einer Konzentration von 3 μM nahe seiner IC_{50} getestet und CA, in einer Konzentration von 50 μM , da sie zuvor bei einer Konzentration von 10 μM keine Wirkung gezeigt hatte [41].

1.1. Einfluss von RA-Derivaten und Metaboliten auf die PDGF-induzierte VSMC Proliferation

Zellen, die mit PDGF zum Wachstum angeregt wurden zeigten eine ca. doppelt so hohe Fluoreszenz im Resazurin-Assay, als nicht stimulierte Zellen. RAET, RABU, RAOCT und RADOD hemmten die Proliferation von mit PDGF stimulierten VSMC (Abbildung 3). RAME zeigte mit einer Hemmung des Zellwachstums von 40 – 50%, einen geringeren Effekt als die anderen Ester, was sich jedoch durch die niedrigere Konzentration von RAME in der Probe erklären lässt und mit den schon vorhandenen Daten zur IC_{50} von RAME deckt. Die Metabolite der Rosmarinsäure zeigten keinen antiproliferativen Effekt.

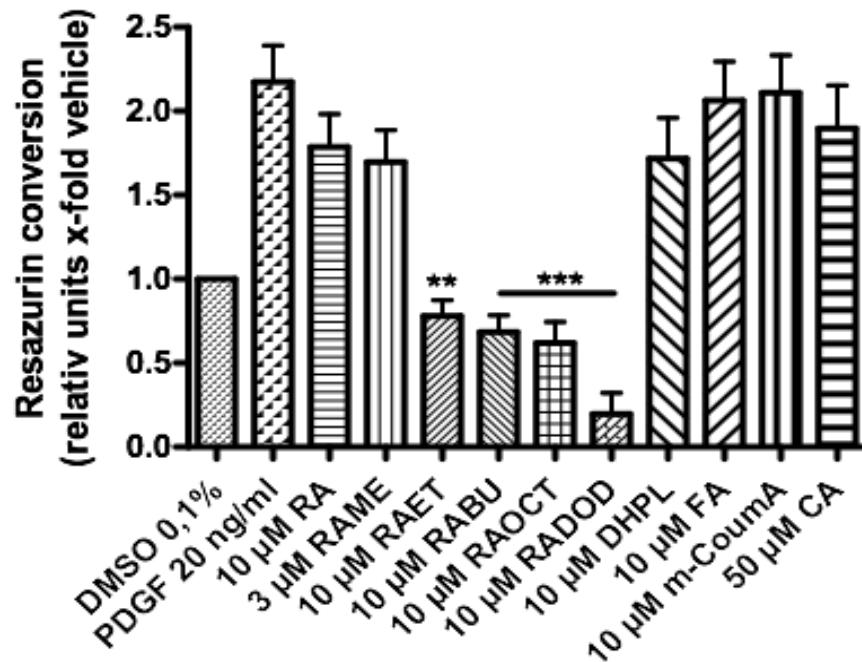


Abbildung 3: Hemmung der Proliferation von mit PDGF stimulierten VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung mit den Probesubstanzen und Stimulation mit PDGF 48 h inkubiert. Die Menge an metabolisch aktiven Zellen wurde mit dem Resazurin-Assay bestimmt. Die Messwerte wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Werte der mit Substanzen behandelten Proben wurden mit der Wachstumskontrolle verglichen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

1.2. Wirkung von RA-Derivaten und Metaboliten auf mit NBS stimulierte VSMC

Die Stimulierung mit NBS führte im Vergleich zur Stimulierung mit PDGF zu einer ca. drei mal so hohen Fluoreszenz in den Zellen. Der Effekt der zu untersuchenden Substanzen war bei mit NBS stimulierten Zellen weniger stark zu sehen als bei jenen Zellen, die mit PDGF stimuliert wurden. Nur die Rosmarinsäureester zeigten eine schwache Wirkung, die jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 4).

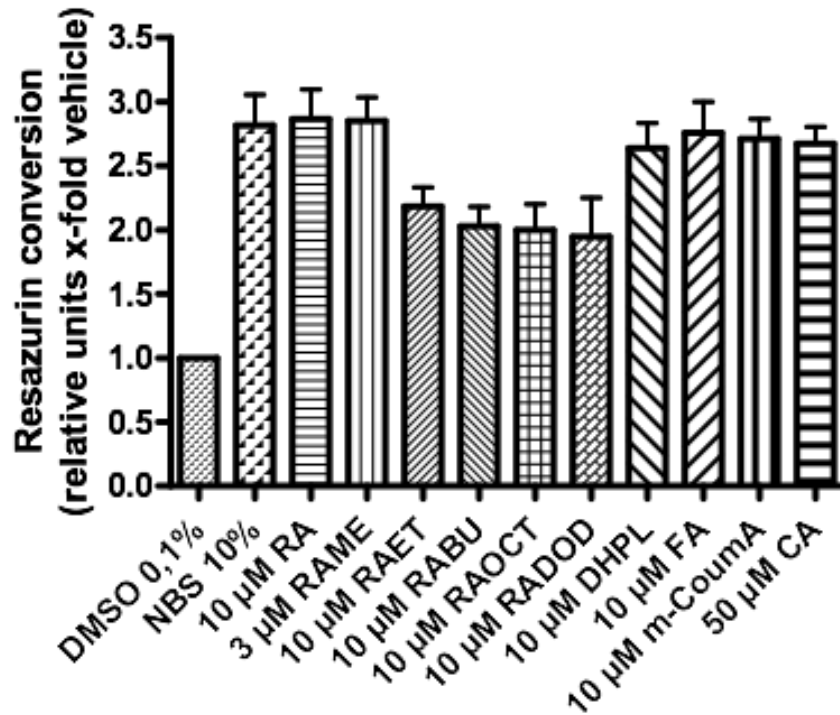


Abbildung 4: Hemmung der Proliferation von mit NBS stimulierten Zellen: die Zellen wurden nach Behandlung mit den Probesubstanzen und Stimulation mit NBS 48 h inkubiert. Die Menge an metabolisch aktiven Zellen wurde mit dem Resazurin-Assay bestimmt. Die Werte wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden die Werte der mit Substanzen behandelten Zellen mit der mit NBS stimulierten Probe. Keine der Testsubstanzen zeigte einen signifikanten Effekt. (one way ANOVA, Bonferroni)

1.3. IC₅₀ der Rosmarinsäureester

Für RAET, RABU, RAOCT und RADOD, jene Substanzen, die im Resazurin-Assay einen Effekt gezeigt hatten, wurde die IC₅₀ bestimmt. Dafür wurden sie in Konzentrationen von 0,1 bis 10 µM getestet und die IC₅₀ mit Graphpad PRISM 4.03 berechnet.

RAET, RABU und RAOCT hemmten das VSMC-Wachstum konzentrationsabhängig (Abb 5 – 7). Die IC₅₀-Werte von RAET, RABU und RAOCT sind in Tabelle 24 aufgelistet. RADOD zeigte in Konzentrationen bis 1 µM keine Wirkung auf die Proliferation mit PDGF stimulierter VSMC, schien jedoch unter dem Lichtmikroskop in Konzentrationen ab 3 µM zusätzlich zur starken Proliferations-Hemmung die Morphologie der Zellen zu beeinflussen, was auf einen toxischen Effekt der RADOD hinweist (Abbildung 8).

Tabelle 24: IC50 der Rosmarinsäureester

RA-Derivat	IC50
RAET	3,28 μM
RABU	3,13 μM
RAOCT	3,25 μM

Da die Wirksamkeit der Rosmarinsäure durch Veresterung gesteigert wird (IC50 von RA = 5,79 μM , IC50 von RAME = 3,12 μM) [41], stellte sich die Frage, ob die Kettenlänge der Esterseitenkette ebenfalls einen Einfluss auf die Wirksamkeit hat. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da die IC50-Werte aller Rosmarinsäureester sehr nahe beieinander liegen.

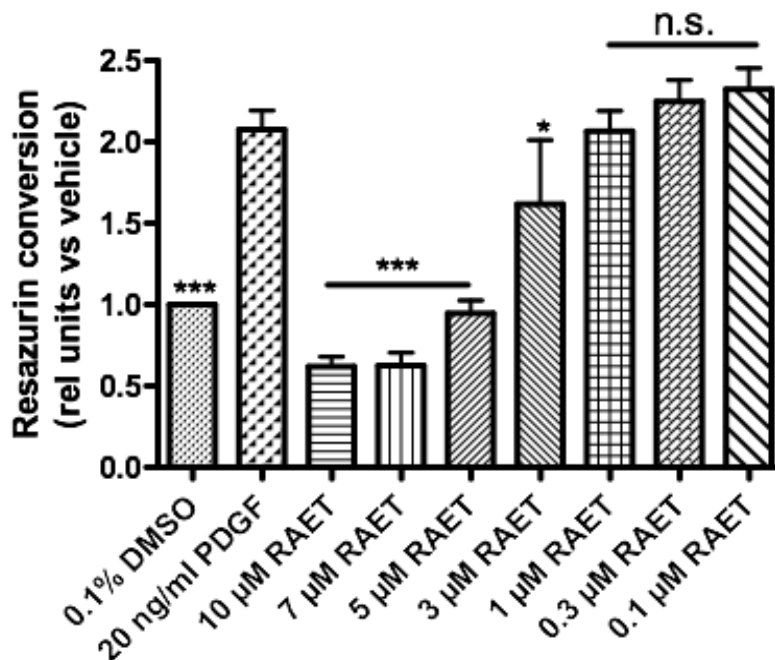


Abbildung 5: IC50 von RAET: die Werte wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei bis sechs unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden die Werte der mit Substanzen behandelten Zellen mit der mit PDGF stimulierten Probe. n.s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

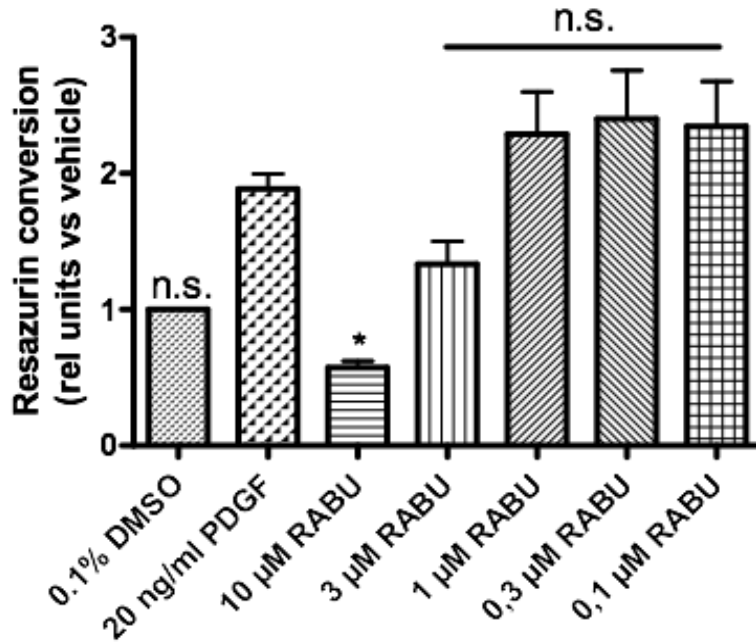


Abbildung 6: IC50 von RABU: die Werte wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden die Werte der mit Substanzen behandelten Zellen mit der mit PDGF stimulierten Probe. n.s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, (one way ANOVA, Bonferroni)

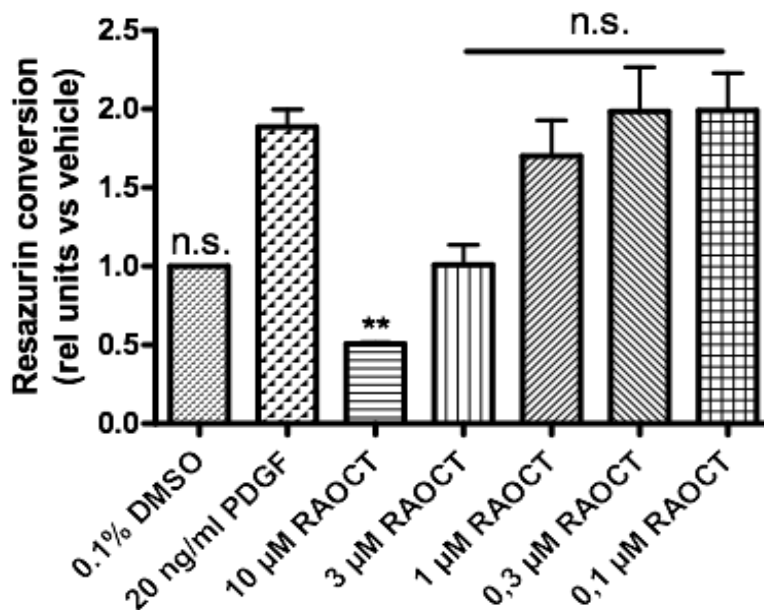


Abbildung 7: IC50 von RAOCT: die Werte wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden die Werte der mit Substanzen behandelten Zellen mit der mit PDGF stimulierten Probe. n.s. = nicht signifikant, ** $p < 0,01$, (one way ANOVA, Bonferroni)

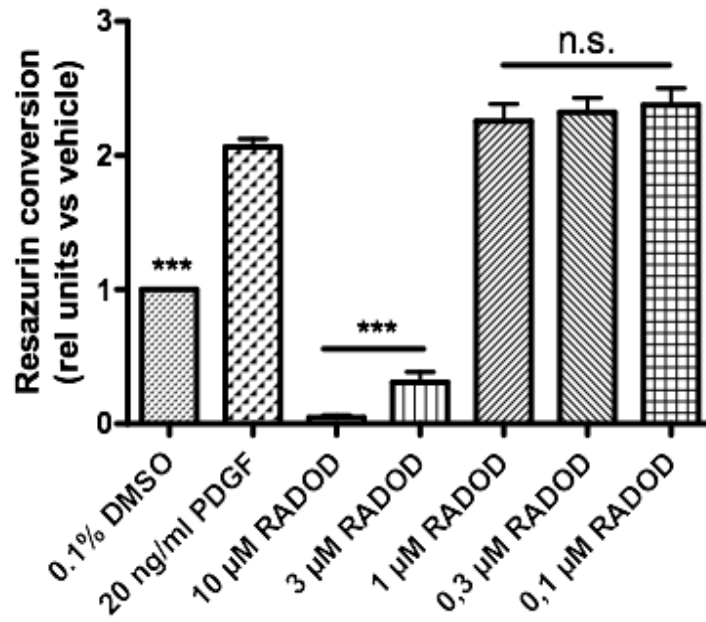


Abbildung 8: IC50 von RADOD: die Werte wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei bis vier unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden die Werte der mit Substanzen behandelten Zellen mit der mit PDGF stimulierten Probe. n.s. = nicht signifikant, *** $p < 0,001$, (one way ANOVA, Bonferroni)

2. Effekt der RA-Derivate auf den Zellzyklus von VSMC

RAME arretiert die Zellen in der G₀/G₁ und frühen S-Phase. [41] Um zu untersuchen, ob dies für die anderen Rosmarinsäureester auch zutrifft wurden sie in der Zellzyklusanalyse mit RAME verglichen. Die Substanzen wurden jeweils in Konzentrationen von 1 µM, 3 µM und 10 µM getestet.

Nach 16 Stunden PDGF Stimulation merkt man einen wesentlichen Anstieg an VSMC in den S- und G₂/M-Phasen. Nach derselben Zeit wurden Zellen, die mit 10 µM RAME, RAET oder RADOD behandelt wurden, sowie mit 3 µM oder 10 µM RABU oder RAOCT behandelten Zellen zum Großteil in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus zurückgehalten. Bei Behandlung mit 3 µM RAME befand sich ein größerer Anteil der Zellen in der S-Phase als in den anderen Proben.

In den Proben, die mit 10 µM RAET, RABU oder RAOCT oder 3 µM RAOCT oder RADOD behandelt wurden, befand sich ein höherer Anteil an den Zellen in der subG₀ Phase als in mit niedrigeren Konzentrationen behandelten Proben, was auf eine erhöhte Zytotoxizität dieser Derivate hinweisen könnte.

RAET, RABU, RAOCT und RADOD arretieren die Zellen in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus, so wie die RAME, es fehlt jedoch der konzentrationsabhängige Übergang des Arrests von G₁- in die S-Phase wie bei RAME [41] beobachtet wurde (Abb. 9 – 13). Es scheint, als ob RAME den Zellzyklus konzentrationsabhängig verlangsamt, während bei den anderen Derivaten mit Ausnahme von RAET der G₀/G₁-Arrest schon bei 3 µM stattfindet.

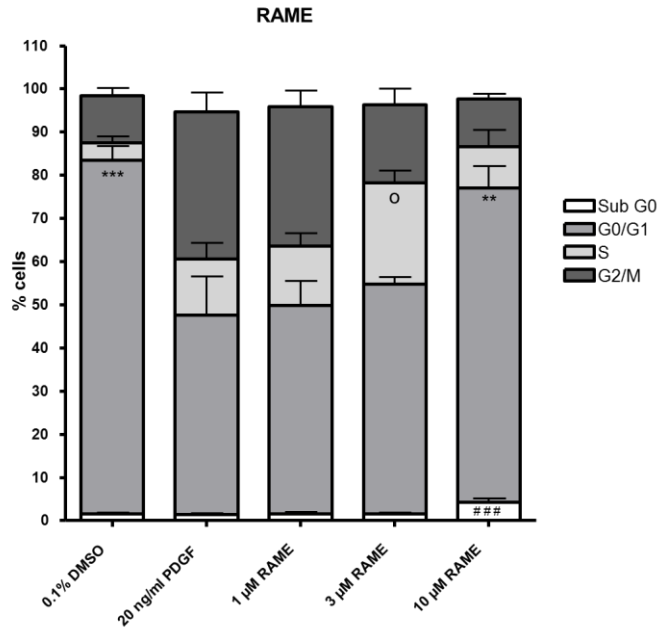


Abbildung 9: Zellzyklusanalyse der mit RAME behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF: die Ergebnisse zeigen die prozentuellen Anteile der Zellen in den Phasen des Zellzyklus, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden jeweils die Werte von G0/G1-, S- und Sub G0-Phase der mit Substanzen behandelten Zellen mit jenen der mit PDGF stimulierten Probe. G0/G1-Phase: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, S-Phase: o $p < 0,05$, Sub G0-Phase: ### $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

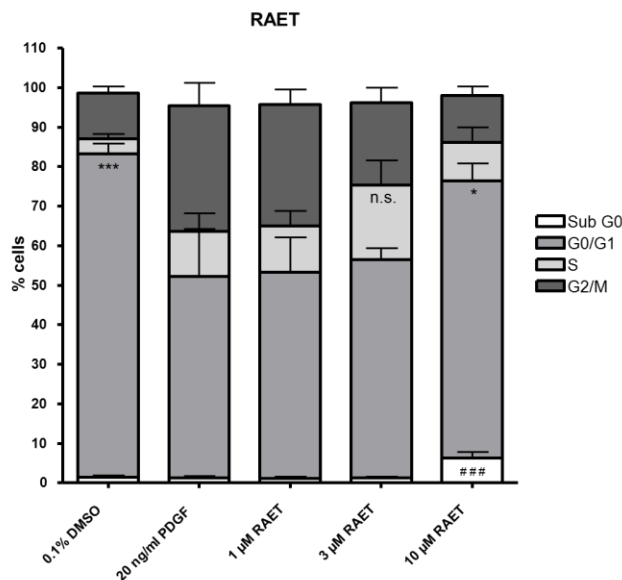


Abbildung 10: Zellzyklusanalyse der mit RAET behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF: die Ergebnisse zeigen die prozentuellen Anteile der Zellen in den Phasen des Zellzyklus, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei bis vier unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden jeweils die Werte von G0/G1-, S- und Sub G0-Phase der mit Substanzen behandelten Zellen mit jenen der mit PDGF stimulierten Probe. G0/G1-Phase: * $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, S-Phase: n.s. = nicht signifikant, Sub G0-Phase: ### $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

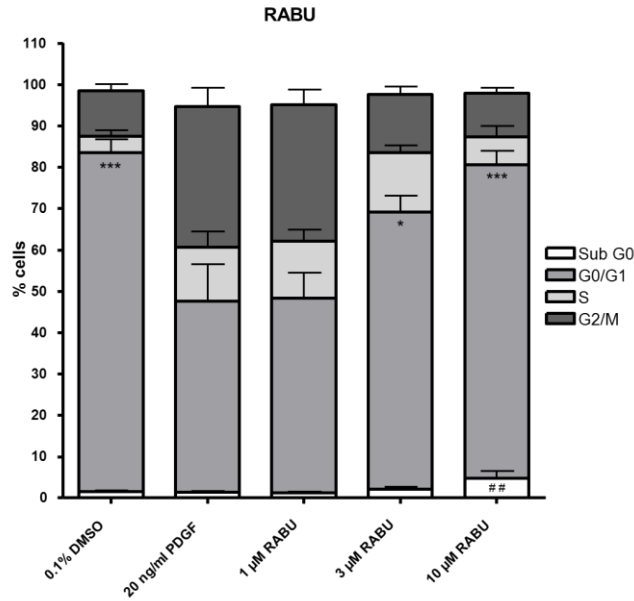


Abbildung 11: Zellzyklusanalyse der mit RABU behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF: die Ergebnisse zeigen die prozentuellen Anteile der Zellen in den Phasen des Zellzyklus, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden jeweils die Werte von G0/G1-, S- und Sub G0-Phase der mit Substanzen behandelten Zellen mit jenen der mit PDGF stimulierten Probe. G0/G1-Phase: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, Sub G0-Phase: ## $p < 0,01$ (one way ANOVA, Bonferroni)

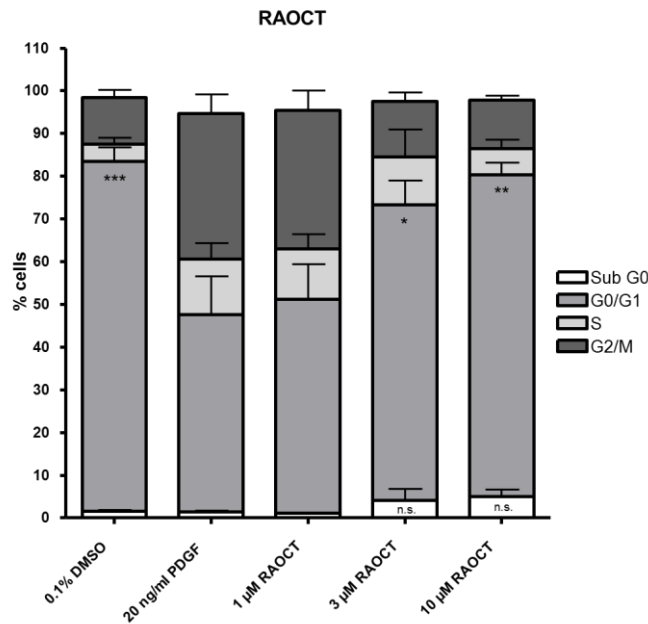


Abbildung 12: Zellzyklusanalyse der mit RAOCT behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF: die Ergebnisse zeigen die prozentuellen Anteile der Zellen in den Phasen des Zellzyklus, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden jeweils die Werte von G0/G1-, S- und Sub G0-Phase der mit Substanzen behandelten Zellen mit jenen der mit PDGF stimulierten Probe. G0/G1-Phase: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Sub G0-Phase: n.s. = nicht signifikant (one way ANOVA, Bonferroni)

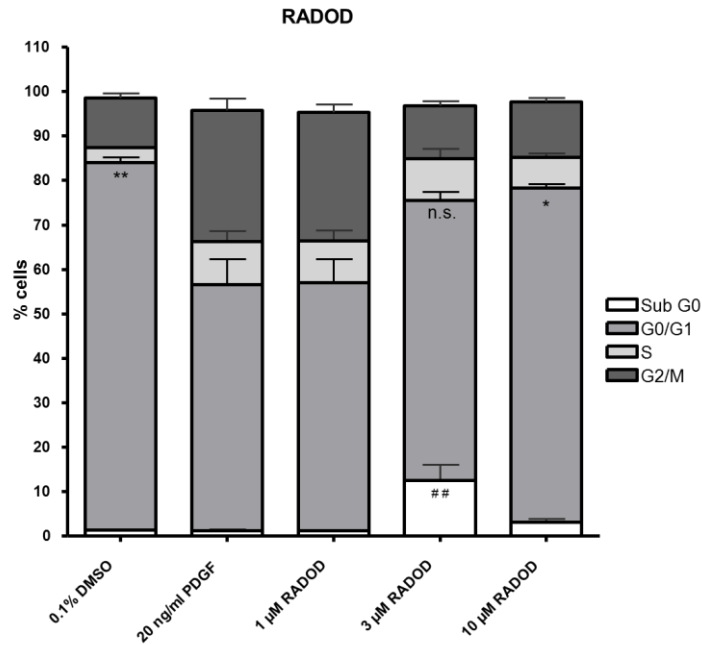


Abbildung 13: Zellzyklusanalyse der mit RADOD behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF: die Ergebnisse zeigen die prozentuellen Anteile der Zellen in den Phasen des Zellzyklus, angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Verglichen wurden jeweils die Werte von G0/G1-, S- und Sub G0-Phase der mit Substanzen behandelten Zellen mit jenen der mit PDGF stimulierten Probe. G0/G1-Phase: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s. = nicht signifikant, Sub G0-Phase: ## $p < 0,01$ (one way ANOVA, Bonferroni)

3. RA-Derivate wirken in höheren Konzentrationen stark antiproliferativ und verändern die Morphologie der VSMC

Mit dem Kristallviolett Assay wurde ein weiterer Test der Zellzahl durchgeführt, um die Ergebnisse des Resazurin Assays abzusichern. Weil RADOD und in geringerem Maß auch die anderen RA-Ester bei höheren Konzentrationen die Morphologie der Zellen unter dem Lichtmikroskop zu verändern schienen, wurden sie zusätzlich zu Konzentrationen von 3 μM und 10 μM auch in Konzentrationen von 30 μM getestet. Außerdem wurde der zytotoxische Stoff Digitonin zum Vergleich mit untersucht.

In Proben, die mit 30 μM oder 10 μM aller getesteten Ester oder 3 μM RABU, RAOCT oder RADOD behandelt wurden, befanden sich signifikant weniger Zellen als in der unbehandelten mit PDGF stimulierten Probe (Abb. 14 – 18). Außerdem war die Anzahl der Zellen in den oben genannten Proben niedriger als in der Lösungsmittelkontrolle, in der die Zellen nicht zum Wachstum angeregt worden waren.

Die Morphologie der mit 30 μM aller Derivate sowie 10 μM von RADOD behandelten VSMC war unter dem Lichtmikroskop vergleichbar mit jener Probe, die mit Digitonin behandelt wurde. Dies weist nicht nur auf einen antiproliferativen, sondern auch auf einen zytotoxischen Effekt hin. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse, die einen größeren Anteil an fragmentierter DNA in Proben, die mit RADOD behandelt wurden, zeigen (vergleiche Abb. 13), verstärken die Hinweise auf die Zytotoxizität von RADOD.

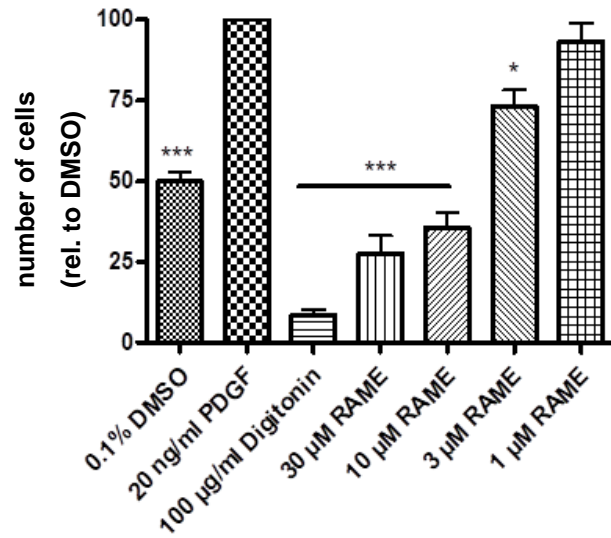


Abbildung 14: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RAME auf mit PDGF stimulierte VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF 24 h inkubiert, die Zellviabilität wurde im Kristallviolett Assay gemessen. Die Messwerte wurden auf die Wachstumskontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Werte der mit Substanzen behandelten Proben wurden mit der Wachstumskontrolle verglichen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

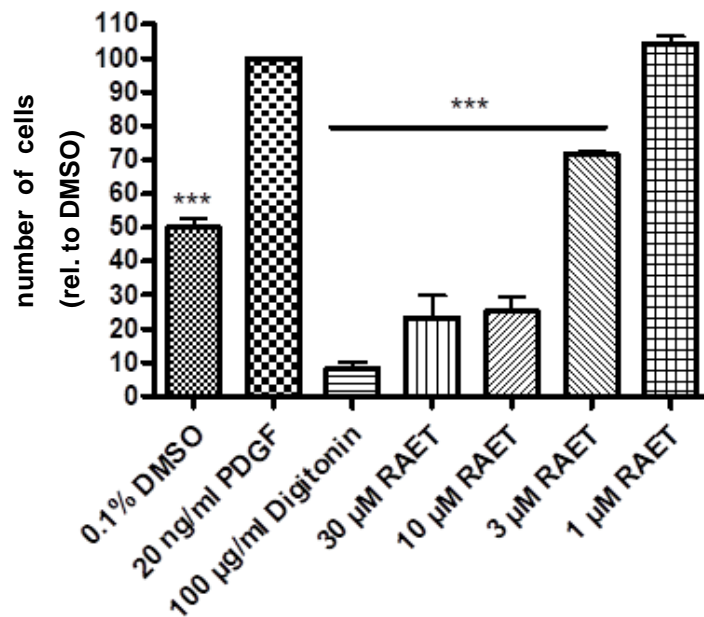


Abbildung 15: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RAET auf mit PDGF stimulierte VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF 24 h inkubiert, die Zellviabilität wurde im Kristallviolett Assay gemessen. Die Messwerte wurden auf die Wachstumskontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Werte der mit Substanzen behandelten Proben wurden mit der Wachstumskontrolle verglichen. *** $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

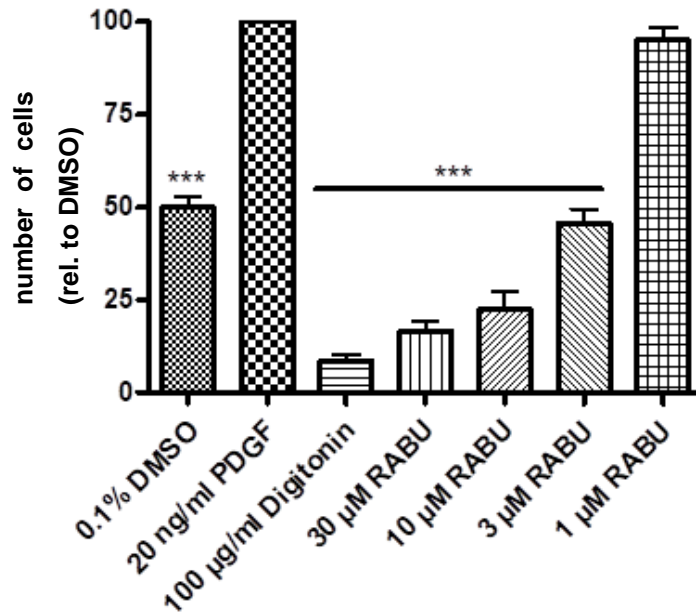


Abbildung 16: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RABU auf mit PDGF stimulierte VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF 24 h inkubiert, die Zellviabilität wurde im Kristallviolett Assay gemessen. Die Messwerte wurden auf die Wachstumskontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Werte der mit Substanzen behandelten Proben wurden mit der Wachstumskontrolle verglichen. *** $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

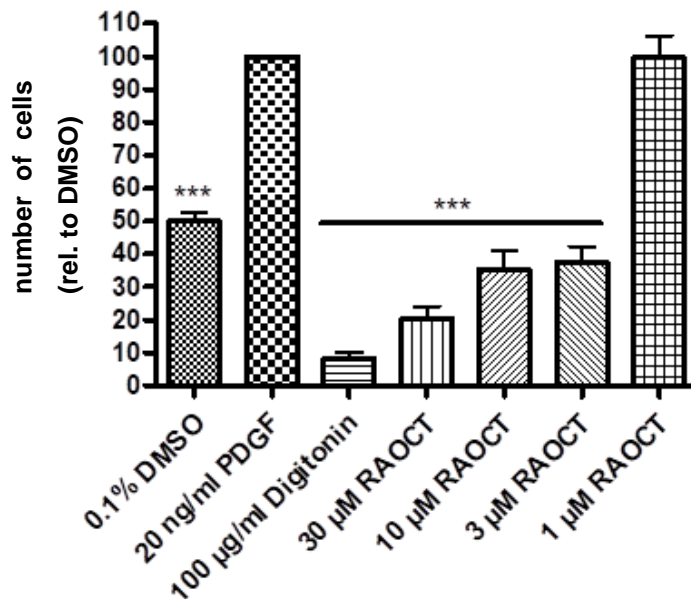


Abbildung 17: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RAOCT auf mit PDGF stimulierte VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF 24 h inkubiert, die Zellviabilität wurde im Kristallviolett Assay gemessen. Die Messwerte wurden auf die Wachstumskontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Werte der mit Substanzen behandelten Proben wurden mit der Wachstumskontrolle verglichen. *** $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

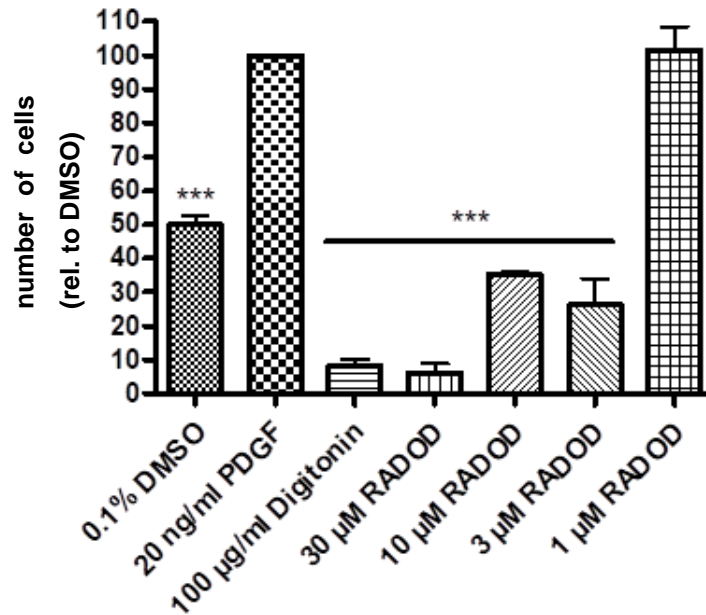


Abbildung 18: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RADOD auf mit PDGF stimulierte VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF 24 h inkubiert, die Zellviabilität wurde im Kristallviolett Assay gemessen. Die Messwerte wurden auf die Wachstumskontrolle normalisiert und zeigen Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Werte der mit Substanzen behandelten Proben wurden mit der Wachstumskontrolle verglichen. *** $p < 0,001$ (one way ANOVA, Bonferroni)

4. Die Wirkung der RA-Derivate auf die Phosphorylierung von Rb

RAME hemmt die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb), [41] die ein Anzeichen für den Übergang der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus ist. [53] Um zu sehen, ob dies auch für die anderen Rosmarinsäureester zutrifft, wurden im Western Blot die Mengen an phosphoryliertem Retinoblastom-Protein (pRb) in mit 5 µM RAET, RABU, RAOCT oder RADOD behandelten Zellen nach 3, 6 und 24 h gemessen. Zum Vergleich wurden Zellen auch mit 5 µM RAME behandelt.

In unbehandelten Zellen stieg die Menge pRb nach 6 h Inkubationszeit an. In Zellen, die mit Rosmarinsäureestern behandelt wurden, war nach 6 und 24 h weniger pRb vorhanden als in unbehandelten Zellen zum selben Zeitpunkt. Diese Ergebnisse stammen jedoch nur aus zwei Experimenten und um sie zu bestätigen sollten weitere Experimente durchgeführt werden. Die Abbildungen 19 – 21 zeigen die Werte der nur mit PDGF stimulierten Probe im Vergleich zu jenen, die mit einer der Testsubstanzen behandelt wurden sowie Beispiele der pRb- und Aktin-Banden der verschiedenen Proben.

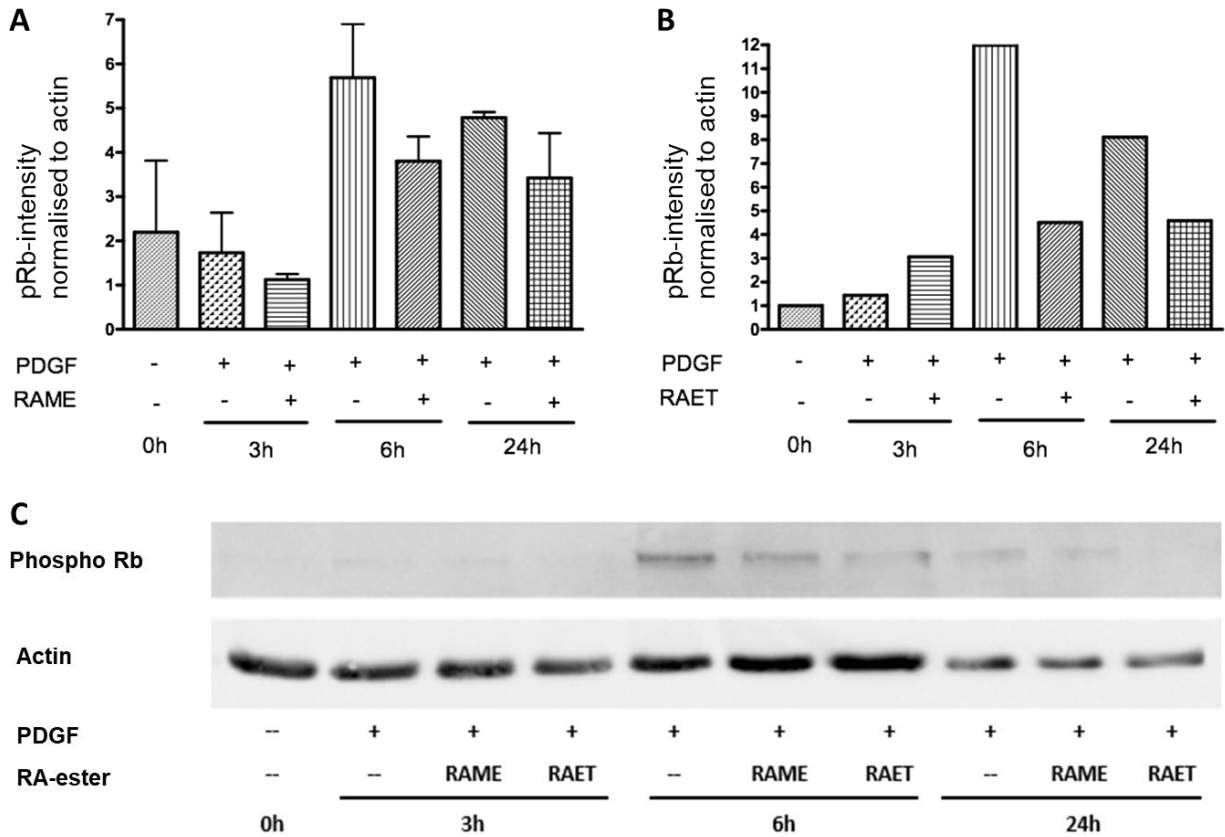


Abbildung 19: A & B) Expression von pRb in mit RAME bzw. RAET behandelten VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die pRb-Expression wurde im Western blot ermittelt, als Ladungskontrolle wurde Aktin bzw. α/β -Tubulin verwendet. Die Messwerte zeigen Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten (RAME) bzw. eines Experiments (RAET). **C) Beispiel für pRb- (oben) und Aktin-Banden (unten) im Western Blot:** die Banden zeigen von links nach rechts: Zellyse nach 0h, nach 3h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RAME und RAET, nach 6h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RAME und RAET, nach 24h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RAME und RAET

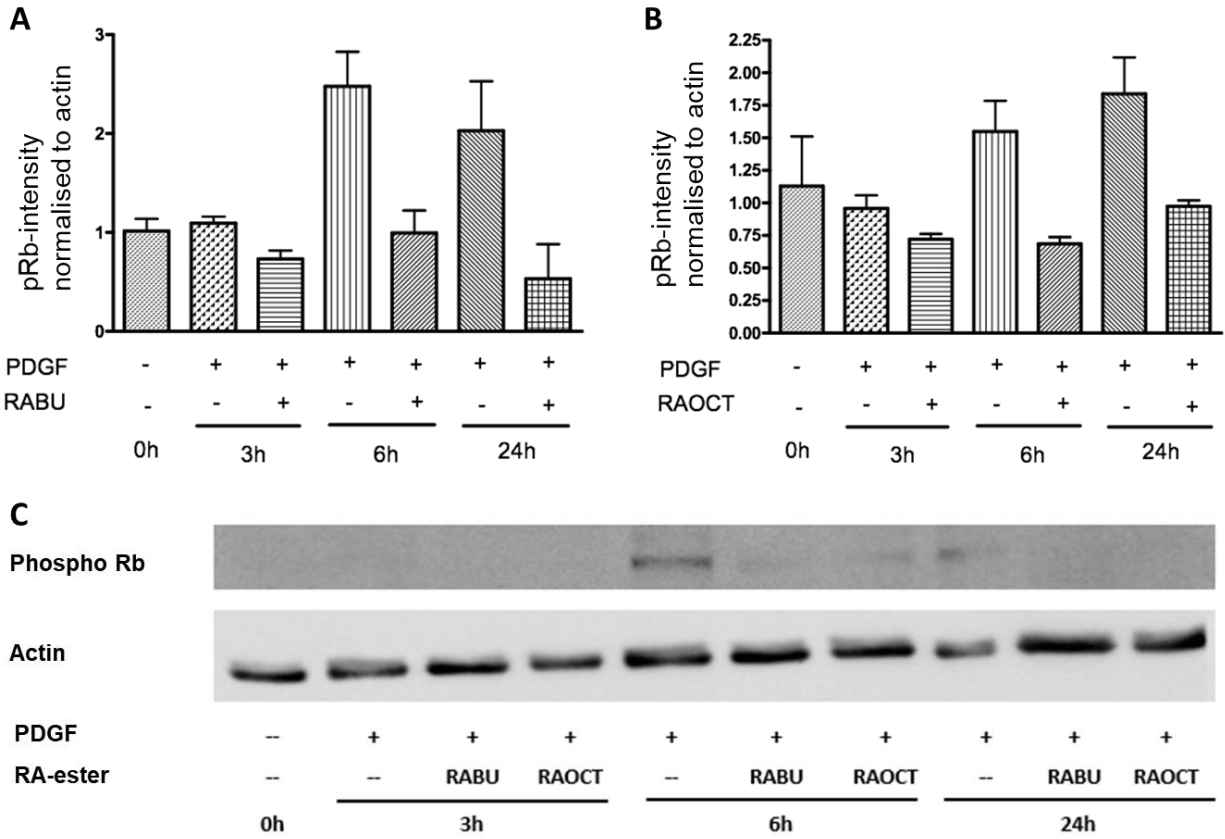


Abbildung 20: A & B) Expression von pRb in mit RABU bzw. RAOCT behandelten VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die pRb-Expression wurde im Western blot ermittelt, als Ladungskontrolle wurde Aktin bzw. α/β -Tubulin verwendet. Die Messwerte zeigen Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten. **C) Beispiel für pRb- (oben) und Aktin-Banden (unten) im Western Blot:** die Banden zeigen von links nach rechts: Zelllyse nach 0h, nach 3h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RABU und RAOCT, nach 6h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RABU und RAOCT, nach 24h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RABU und RAOCT

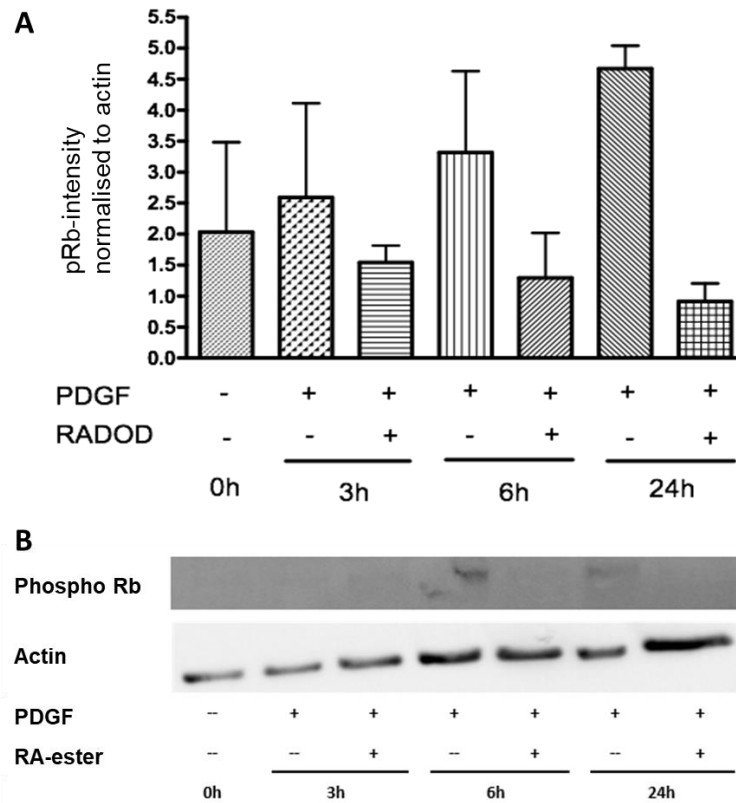


Abbildung 21: A) Expression von pRb in mit RADOD behandelten VSMC: die Zellen wurden nach Behandlung und Stimulation mit PDGF inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die pRb-Expression wurde im Western blot ermittelt, als Ladungskontrolle wurde Aktin bzw. α/β -Tubulin verwendet. Die Messwerte zeigen Mittelwert und Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten; **B) Beispiel für pRb- (oben) und Aktin-Banden (unten) im Western Blot:** die Banden zeigen von links nach rechts: Zellyse nach 0h, nach 3h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RADOOD, nach 6h Stimulation mit PDGF, sowie Behandlung mit RADOD, nach 24h Stimulation mit PDGF sowie Behandlung mit RADOD

Diskussion

RAME hemmt die Proliferation der VSMC und hält sie in der G1 und frühen S-Phase des Zellzyklus fest indem er durch seine direkte Hemmung der CDK2 die Phosphorylierung von Rb verhindert. [41] Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden ob dies auch für andere RA-Ester bzw. die Metaboliten der RA gilt und welchen Einfluss die Kettenlänge der Esterseitenkette auf deren Wirkung hat.

Um die Wirkung von RA, ihrer Ester und Metaboliten auf die Proliferation von VSMC zu testen wurden Resazurin und Kristallviolett Assays durchgeführt. Dabei zeigten die Rosamrinsäureester einen antiproliferativen Effekt auf mit PDGF zum Wachstum stimulierte Zellen während RA selbst und ihre Metabolite die Proliferation nicht hemmten. Der antiproliferative Effekt von RAME, RAET, RABU und RAOCT war dabei konzentrationsabhängig und ähnlich stark (IC₅₀ bei ca. 3 μ M). RADOD zeigte keinen konzentrationsabhängigen Effekt, da die Proliferation in Konzentrationen bis zu 1 μ M nicht signifikant und in Konzentrationen ab 3 μ M sehr stark gehemmt wurde.

In der Zellzyklusanalyse zeigten alle RA-Derivate einen Arrest der VSMC in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Die Anteile der fragmentierten DNA in den Proben bei der Zellzyklusanalyse und die Morphologie der Zellen im Mikroskop gaben jedoch auch erste Hinweise auf eine toxische Wirkung der längerkettigen Ester. Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die untersuchten RA-Derivate genauso wie RAME die Phosphorylierung von Rb an Ser807/811 hemmen.

1. Antiproliferativer Effekt der Rosmarinsäure-Derivate

Rosmarinsäureester hemmen die Proliferation von mit PDGF stimulierten VSMC. Im Gegensatz dazu konnte in mit NBS stimulierten Zellen keine signifikante Wachstumshemmung gezeigt werden. Da NBS verschiedene Wachstumsfaktoren enthält, die über unterschiedliche Signalwege die Proliferation steuern, zeigt dies einen spezifischen Effekt der Rosmarinsäureester auf die Wirkung von PDGF auf die Zellen, der durch die anderen Stimuli in NBS zum Großteil ausgeglichen wird.

Der antiproliferative Effekt aller getesteten RA-Ester mit Ausnahme von RADOD auf die VSMC ist konzentrationsabhängig, jedoch unabhängig von der Kettenlänge der Esterseitenkette. Im Resazurin Assay wurde für RAET eine IC₅₀ von 3,28 µM, für RABU eine IC₅₀ von 3,13 µM und für RAOCT eine IC₅₀ von 3,25 µM gemessen. Aus der vorhergehenden Studie war die IC₅₀ von RAME (3,12 µM) bereits bekannt [41]. Daher wurde in einem ersten Assay mit allen zu untersuchenden Substanzen RAME in einer Konzentration von 3 µM verwendet. Dabei zeigte sich jedoch mit 40 – 50% eine geringere Wachstumshemmung als zu erwarten war. Dies ist jedoch durch mögliche geringfügige Unterschiede in der Durchführung der Experimente und unterschiedliche Charge der verwendeten Substanz erklärbar.

Darüber hinaus zeigten Resazurin und Kristallviolett Assay unterschiedlich starke antiproliferative Effekte für die längerkettigen Rosmarinsäureester. Besonders RABU und RAOCT scheinen im Kristallviolett Assay potenter zu sein als im Resazurin Assay. Diese Unterschiede könnten auf die unterschiedlichen Methoden, die Zellzahl zu bestimmen zurückzuführen sein. Während im Kristallviolett Assay die Menge an DNA und Protein, an die das Kristallviolett bindet, gemessen wird, bestimmt man im Resazurin Assay die metabolische Umwandlung von Resazurin in den Mitochondrien [50, 54]. Studien zur antioxidativen Wirkung von Rosmarinsäure konnten einen aktivierenden Effekt auf Enzyme der Mitochondrien in Nervenzellen feststellen [55, 56]. Möglicherweise könnte der Unterschied in den Ergebnissen der beiden Assays durch einen ähnlichen Effekt der Rosmarinsäureester auf die Mitochondrienaktivität verursacht werden.

2. Hinweise auf eine mögliche Toxizität langkettiger RA-Ester

Nach Behandlung der Zellen mit den untersuchten Substanzen, zeigten sich im Lichtmikroskop morphologische Veränderungen jener VSMC, die mit RADOD oder höheren Konzentrationen der anderen RA-Ester behandelt worden waren. Diese glichen jenen Proben, die mit Digitonin behandelt wurden. In der Zellzyklusanalyse befanden sich in den entsprechenden Proben ein größerer Anteil an fragmentierter DNA (SubG0-Phase). Diese Ergebnisse geben Hinweise auf eine toxische Wirkung der langkettigen RA-Derivate. Dies konnte allerdings mit den verwendeten Testmethoden nicht ausreichend untersucht werden, da weder im Resazurin- noch im Kristallviolett-Assay unterschieden werden kann, ob die geringe Anzahl an Zellen aus einer Proliferationshemmung oder einer Apoptoseinduktion resultiert. Um herauszufinden, ob die langkettigen Ester tatsächlich toxisch auf die VSMC wirken, sind weitere Tests mit geeigneten Methoden wie dem LDH-Assay nötig.

3. Effekt der RA-Derivate auf Rb

RAME hemmt die Phosphorylierung von Rb an Ser807/811 durch Hemmung von CDK 2 [41]. Die Phosphorylierung von Rb steuert den Übergang von der G0/G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus, da die Hyperphosphorylierung des Tumorsuppressors für die Freigabe des Transkriptionsfaktors E2F verantwortlich ist. Die Phosphorylierung von Ser807/811 ist dabei für den Phosphorylierungsgrad von Rb mitverantwortlich. Wird diese Position nicht phosphoryliert, bleibt Rb in einem hypophosphorylierten Zustand, sodass die Zellen im Wachstum gehindert werden. [22, 57–59]

Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die untersuchten RA-Derivate genauso wie RAME die Phosphorylierung von Rb hemmen. Es wurden jedoch zu wenige unabhängige Tests durchgeführt, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Es sind daher weitere Tests nötig, um diese Ergebnisse zu bestätigen und auch um zu testen, ob die Hemmung der Phosphorylierung wie bei RAME durch die direkte Hemmung von CDK2 geschieht.

4. Outlook

RAME hemmt die Proliferation von Endothelzellen nicht. [41] Ob dies auch für andere Ester der RA gilt wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und erfordert weitere Tests.

Alle durchgeführten Tests erfolgten an Zellkulturen, die die Bedingungen im Körper nur bedingt widerspiegeln. Die Ergebnisse dieser in vitro Tests müssen in vivo bestätigt werden. Auch die Pharmakokinetik der Ester muss untersucht werden. Bisher liegen zur Bioverfügbarkeit von RA Daten vor, die zeigen, dass nur ein sehr geringer Anteil, der oral zugeführten RA überhaupt resorbiert wird. [42] Zu den Estern der RA gibt es keine Daten. Allerdings können kurzkettige RA-Ester leichter durch die Zellwand in die Zellen aufgenommen werden. [35] Diese Fähigkeit könnte auch mit einer besseren Bioverfügbarkeit verbunden sein.

Diese Arbeit zeigt, dass kurzkettige Ester der RA interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen sind. Langkettige Ester der RA sind hingegen nur dann lohnende Kandidaten für weitere Untersuchungen, wenn sich die Hinweise auf eine zytotoxische Wirkung nicht bestätigen.

Literaturverzeichnis

- [1] Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of medical research* 2015; 46: 328–338; DOI: 10.1016/j.arcmed.2015.06.006
- [2] Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2012; 1: 60–74; DOI: 10.1177/2048872612441582
- [3] Herrington W, Lacey B, Sherliker P et al. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res* 2016; 118: 535–546; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611
- [4] Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nature medicine* 2002; 8: 1249–1256; DOI: 10.1038/nm1102-1249
- [5] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* 2007; 39: 86–93
- [6] Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 812–819; DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.159327
- [7] Chen X, Fujise K. Restenosis: Emerging molecular targets. *Drug Discovery Today Disease Mechanisms* 2005; 2: 1–9; DOI: 10.1016/j.ddmec.2005.05.025
- [8] Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: C7-12; DOI: 10.1016/j.jacc.2005.09.068
- [9] Steinberg D, Glass CK, Witztum JL. Evidence mandating earlier and more aggressive treatment of hypercholesterolemia. *Circulation* 2008; 118: 672–677; DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753152
- [10] Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381–1478; DOI: 10.1152/physrev.00047.2003

- [11] Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R et al. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 2014; 114: 1852–1866; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721
- [12] Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med* 2014; 276: 618–632; DOI: 10.1111/joim.12296
- [13] Puranik AS, Dawson ER, Peppas NA. Recent advances in drug eluting stents. *Int J Pharm* 2013; 441: 665–679; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.10.029
- [14] Canfield J, Totary-Jain H. 40 Years of Percutaneous Coronary Intervention: History and Future Directions. *J Pers Med* 2018; 8; DOI: 10.3390/jpm8040033
- [15] Buccheri D, Piraino D, Andolina G et al. Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment. *J Thorac Dis* 2016; 8: E1150-E1162; DOI: 10.21037/jtd.2016.10.93
- [16] Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation* 2005; 111: 2257–2273; DOI: 10.1161/01.CIR.0000163587.36485.A7
- [17] Pleva L, Kukla P, Hlinomaz O. Treatment of coronary in-stent restenosis: a systematic review. *J Geriatr Cardiol* 2018; 15: 173–184; DOI: 10.11909/j.issn.1671-5411.2018.02.007
- [18] Nicolais C, Lakhter V, Virk HUH et al. Therapeutic Options for In-Stent Restenosis. *Current cardiology reports* 2018; 20: 7; DOI: 10.1007/s11886-018-0952-4
- [19] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 767–801; DOI: 10.1152/physrev.00041.2003
- [20] Rensen SSM, Doevendans PAFM, van Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007; 15: 100–108; DOI: 10.1007/BF03085963
- [21] Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* 1998; 98: 82–89; DOI: 10.1161/01.cir.98.1.82
- [22] Fuster JJ, Fernández P, González-Navarro H et al. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 254–264; DOI: 10.1093/cvr/cvp363
- [23] Vidal A, Koff A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 2000; 247: 1–15; DOI: 10.1016/s0378-1119(00)00092-5

- [24] Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001; 81: 999–1030; DOI: 10.1152/physrev.2001.81.3.999
- [25] He C, Medley SC, Hu T et al. PDGFR β signalling regulates local inflammation and synergizes with hypercholesterolaemia to promote atherosclerosis. *Nat Commun* 2015; 6: 7770; DOI: 10.1038/ncomms8770
- [26] Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118: 692–702; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
- [27] Cai Q, Lanting L, Natarajan R. Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2263–2270; DOI: 10.1161/01.ATV.0000146552.16943.5e
- [28] Camejo G, Fager G, Rosengren B et al. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 14131–14137
- [29] Clarke MCH, Figg N, Maguire JJ et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nature medicine* 2006; 12: 1075–1080; DOI: 10.1038/nm1459
- [30] Al-Dhabi NA, Arasu MV, Park CH et al. Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities. *EXCLI J* 2014; 13: 1192–1195
- [31] Anusuya C, Manoharan S. Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2011; 30: 199–211; DOI: 10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.v30.i3.30
- [32] Lucarini R, Bernardes WA, Ferreira DS et al. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharm Biol* 2013; 51: 1087–1090; DOI: 10.3109/13880209.2013.776613
- [33] Sotnikova R, Okruhlicova L, Vlkovicova J et al. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65: 713–723; DOI: 10.1111/jphp.12037
- [34] Tai J, Cheung S, Wu M et al. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2012; 19: 436–443; DOI: 10.1016/j.phymed.2011.12.012

- [35] Bayrasy C, Chabi B, Laguerre M et al. Boosting antioxidants by lipophilization: a strategy to increase cell uptake and target mitochondria. *Pharm Res* 2013; 30: 1979–1989; DOI: 10.1007/s11095-013-1041-4
- [36] Adomako-Bonsu AG, Chan SL, Pratten M et al. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2017; 40: 248–255; DOI: 10.1016/j.tiv.2017.01.016
- [37] Baba S, Osakabe N, Natsume M et al. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur J Nutr* 2005; 44: 1–9; DOI: 10.1007/s00394-004-0482-2
- [38] Amoah SKS, Sandjo LP, Kratz JM et al. Rosmarinic Acid--Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Med* 2016; 82: 388–406; DOI: 10.1055/s-0035-1568274
- [39] Nakazawa T, Ohsawa K. Metabolism of rosmarinic acid in rats. *J Nat Prod* 1998; 61: 993–996; DOI: 10.1021/np980072s
- [40] Baba S, Osakabe N, Natsume M et al. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci* 2004; 75: 165–178; DOI: 10.1016/j.lfs.2003.11.028
- [41] Liu R, Heiss EH, Waltenberger B et al. Constituents of Mediterranean Spices Counteracting Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation: Identification and Characterization of Rosmarinic Acid Methyl Ester as a Novel Inhibitor. *Mol Nutr Food Res* 2018; 62: e1700860; DOI: 10.1002/mnfr.201700860
- [42] Wang J, Li G, Rui T et al. Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LC-MS/MS: absolute bioavailability and dose proportionality. *RSC Adv.* 2017; 7: 9057–9063 (RSC Advances, 7(15), 9057-9063); DOI: 10.1039/C6RA28237G
- [43] O'Brien J, Wilson I, Orton T et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5421–5426
- [44] Uzarski JS, DiVito MD, Wertheim JA et al. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 2017; 129: 163–175; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.015

- [45] Fulwyler MJ. Status quo in flow-through cytometry. *J Histochem Cytochem* 1974; 22: 605–606; DOI: 10.1177/22.7.605
- [46] Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of Cell Biology* 1975; 66: 188–193; DOI: 10.1083/jcb.66.1.188
- [47] Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Adv Exp Med Biol* 2010; 676: 137–147
- [48] Kim KH, Sederstrom JM. Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Mol Biol* 2015; 111: 28.6.1-11; DOI: 10.1002/0471142727.mb2806s111
- [49] Vega-Avila E, Pugsley MK. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc West Pharmacol Soc* 2011; 54: 10–14
- [50] Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016: pdb.prot087379; DOI: 10.1101/pdb.prot087379
- [51] Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012; 4: 429–434; DOI: 10.4103/1947-2714.100998
- [52] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248–254 (*Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254); DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [53] Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science (New York, N.Y.)* 1996; 274: 1672–1677; DOI: 10.1126/science.274.5293.1672
- [54] Zhang H-x, Du G-h, Zhang J-t. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 385–389
- [55] Areti A, Komirishetty P, Kalvala AK et al. Rosmarinic Acid Mitigates Mitochondrial Dysfunction and Spinal Glial Activation in Oxaliplatin-induced Peripheral Neuropathy. *Molecular Neurobiology* 2018; 55: 7463–7475; DOI: 10.1007/s12035-018-0920-4
- [56] Luft JG, Steffens L, Morás AM et al. Rosmarinic acid improves oxidative stress parameters and mitochondrial respiratory chain activity following 4-aminopyridine and picrotoxin-induced seizure in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2019; 392: 1347–1358; DOI: 10.1007/s00210-019-01675-6

- [57] Rubin SM. Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends Biochem Sci* 2013; 38: 12–19; DOI: 10.1016/j.tibs.2012.10.007
- [58] Burke JR, Liban TJ, Restrepo T et al. Multiple mechanisms for E2F binding inhibition by phosphorylation of the retinoblastoma protein C-terminal domain. *J Mol Biol* 2014; 426: 245–255; DOI: 10.1016/j.jmb.2013.09.031
- [59] Knudsen ES, Wang JY. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem* 1996; 271: 8313–8320; DOI: 10.1074/jbc.271.14.8313

Abkürzungen

Abkürzung	Englische Bezeichnung	Deutsche Bezeichnung
B		
BMS	Bare metal stent	Unbeschichteter Stent
BSA	Bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
C		
CA	Caffeic acid	Kaffeesäure
CDK	Cyclin-dependent Kinase	Cyclin-abhängige Kinase
CKI	CDK inhibitor	CDK-Inhibitor
D		
DCB	Drug coated balloon	Medikamentenbeschichteter Ballon
ddH ₂ O	Double-distilled water	Doppelt-destilliertes Wasser
DES	Drug eluting stent	Medikamentenfreisetzender Stent
DHPL	3,4-dihydroxyphenyllactic acid	3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
E		
E2F	E2-promotor binding factor	E2-Promotor-bindender Faktor
ECL	Enhanced chemiluminescence	Signalverstärkte Chemilumineszenz
ECM	Extracellular matrix	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure

F

FA	Ferulic acid	Ferulasäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting	Fluoreszenzgesteuerte Zellsortierung
FBS	Fetal Bovine Serum	Fetales Kälberserum
FC	Flow cytometry	Durchflusscytometrie

H

HFS	hypotonic fluorochrome solution	Hypotonische Fluorochrom-Lösung
HRP	Horseradish peroxidase	Meerrettichperoxidase

I

IC50	Half-maximal inhibitory concentration	Halbmaximale Hemmkonzentration
------	---------------------------------------	--------------------------------

L

LDL	Low Density Lipoprotein	Lipoprotein niedriger Dichte
-----	-------------------------	------------------------------

M

m-CoumA	m-Cumaric acid	m-Cumarsäure
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1	Monozytenattraktions-Protein-1

N

NBS	Newborn bovine serum	Serum neugeborener Kälber
-----	----------------------	---------------------------

P

PAA	Polyacrylamide	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet derived growth factor	Thrombozytärer Wachstumsfaktor
PI	Propidium iodide	Propidiumiodid
pRb	phospho Retinoblastoma protein	Phospho-Retinoblastom Protein
PTCA	Percutaneous transluminal coronary angioplasty	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
PVDF	Polyvinylidene fluoride	Polyvenylidenfluorid

R

RA	Rosmarinic acid	Rosmarinsäure
RABU	Rosmarinic acid butyl ester	Rosmarinsäurebutylester
RADOD	Rosmarinic acid dodecyl ester	Rosmarinsäuredodecylester
RAET	Rosmarinic acid ethyl ester	Rosmarinsäureethylester
RAME	Rosmarinic acid methyl ester	Rosmarinsäuremethylester
RAOCT	Rosmarinic acid octyl ester	Rosmarinsäureoctylester
Rb	Retinoblastoma protein	Retinoblastom-Protein

S

SDS	Sodium dodecyl sulfate	Natriumdodecylsulfat
-----	------------------------	----------------------

T

TBST	Tris-buffered saline/Tween 20 buffer	Tris-gepufferte Salzlösung/Tween 20 Puffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

V

VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell	Glatte vaskuläre Muskelzellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Rolle des Retinoblastoma Proteins im Zellzyklus	16
Abbildung 2: Reduktion von Resazurin zu Resorufin in lebenden Zellen	26
Abbildung 3: Hemmung der Proliferation von mit PDGF stimulierten VSMC	43
Abbildung 4: Hemmung der Proliferation von mit NBS stimulierten Zellen.....	44
Abbildung 5: IC50 von RAET	45
Abbildung 6: IC50 von RABU	46
Abbildung 7: IC50 von RAOCT	46
Abbildung 8: IC50 von RADOD	47
Abbildung 9: Zellzyklusanalyse der mit RAME behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF.....	49
Abbildung 10: Zellzyklusanalyse der mit RAET behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF.....	49
Abbildung 11: Zellzyklusanalyse der mit RABU behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF.....	50
Abbildung 12: Zellzyklusanalyse der mit RAOCT behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF.....	50
Abbildung 13: Zellzyklusanalyse der mit RADOD behandelten Zellen nach 16h Stimulation mit PDGF.....	51
Abbildung 14: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RAME auf mit PDGF stimulierte VSMC	53
Abbildung 15: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RAET auf mit PDGF stimulierte VSMC	53
Abbildung 16: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RABU auf mit PDGF stimulierte VSMC	54
Abbildung 17: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RAOCT auf mit PDGF stimulierte VSMC	54

Abbildung 18: Hemmung der Proliferation und zytotoxische Wirkung von RADOD auf mit PDGF stimulierte VSMC	55
Abbildung 19: A & B) Expression von pRb in mit RAME bzw. RAET behandelten VSMC, C) Beispiel für pRb- und Aktin-Banden im Western Blot.....	56
Abbildung 20: A & B) Expression von pRb in mit RABU bzw. RAOCT behandelten VSMC, C) Beispiel für pRb- und Aktin-Banden im Western Blot.....	57
Abbildung 21: A) Expression von pRb in mit RADOD behandelten VSMC, B) Beispiel für pRb- und Aktin-Banden im Western Blot.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften der kontraktilen und proliferativen Phänotypen von VSMC	15
Tabelle 2: Strukturen der untersuchten Verbindungen	22
Tabelle 3: Medien für die Zellkultivierung	25
Tabelle 4: Lösungen für die Passagierung von Zellen	25
Tabelle 5: Geräte für Zellkultivierung und Passagierung von Zellen	26
Tabelle 6: Substanzen für den Resazurin Assay	27
Tabelle 7: Geräte für den Resazurin Assay	28
Tabelle 8: Substanzen für die Zellzyklusanalyse	30
Tabelle 9: Lösungen für die Zellzyklusanalyse	30
Tabelle 10: Geräte für die Zellzyklusanalyse	30
Tabelle 11: Substanzen für den Kristallviolett Assay	32
Tabelle 12: Lösungen für den Kristallviolett Assay	32
Tabelle 13: Geräte für den Kristallviolett Assay	32
Tabelle 14: Substanzen für die Behandlung und Stimulation der Zellen	37
Tabelle 15: Lösungen für Zellyse und Bradford Assay	37
Tabelle 16: Gele für die Gelelektrophorese	38
Tabelle 17: Puffer für Gelelektrophorese, Blotting und Detektion	38
Tabelle 18: primäre Antikörper für die Proteindetektion	39
Tabelle 19: sekundäre Antikörper für die Proteindetektion	39
Tabelle 20: weitere Substanzen für die Proteindetektion	39
Tabelle 21: Detektionslösungen	40
Tabelle 22: Geräte für den Western blot	40
Tabelle 23: Software	41
Tabelle 24: IC50 der Rosmarinsäureester	45

