

Die Auswirkungen von Pinostrobin auf Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Tabea Ricarda Luise Siekmann
aus Fürth
Gießen 2014

Aus dem physiologischen Institut
des Fachbereichs Medizin
der Justus–Liebig–Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Rainer Schulz

Gutachter: Prof. Dr. Nöll

Gutachter: Prof. Dr. Kummer

Tag der Disputation: 10.12.2014

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Pinostrobin	1
1.2 Endothelzellen	2
2. Methoden	8
2.1 Kultivierung von HUVEC	8
2.2 Proliferationsversuche	9
2.3 Patch-Clamp-Technik	9
2.3.1 Durchführung der Versuche mittels Patch-Clamp-Technik in der Whole Cell Konfiguration	12
2.4 Tecan Infinite M 200-Messung der Membranpotentialänderung	14
2.4.1 Tecan Infinite M 200-Messung der Membranpotentialänderung (Vorinkubation der Zellen mit BAPTA-AM)	15
2.5 Tecan Infinite M 200-Messung der Änderung der Calciumkonzentration	17
2.5.1 Tecan Infinite M 200-Messung der Änderung der Calciumkonzentration (Vorinkubation der Zellen mit BAPTA-AM)	18
2.6 Perfusionsstoffe, Lösungen und Materialien	20
2.7 Statistik	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Proliferationsversuche	23
3.2 Patch-Clamp-Messungen (Whole Cell Ableitung): Messungen der Leitfähigkeit der Zellmembran	25
3.2.1 Patch-Clamp-Messungen	25
3.2.2 Patch-Clamp-Messungen (Vorinkubation mit Bariumchlorid oder BAPTA-AM)	26
3.3 Tecan Infinite M 200-Messung der Membranpotentialänderung	30
3.3.1 Tecan Infinite M 200-Messung der Membranpotentialänderung (Vorinkubation mit BAPTA-AM)	32
3.4 Tecan Infinite M 200-Messung der Änderung der Calciumkonzentration	34
3.4.1 Tecan Infinite M 200-Messung der Änderung der Calciumkonzentration (Vorinkubation mit BAPTA-AM)	35
4. Diskussion	38
5. Zusammenfassung	42
6. Summary	44
7. Abbildungsverzeichnis	46
9. Literaturliste	47
10. Veröffentlichungen	53
11. Danksagung	54
12. Erklärung	55

1. Einleitung

Pinostrobin ist ein Polyphenol aus der Reihe der Flavonoide. Im Folgenden soll näher auf die grundlegenden Auswirkungen von Pinostrobin auf Endothelzellen der humanen Umbilicalvene (Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)) eingegangen werden.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung waren der Einfluss von Pinostrobin auf die Proliferation, die intrazelluläre Calciumkonzentration, das Membranpotential und die Leitfähigkeit der Zellmembran von HUVEC.

Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose [6, 43]. Da bereits erforscht wurde, dass Pinostrobin einen antiproliferativen Effekt in unterschiedlichen Zellen [48] besitzt, ist von entscheidender Wichtigkeit, ob dies auch für Endothelzellen gilt. Außerdem sind, im Hinblick auf Forschungen zur Entwicklung eines Präparats zur Behandlung von Arteriosklerose, auch das Membranpotential und die Calciumkonzentration der Zellen von elementarem Interesse.

1.1 Pinostrobin

Das Flavonoid Pinostrobin ist ein (S)-2,3-Dihydro-5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on und wird mit der Summenformel $C_{16}H_{14}O_4$ beschrieben. Die relative molekulare Masse beträgt 270.28 [58]. Die Molekularstruktur wird in der folgenden Abbildung verdeutlicht:

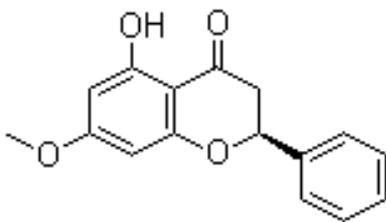


Abb. 1: Strukturformel Pinostrobin

Das Flavonoid Pinostrobin kann aus verschiedenen Pflanzen isoliert werden. Bisher wurde es aus *Artemisia campestris* (Feld-Beifuß) [19], *Boesenbergia pandurata* / *Boesenbergia rotunda* (Chinesischer Ingwer) [54, 1], *Sarcandra glabra* (aus der Familie der Chloranthaceae) [62], trockenen Blättern der *Polygonum ferrugineum* (aus der Familie der Knöterichgewächse) [30], *Cajanus cajan* (Straucherbse) [59] und *Polygonum lapathifolium* (Ampfer-Knöterich) [48] isoliert. Auch aus Honig [10] gelang es, den Stoff zu extrahieren.

Frühere Forschungen haben ergeben, dass Pinostrobin eine zytotoxische Wirkung in verschiedenen Zellreihen hat. Getestet wurde der antiproliferative Effekt an Leukämiezellen. Das Experiment ergab, dass der antiproliferative Effekt von Pinostrobin dosisabhängig ist und mit steigender Dosis zunimmt [48]. Einen zytotoxischen Effekt hat Pinostrobin auch in Zellreihen von Mammakarzinomzellen. Es wurde gezeigt, dass das Flavonoid die DNA Topoisomerase 1 inhibiert [50].

Es konnte auch gezeigt werden, dass Pinostrobin die Replikation von Herpes Simplex Virus 1 hemmt [57]. Außerdem inhibiert das Flavonoid die spannungsgesteuerten Natriumkanäle in Mäusegehirnen [36] und setzt die Überlebensfähigkeit von Leishmanien Amastigoten herab [46]. In der Forschung um Pinostrobin konnte auch herausgestellt werden, dass dieser Stoff in Säugetieren die Enzyme der zweiten Phase der Biotransformation aktiviert [10].

Die bereits durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Pinostrobin sehr vielfältige Auswirkungen hat. Insbesondere die zytotoxische Wirkung auf verschiedene Zelltypen ist interessant.

Aufgrund des aktuellen Forschungsstandes wurden als Gegenstand dieser Untersuchung folgende Fragestellungen gewählt: Wirkt Pinostrobin antiproliferativ auf HUVEC? Verändert sich die intrazelluläre Calciumkonzentration in HUVEC durch Pinostrobin? Verändert Pinostrobin das Membranpotential von HUVEC? Und ändert sich die Leitfähigkeit der Zellmembran von HUVEC durch Pinostrobin?

In der vorliegenden Arbeit wurden die vier genannten Themenkomplexe untersucht und die Ergebnisse dargestellt.

1.2 Endothelzellen

Endothelzellen sind Zellen, die einschichtig die Wände aller Blut- und Lymphgefäße des menschlichen Körpers auskleiden. Diese Zellen sind flach, polygonal und haben kurze Ausläufer. Das Zytoplasma ist von einer Membran umgeben, in der viele verschiedene Kanäle eingebaut sind. Endothelzellen dienen als Grenzbarriere zwischen dem Blut und den unterschiedlichen Gefäßschichten. Sie gehören der Tunica intima an, die aus dem Endothel und der subendothelialen Schicht besteht. Darunter schließt sich die Tunica media an, die aus glatter Muskulatur besteht. Die Tunica adventitia wird durch Bindegewebe gebildet [42].

Die Funktionen der Endothelzellen sind komplex und vielfältig. Sie fungieren unter anderem als Diffusionsbarriere, indem die Tight Junctions den Durchtritt von Makro-

molekülen des Plasmas in die subendotheliale Schicht verhindern. Die Zellmembran der Endothelzellen ist von Gap Junctions, Adhärenskontakten und Tight Junctions durchsetzt, die als Zell-Zell Kontakte bezeichnet werden. Gap Junctions ermöglichen den Transport von kleinen wasserlöslichen Molekülen und Ionen zwischen den Zellen. Tight Junctions verbinden und versiegeln nebeneinanderliegende Zellen, um das Austreten von Molekülen zu verhindern [2, 33, 3]. Außerdem verhindert die lumenwärtige Endothelzellenoberfläche die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten [33]. Durch eine spezifische Stimulation wird die Adhäsion von Leukozyten ermöglicht [27, 39]. Hierfür exprimiert die Endothelzelloberfläche dann Adhäsionsmoleküle und Selektine, die zur Leukozytenemigration führen [8]. Endothelzellen sind an der Homöostase beteiligt [33, 17]. Die Zellen bilden eine selektive Grenzbarriere zwischen dem perivaskulären Gewebe und dem Blut. Sie verhindern den Kontakt zwischen Extrazellulärmatrix und Blutzellen und selektieren die Aufnahme von Plasmainhaltsstoffen. Dies geschieht über die genannten Zell-Zell-Kontakte, die Glykokalyx, die die Oberfläche bedeckt, transzelluläre Kanäle und aktive Transportmechanismen. Der Durchtritt von Makromolekülen geschieht über Caveolae und zytoplasmatische Vesikel. Das Endothel fungiert einerseits als Sensor und andererseits als Signalgeber. Es exprimiert unterschiedliche Rezeptoren, um zelluläre Signale aus dem Blut detektieren zu können. Dazu gehören Rezeptoren für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Insulin, IGF („insulin growth factor“), VEGF („vascular endothelial growth factor“) und FGF („fibroblast growth factor“). Das Endothel arbeitet als Signalgeber, indem es Hormone und vasoaktive Peptide bildet. Dazu gehören unter anderem Vasokonstriktoren und Vasodilatoren. Vasokonstriktorisch wirken produzierte Stoffe wie Prostaglandine, Endothelin-1, Wasserstoffperoxid, Thromboxan A2 und Angiotensin II. Vasodilatatorisch hingegen wirken unter anderem die gebildeten Stoffe Bradykinin, Nitritoxid, CNP (C natriuretisches Peptid), Prostacyclin, Adrenomedullin und EDHF („Endothel-derived hyperpolarisation factor“) [33, 35].

Im Normalfall verhindert das Endothel die Bildung von Blutgerinnseln. Bei einer Gefäßverletzung fördern die vom Endothel induzierten Mechanismen die Blutgerinnung. Dazu gehört die Synthese von pro- und antithrombogenen Stoffen. Thrombin, Prostacycline, Plättchen-aktivierender Faktor, von Willebrand-Faktor, Protein C, Heparinsulfat und Plasminogenaktivatoren gehören zu den synthetisierten Substanzen.

Endothelzellen synthetisieren außerdem Bestandteile der Extrazellulärmatrix für die subendotheliale Schicht [33].

Durch myoendotheliale Kontakte ist die Tunica intima mit der Tunica media verbunden. Diese Kontakte haben den Charakter von Gap Junctions. Durch diese Verbindung wird der vasodilatatorische Einfluss der Endothelzellen auf die Muskelzellen übertragen. Die Gefäße können kontrahieren und dilatieren. Die entsprechenden Botenstoffe wie Stickstoff-Monoxid, Prostaglandine, ATP und Endothelin werden im Endothel synthetisiert [24, 32]. Außerdem sind Endothelzellen an der Angiogenese beteiligt [14, 12, 55].

Diese vielseitigen Aufgaben machen die Endothelzellen zu einem wichtigen Funktionsträger im Organismus. Dysfunktionen in der Endothelschicht können zu Arteriosklerose führen [25, 44]. Die Entwicklung der Arteriosklerose kann grob in sechs Stufen eingeteilt werden: Am Anfang steht die Endothelläsion, woraufhin lokale Wachstumsfaktoren die Proliferation von glatten Muskelzellen in der Tunica media induzieren. Diese beiden Schritte sind von der Einwanderung der glatten Muskelzellen in die Tunica intima gefolgt. Danach kommt es zu einer Ablagerung von Thrombozyten, die zu Mikrothromben führt. Im folgenden Schritt werden Lipide und Schaumzellen (lipidbeladene Makrophagen) eingelagert und akkumuliert. Der letzte Vorgang ist die Ausstülpung der Gefäßwand in das Lumen [29, 56].

Endothelzellen haben ein Membranpotential, an dessen Aufrechterhaltung viele verschiedene Kanäle und Stoffkonzentrationen mitwirken [53]. Das Ruhemembranpotential liegt bei $-27 \pm 1,4$ mV [7]. Außerdem hängt die Steuerung vieler verschiedener Funktionen und Mechanismen in Endothelzellen von der Calciumkonzentration ab. Die intrazelluläre Calciumkonzentration beträgt 40-100 nmol/l. Die extrazelluläre Calciumkonzentration liegt bei 1,8-2,0 mmol/l [47]. Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird durch den Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum und aus intrazellulären Speicherorganellen, z.B. dem endoplasmatischen Retikulum, beeinflusst [60, 61]. Der Calciumeinstrom ist gesteuert durch die treibende Kraft von Calcium, z.B. durch die Differenz von Membranpotential und dem Gleichgewichtspotential von Calcium [37]. Bei einer hyperpolarisierten Zellmembran erhöht sich der elektrochemische Gradient für Calcium, welches somit in die Zelle einströmt [32]. Durch die Membrankanäle wird die Calciumkonzentration gesteuert. Calcium steuert viele verschiedene Signaltransduktionswege [16].

Da die Ionenkanäle der Endothelzellen für die Homöostase von elementarer Bedeutung sind, wird im Folgenden kurz darauf eingegangen: Endothelzellen haben ein Membranpotential, sind aber nicht erregbare Zellen und somit auch nicht in der Lage, Aktionspotentiale zu generieren oder weiterzuleiten. Das Membranpotential der Endothelzellen wird überwiegend durch Kalium- und Chloridkanäle gesteuert. Eine wichtige Rolle der Ionenkanäle für die Calciumsignalwege ist die Feinsteuerung des elektrochemischen Gradienten für Calcium [21]. Durch den elektrochemischen Gradienten für Calcium wird das Membranpotential beeinflusst [31]. Somit kann das Membranpotential die Endothelfunktion beeinflussen. Durch eine elektrochemische Kopplung der Endothelzellen untereinander und mit den Muskelzellen der folgenden Schicht besteht eine wechselseitige Beeinflussung [37, 4, 34, 38, 52]. Natriumkanäle spielen bei dem Membranpotential der Endothelzellen nur eine untergeordnete Rolle [37].

Folgende Kaliumkanäle regulieren das Membranpotential der Endothelzellen:

- a. ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}) [20, 23, 22]
- b. Calciumaktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}) [15, 18, 28, 45]
- c. Kalium-einwärts-gleichrichtende-Kanäle (K_{ir}) [13, 40, 9]

Der ATP-sensitive Kaliumkanal ist geschlossen, solange die intrazelluläre ATP-Konzentration physiologisch ist. Als physiologisch werden ATP-Konzentrationen im Bereich von mmol/l bezeichnet [23]. Sinkt sie ab, öffnen die Kanäle, was zu einer Hyperpolarisation führt. Calciumaktivierte Kaliumkanäle können in Gruppen eingeteilt werden [26]. Die drei Gruppen unterscheiden sich in ihrer Leitfähigkeit. Die Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 10-14 pS werden als „small conductance“, also SK_{Ca} -Kanäle bezeichnet. Ab einer Leitfähigkeit von 30 bis 80 pS werden sie als „intermediate conductance“, also IK_{Ca} -Kanäle bezeichnet. Die Kanäle mit der größten Leitfähigkeit werden als BK_{Ca} -Kanäle bezeichnet. Diese „big conductance“-Kanäle verzeichnen eine Leitfähigkeit von 100-250 pS.

Kalium-einwärts-gleichrichtende-Kanäle sind hauptsächlich für die Stabilisierung des Membranpotentials verantwortlich. Bei einer Aktivierung dieser Kanäle hyperpolarisiert die Zellmembran [32]. Da diese Kanaltypen einen großen Einfluss auf das Membranpotential der Zellen haben, sind sie bei den folgenden Untersuchungen von besonderer Bedeutung. Sie sind die einzigen Kaliumkanäle in Endothelzellen, die ständig geöffnet sind. Neben ihrer Aufgabe zur Stabilisierung des Membranpotentials

haben sie noch eine zweite Funktion. Sie fungieren als Kaliumsensoren. Durch die Öffnung der BK_{Ca} -Kanäle steigt die Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum an. Dies registrieren die Kalium-einwärts-gleichrichtenden-Kanäle. Das führt dazu, dass die Leitfähigkeit dieser Kanäle erhöht wird. Somit führt die Aktivierung der Kalium-einwärts-gleichrichtenden-Kanäle zu einer Hyperpolarisation der Endothelzelle [37]. Neben den Kaliumkanälen bilden die Chloridkanäle die andere große Gruppe der Kanaltypen in Endothelzellen. Auch diese Kanäle können in drei Gruppen eingeteilt werden: Die erste Gruppe wird von den Chloridkanälen mit großer Leitfähigkeit gebildet. Die zweite Gruppe wird durch die volumenabhängigen Chloridkanäle vertreten. In der letzten Gruppe werden die calciumabhängigen Chloridkanäle (CLCA) zusammengefasst. Das Membranpotential wird unter physiologischen Umständen nur von den volumenabhängigen Chloridkanälen beeinflusst. Ihre Leitfähigkeit liegt bei 1-5 pS. Diese Kanaltypen werden bei einer Zellschwellung aktiviert [32].

Die elementaren Mechanismen, die in den Experimenten von Belang sind und zu einer Hyperpolarisation führen, sind in Abbildung 3 dargestellt. Bei einer Hyperpolarisation werden die K_{Ca} , die K_{ir} und die CLCA aktiviert. Die Aktivierung der Kaliumkanäle führt zu einem Kaliumausstrom. Dies führt zu einer Hyperpolarisation. Ebenfalls führt die Öffnung der CLCA zu einer Hyperpolarisation, da das negativ geladene Chlorid in die Zelle einströmt. Diese drei Kanäle sind für die vorliegende Arbeit von Interesse und in der folgenden Abbildung verdeutlicht:

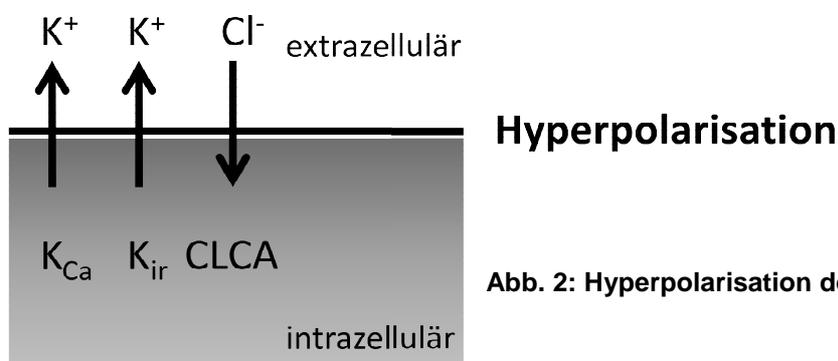


Abb. 2: Hyperpolarisation der Zellmembran in Endothelzellen

Als Folge auf die Hyperpolarisation strömen aus dem Extrazellulärraum und den intrazellulären Speichern Calcium in die Zelle ein. Der Ausstrom von Kationen aus den intrazellulären Speichern bringt einen Efflux von Anionen mit sich. Die Spannung

der Plasmamembran ändert sich dadurch nicht. Der Calciumeinstrom ist in der folgenden Abbildung verdeutlicht:

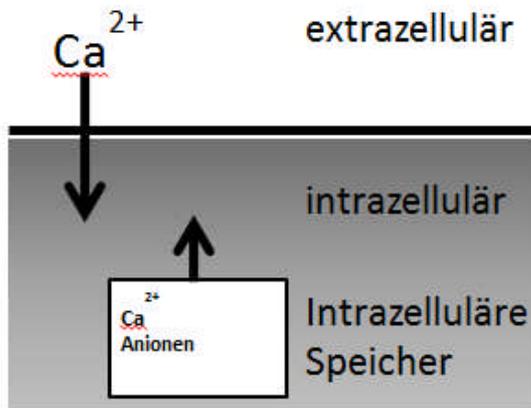


Abb. 3: Calciumeinstrom in Endothelzellen

Bei der Grundlagenforschung mit Endothelzellen und Pinostrobin ist der Aufbau der Zellmembran mit den verschiedenen Kanaltypen von elementarer Wichtigkeit.

2. Methoden

2.1 Kultivierung von HUVEC

In der Angiologie werden die Nabelschnüre nach der Abnabelung in ein steriles Gefäß gegeben und im weiteren Verlauf auf Verletzungen untersucht. Die Vene der Nabelschnur wird zwei Mal mit 50 ml HEPES gespült. Wenn das Gefäß der Nabelschnur lückenlos ist, wird die Nabelschnurvene an einem Ende abgeklemmt und mit 0,025 % Kollagenase-Lösung befüllt. Die Nabelschnurvene wird für 20 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch diesen Vorgang werden die Endothelzellen aus ihrem Zellverband gelöst. Jetzt wird die Vene mit 30 ml HEPES gespült und die Spüllösung mit den nun darin enthaltenen HUVEC in ein 50 ml Röhrchen mit 1 ml fetalen Kälberserum (FCS) gegeben. Für 5 min wird die Zellsuspension bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 5 ml Endothelial Basal Medium gegeben und der Zellüberstand wird verworfen. Zu den Zellen werden folgende Aliquots gegeben: 0,4 % ECGS/H (Supplement für Wachstumsmedien), Epidermal Growth Factor 0,1 ng/ml, Hydrocortison 0,1 µg/ml, Basic Fibroblast Factor 1 ng/ml, Amphotericin 50 ng/ml, Gentamycin 50 µg/ml und 20 % FCS. Die Lösung wird resuspendiert und in ein mit 0,2 % Gelatine beschichtetes 25 cm² großes Plastik Kulturschälchen ausgesät. Dabei wird die Gelatine als Basalmembranersatz genutzt. Die Zellen werden mit den Aliquots versetzt, die ein keimfreies und stabiles Wachstum ermöglichen. Durch die Zugabe der Aliquots wird gewährleistet, dass die Zellen keimfrei in einer ihrer natürlichen Umgebung nachempfundenen Umgebung wachsen.

In dieser Form werden die Zellen aus der Angiologie von uns übernommen. Im weiteren Verarbeitungsverlauf werden die Zellen vom Medium befreit und gewaschen. Durch eine folgende Trypsinierung wird die künstliche Basalmembran, die durch die Verbindung zwischen den Zellen und den mit Gelatine beschichteten Plastikflaschenboden erzeugt wurde, zerstört. Die Zellen lösen sich und können auf die mit Gelatine beschichteten Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm in die Schälchen, die 1 ml fassen, aufgeteilt werden. Angestrebt wird das Wachstum von gut differenzierten und einzeln liegenden HUVEC. Die Zellen werden zur zweitägigen Bebrütung bei einer 100 % igen Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 37 °C und einer Begasung mit 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt. Nach der zweitägigen Bebrütung sind die Zellen reif, um mit Hilfe der Patch-Clamp-Apparatur gemessen zu

werden. Nach zwei Ruhetagen im Inkubator werden ausschließlich Zellen der zweiten und dritten Passage gemessen.

2.2 Proliferationsversuche

In dieser Versuchsreihe wird mittels einer Neubauer Zählkammer überprüft, ob Pinostrobin das Wachstumsverhalten der HUVEC verändert.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der antiproliferatorischen Wirkung zu erforschen werden die Zellen mit Pinostrobinlösung in den Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l versetzt. Als Kontrolle gilt eine Probe ohne Zusatz von Pinostrobin. Um zu prüfen, welchen Effekt das Pinostrobin auf die HUVEC bereits nach kurzer Zeit hat, wird der Versuch mit den Konzentration 100 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ statt nach 48 h bereits nach 1 h Inkubation durchgeführt.

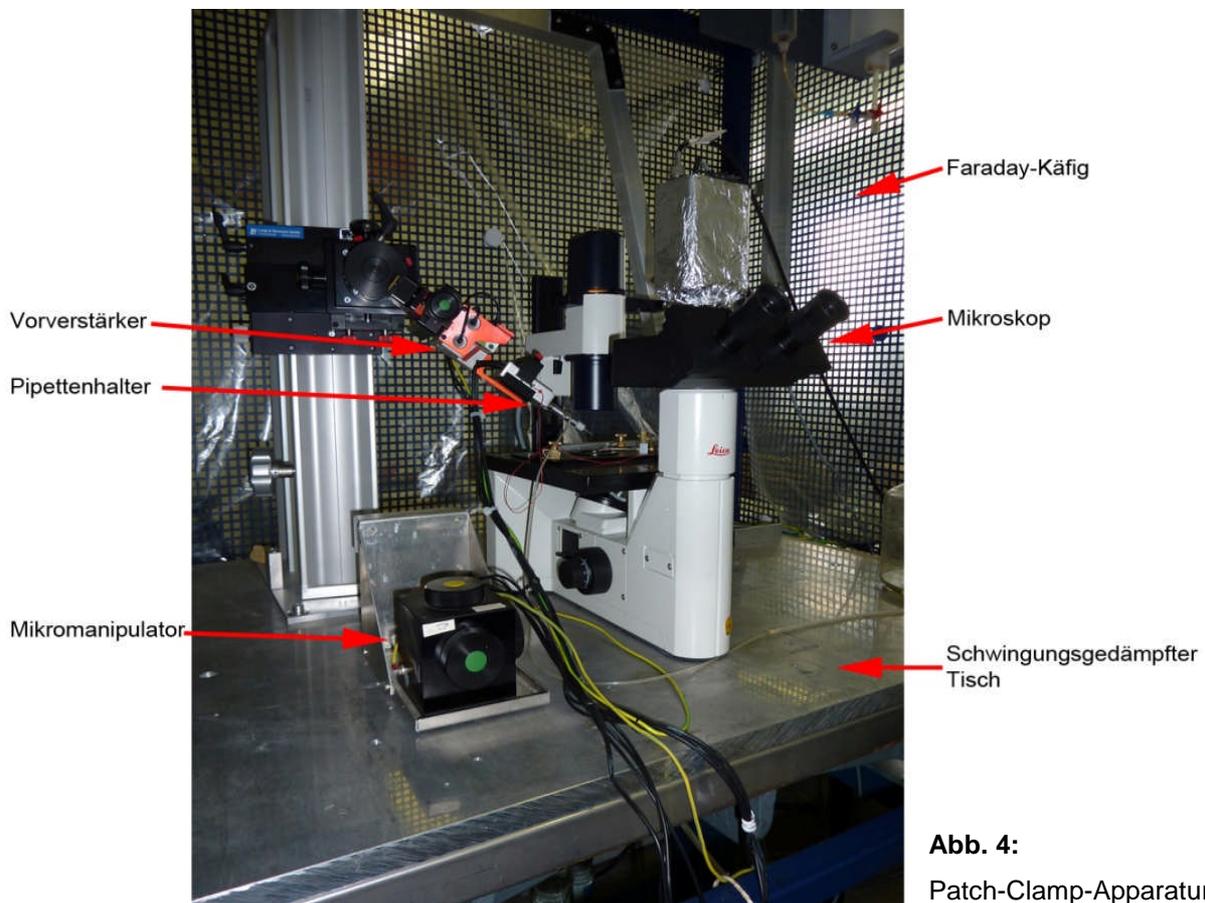
Die HUVEC der zweiten oder dritten Passage werden auf 12-Well Platten ausgesät. Nach 24 h Bebrütung im Inkubator wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden serumfrei gesetzt. Weitere 24 h später werden die Zellen mit Pinostrobin stimuliert. Erneute 48 h später werden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und mit fetalem Kälberserum (FCS) versetzt. Nach der Resuspendierung werden 12 μl der Zelllösung in die Neubauer Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Dieser Versuch wurde an vielen Endothelzellen in unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Die Anzahl der Messungen liegen bei Gesamt-N=123 (Kontrollgruppen n=36, bei 1 $\mu\text{mol/l}$ n=9, bei 10 $\mu\text{mol/l}$ n=9, bei 50 $\mu\text{mol/l}$ n=18, bei 100 $\mu\text{mol/l}$ n=17, bei 500 $\mu\text{mol/l}$ n=7 und bei 1 mmol/l Pinostrobin n=9. Nach 1 h Inkubation bei 100 $\mu\text{mol/l}$ n=9, bei 500 $\mu\text{mol/l}$ n=9). Jede Probe wurde zweifach ausgezählt. Aus diesen Dubletten wurde der Mittelwert gebildet. Aus diesem Mittelwert wurden dann die Mittelwerte für alle Kultivierungen berechnet. Die Kontrollzellen, die nicht mit Pinostrobin stimuliert wurden, werden als Referenzwert für die anderen Zellen genutzt.

2.3 Patch-Clamp-Technik

Mit einer Patch-Clamp-Apparatur können Ionenströme an biologischen Zellmembranen dargestellt werden. Ein Patch-Clamp-Messstand ist darauf ausgelegt,

ein erschütterungsfreies Arbeiten zu ermöglichen. Zu einem Messstand gehören ein Mikromanipulator, ein invertiertes Mikroskop, ein Vorverstärker mit einem Pipettenhalter und der Pipette, ein Patch-Clamp-Verstärker und ein Computer zur Erfassung und Speicherung der Daten. Das Mikroskop ist auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert, um Erschütterungen als Störquelle auszuschalten. Außerdem ist der Versuchsstand mit einem Faraday-Käfig zur elektrischen Abschirmung der Geräte umgeben. Das Programm, mit dem die Versuche aufgezeichnet werden, heißt Pulse von der Firma HEKA und die Auswertungen werden mit dem „Patch“ Programm (Bernd Letz) vorgenommen [41]. Abbildungen 4 und 5 zeigen die verwendeten Apparaturen.



Das obige Bild zeigt die verwendete Apparatur. Zu sehen sind der schwingungsgedämpfte Tisch und der Faraday-Käfig: Rechts im Bild befindet sich das invertierte Mikroskop. Links mittig im Bild ist der Vorverstärker mit dem Pipettenhalter zu erkennen. Links unten befindet sich die Steuerung des Mikromanipulators, normalerweise erschütterungsfrei außen angebracht.

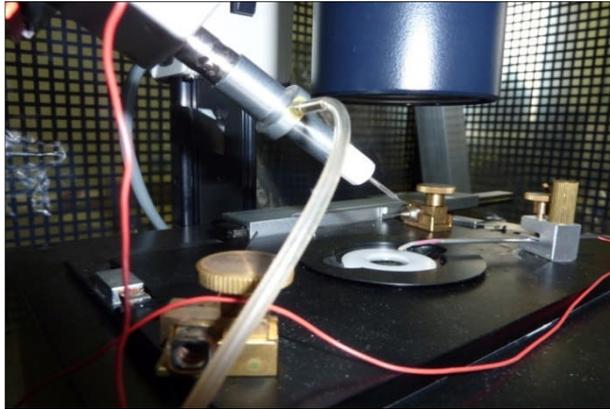


Abb. 5: Patch-Clamp-Stand; Nahaufnahme der Messkammer und des Vorverstärkers mit dem Pipettenhalter.

Abbildung 6 zeigt die verwendeten Geräte. Von oben nach unten handelt es sich um 1. den Bildschirm, auf den die Bilder des Mikroskops übertragen werden, 2. den Bildschirm des Computers mit dem Heka EPC 9 Programm, 3. den Patch-Clamp-Verstärker und 4. ganz unten im Bild den Computer. Links ist 5. ein U-Glasrohr mit Dreiwegehahn zum Einstellen eines geringen Unterdrucks im Pipettenhalter zu erkennen.

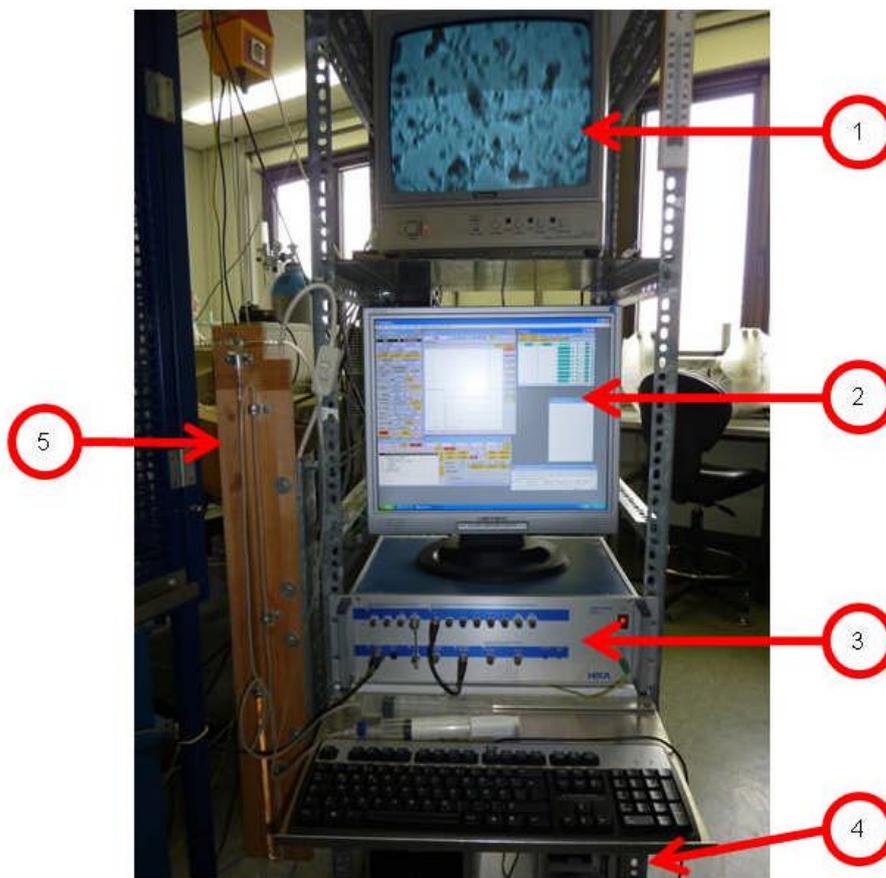


Abb. 6: Patch-Clamp-Rechner und Monitorsystem

2.3.1 Durchführung der Versuche mittels Patch-Clamp-Technik in der Whole Cell Konfiguration

Bevor mit dem eigentlichen Messversuch begonnen werden kann, werden Glaselektroden aus Borosilikatglaskapillaren (Harvard Apparatus, GC 150F-7.5) hergestellt. Die Glasrohlinge müssen fett- und staubfrei sein, damit sie im Elektrodenziehgerät (DMZ – Universal Puller, Zeitz- Instrumente, Germany) eingespannt und unter mehrmaligem Erhitzen und leichtem Zug geteilt werden können, so dass eine Glaskapillare mit einer feinen Öffnung im Mikrometerbereich (1-2 μm) entsteht. Die Spitze der entstandenen Glaskapillare wird hitzepoliert.

Die Zellen auf den Glascovers werden aus dem Inkubator entnommen und drei Mal mit 37 °C warmer Badlösung gespült. Sie werden in eine Messkammer gegeben, die mit 400 μL 37 °C warmer Badlösung gefüllt ist, und in die Mikroskoptischhalterung eingespannt.

Die Messpipette wird mit 21 °C warmer Pipettenlösung gefüllt und über den chlorierten Silberdraht die Elektrode am Mikromanipulator eingespannt. Mittels der Wassersäule im U-Rohr und einer Schlauchverbindung wird ein leichter Druck über die Schläuche auf die Messelektrode gegeben, um die Elektrodenspitze vor Verunreinigungen zu schützen. Eine Referenzelektrode ist seitlich in der Badlösung, die die HUVEC umgibt, angebracht. Dann wird die Messpipette in die Badlösung getaucht. Mit Hilfe des Mikromanipulators und der Messpipette wird eine Zelle, die keinen Kontakt zu den restlichen Zellen besitzt, anvisiert. Der Bildschirm, der an das Mikroskop angeschlossen ist, hilft dabei, die Patchpipette so nah an die Zelle anzunähern, bis sie diese berührt. Durch den Aufbau eines leichten Unterdrucks kann der Rand der Patchpipettenspitze nahtlos auf der Zelloberfläche aufgesetzt werden. In diesem Arbeitsschritt springt das low resistance Seal in ein Gigaohm Seal um. Durch die Erhöhung des Unterdrucks wird ein Einbrechen der Pipette in die Zelle herbeigeführt. In der Whole Cell Ableitung verbleibt die Pipette mit dem Zellinneren verbunden. In dieser Situation können Ströme über den Voltage Clamp an der kompletten Zelle gemessen werden. Diese Methode wurde in den vorliegenden Experimenten angewandt.

Sobald die Pipettenspitze Kontakt zum Zellinneren hat, kann mit der Messung begonnen werden. Dafür wurde das Programm „Pulse“ (HEKA) verwendet. In jedem Messzyklus werden im Programm eingestellte elf Spannungssprünge von -100 mV bis 100 mV gemessen. Dies geschieht in Schritten von 20 mV. Es werden drei

Messungen durchgeführt, die zur Darstellung der Zelle im Ausgangszustand dienen. Wenn sich zeigt, dass das Potential der Zelle stabil ist, wird das weitere Experiment gestartet. Unterschiedliche Pinostrobinkonzentrationen werden mit einer Eppendorf-Mikroliterpipette erschütterungsfrei hinzugegeben. In den verschiedenen Experimenten wird die Konzentration des Pinostrobin verändert, um neben der erzielten Zeitabhängigkeit auch eine Konzentrationsabhängigkeit zu untersuchen. Nach der Zugabe des Stoffes wird 10 s gewartet, damit sich das Pinostrobins gleichmäßig verteilen kann. Nach diesen 10 s wird eine erste Messung in der Messkammer durchgeführt, und dann im Abstand von 60 s weitere. Die Messungen wurden in zwei minütigen Schritten bei den Klemmspannungen -20, 0, +20, ausgewertet. Die letzte Messung wurde nach der 14. Minute durchgeführt. Es wurden die Effekte von drei verschiedenen Pinostrobinkonzentrationen auf HUVEC untersucht: 100 $\mu\text{mol/l}$ ($n=7$), 300 $\mu\text{mol/l}$ ($n=6$) und 500 $\mu\text{mol/l}$ ($n=7$).

Des Weiteren wird die Sensibilität der einzelnen Kanäle auf Pinostrobins getestet, indem man vor der Zugabe von Pinostrobins a) BAPTA-AM oder b) BaCl_2 hinzufügt: a) BAPTA-AM wirkt als Calciumchelator [51, 49], so dass durch die weitere Zugabe von Pinostrobins experimentell herausgestellt werden kann, ob es sich bei der Wirkung der zu untersuchenden Lösung um eine calciumabhängige Reaktion handelt. b) BaCl_2 ist ein Inhibitor der Kaliumkanäle (u.a. der Kalium-einwärts-gleichrichtenden-Kanäle), so dass erforscht werden kann, ob die Pinostrobinswirkung von diesen Kanälen abhängt. Die Messungen wurden begonnen, nachdem die Zelle mittels der Patch-Clamp-Technik in die Whole-Cell-Konfiguration versetzt wurde. Die Zelle wurde im Ruhezustand gemessen, danach wurde entweder 4 μl BAPTA-AM oder 16 μl 100 μmol Bariumchlorid hinzugegeben. Daraus resultieren Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ BAPTA-AM und 3,85 $\mu\text{mol/l}$ Bariumchlorid. Es wurde erneut gemessen und nach einer Minute Pinostrobins in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ hinzugegeben. Da man den Unterschied vor und nach Zugabe von Pinostrobins untersuchen möchte, wurden als Kontrollwert die Ströme der mit Bariumchlorid oder BAPTA-AM inkubierten Zellen vor Pinostrobinszugabe ausgewertet.

Untersucht wurde der Effekt von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobins auf HUVEC ($n=7$) im Vergleich zu mit Bariumchlorid vorinkubierten Zellen unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobins ($n=4$) und zu mit BAPTA-AM vorinkubierten Zellen unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobins ($n=6$). Die Patch-Clamp-Messungen wurden an insgesamt dreißig ($n=30$) Zellen durchgeführt.

2.4 Tecan Infinite M 200-Messung der Membranpotentialänderung

Um die Membranpotentialänderungen an HUVEC unter dem Einfluss von Pinostrobin zu erforschen, werden in dieser Versuchsreihe die Zellen mit DiBAC inkubiert. DiBAC ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der umso besser in die Zelle aufgenommen wird, je niedriger das Membranpotential wird, wenn die Zellmembran also depolarisiert. Dies führt zu einem Anstieg der Leuchtkraft, der Fluoreszenz. Zu einer weiteren Verstärkung der Fluoreszenz kommt es, sobald DiBAC in der Zelle an intrazelluläre Proteine gebunden wird. Allerdings ist dies kein fester Zustand, da der Farbstoff nach einiger Zeit wieder in den die Zellen umgebenden Puffer abgegeben wird. Dadurch kommt es zu einem Fließgleichgewicht aus Aufnahme und Abgabe. Durch die Inkubation mit DiBAC besteht zu Messbeginn dieses Fließgleichgewicht.

Wird das Membranpotential durch die Zugabe von Pinostrobin kleiner, steigt die Fluoreszenz an. Die Fluoreszenzsteigerung zeigt die Depolarisation. Eine Abnahme der Fluoreszenz ist durch die Hyperpolarisation der Zelle begründet. In diesem Fall wird das Membranpotential größer. Die Leuchtkraft zeigt somit an, ob die Zellen, die durch Pinostrobin stimuliert wurden, hyper- oder depolarisiert werden. Ändert sich die Fluoreszenzaktivität in den Zellen um 1 %, so handelt es sich um eine Membranpotentialänderung um 1 mV [5]. Dieser Wert zeigt die Summe der Änderung aller Zellen in der Messkammer. Mit dieser Methode wird eine gesamte Zellpopulation unterschiedlich geladener Zellen in einem Well gemessen. Die Berechnung der Höhe des Membranpotentials einer einzigen Zelle ist mit dieser Methode nicht möglich. Es wurde eine Messzeit von 30 min gewählt.

HUVEC werden für diese Versuchsreihe in 24-Well Platten für 2 Tage gezüchtet. Es handelt sich hierbei um Zellen der zweiten oder dritten Passage. Nachdem das Medium abgekippt wurde, werden in jedes Well 400 µl Badlösung (BL) oder Badlösung mit DiBAC (aus Erfahrungswerten wird zu einem ml BL 1 µl DiBAC gegeben) pipettiert. Das Beladungsmuster der 24-Well Platten ist im Folgenden dargestellt:

BL	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC
BL	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC
BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC
BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC

Tab. 1: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Die Zellen werden nun für 30 min inkubiert, um dem Fluoreszenzfarbstoff die Zeit zu geben, sich zu verteilen und das Fließgleichgewicht aufzubauen.

Nun wird die Lösung abgekippt und die Platte wird nach folgendem Schema beladen:

BL	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC
BL	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC
BL+DiBAC	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC
BL+DiBAC	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC +Pinostrobin	BL+DiBAC

Tab. 2: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Die Menge der Lösung, die sich nun in jedem Well befindet, beträgt 500 μl . Die Konzentration des Pinostrobin von der zweiten bis zur fünften Spalte variiert je nach Experiment. Es wurden Konzentrationen von ($\mu\text{mol/l}$) 1, 10, 25, 50, 100, 300, 500, 700, 900 und 1000 gemessen. Sofort nachdem die Zellen mit den Lösungen stimuliert wurden, wird die Platte in den Tecan Infinite M 200 (Tecan, Österreich) eingelegt. Dabei handelt es sich um einen Multimode Reader, der die Messung von Absorption, Fluoreszenz und Lumineszenz der zu untersuchenden Zellen erlaubt. In diesen Versuchen wurde die Fluoreszenz bestimmt. Alle Arbeitsschritte erfolgen im Dunkeln, da DiBAC lichtempfindlich ist. Das Messprogramm Magellan 6 (Tecan, Österreich) misst nun in 30 Minuten und 61 Messzyklen die Änderung der Membranpotentiale der Zellen. Mit dieser Methode werden pro Messkammer die Fluoreszenzänderungen vieler Zellen gleichzeitig gemessen. Die Messung beginnt zum Zeitpunkt Null. In diesem Versuch liegt die Anzahl der Messungen bei $n=64$ (Messungen von 10 $\mu\text{mol/l}$, 25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 300 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$, 700 $\mu\text{mol/l}$ und 900 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin je $n=7$ und Messungen von 1 $\mu\text{mol/l}$ und 1000 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin je $n=4$).

2.4.1 Tecan Infinite M 200-Messung der Membranpotentialänderung (Vorinkubation der Zellen mit BAPTA-AM)

Durch diese Versuche kann untersucht werden, ob es eine Verbindung zwischen der Membranpotentialänderung der Zellen und dem Calciumanstieg gibt. BAPTA-AM ist ein Calciumchelator. Er ist membrangängig und wird in der Zelle von zytosolischen Esterasen gespalten. Somit kann der aktive Chelator die Zelle nicht mehr verlassen.

BAPTA-AM bindet das freie, intrazelluläre Calcium. Da das Calcium durch BAPTA-AM gebunden ist, kann es nach Zugabe von Pinostrobin nicht reagieren. Kommt es trotzdem zu einem Membranpotentialanstieg, so ist dieser unabhängig von der Calciumkonzentration. Da BAPTA-AM als Calciumchelator fungiert und somit das Calcium nicht mit der Zelle interagieren kann, bleibt das Membranpotential gleich oder sinkt, wenn es abhängig von der Calciumkonzentration ist.

HUVEC werden für diese Versuchsreihe in 24-Well Platten für 2 Tage gezüchtet. Es handelt sich hierbei um Zellen der zweiten oder dritten Passage. Nun wird die 24-Well Platte mit Badlösung, DiBAC und BAPTA-AM beladen. In jedem Well befinden sich danach 400 µl. Auf ein ml Badlösung wird ein µl BAPTA-AM und ein µl DiBAC gegeben. Dies entspricht einer BAPTA-AM-Konzentration von 10 µmol/l.

Das Beladungsschema sieht wie folgt aus:

BL	BL+DiBAC	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC
BL	BL+DiBAC	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC
BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC
BL+DiBAC	BL+DiBAC	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC +BAPTA-AM	BL+DiBAC

Tab. 3: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Nachdem die Zellen für 30 min im Inkubator bebrütet wurden, wird die Lösung entfernt und die Platte erneut beladen und mit Pinostrobin stimuliert.

BL	BL+DiBAC + 500 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +100 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +500 µmol/l Pinostrobin	BL +BAPTA-AM +DiBAC	BL+DiBAC
BL	BL+DiBAC +500 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +100 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +500 µmol/l Pinostrobin	BL +BAPTA-AM +DiBAC	BL+DiBAC
BL+DiBAC +100 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +500 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +100 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +500 µmol/l Pinostrobin	BL +BAPTA-AM +DiBAC	BL+DiBAC
BL+DiBAC +100 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +100 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +100 µmol/l Pinostrobin	BL+DiBAC +BAPTA-AM +500 µmol/l Pinostrobin	BL +BAPTA-AM +DiBAC	BL+DiBAC

Tab. 4: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Die Platte mit den stimulierten HUVEC wird nach Abschluss der Beladung zur Messung in den Tecan Infinite gestellt und die Messung begann zum Zeitpunkt Null. Die Anzahl der Messungen liegt bei n=12 (Messungen von 100 $\mu\text{mol/l}$ mit und ohne BAPTA-AM je n=6) und n=12 (bei 500 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin mit und ohne BAPTA-AM, je n=6).

2.5 Tecan Infinite M 200-Messung der Änderung der Calciumkonzentration

Fluo3-AM ist ein Pentaacetoxymethylester und Calciumindikator, der durch seine fluoreszierende Gruppe als Farbstoff verwendet wird. Wenn Fluo 3-AM an Calcium bindet, steigt die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs an. Durch die fünf Acetomethylgruppen ist Fluo 3-AM leicht membrangängig und wird in die Zelle aufgenommen. Da intrazellulär die Calciumkonzentration sehr gering ist, ist auch die Fluoreszenz entsprechend gering. In der Zelle werden die Estergruppen des Fluo 3-AM hydrolysiert, weshalb der Farbstoff die Zelle nicht wieder verlassen kann. Die Estergruppen des Fluo3-AM unterdrücken die Fluoreszenz. Die Hydrolyse findet intrazellulär statt, weshalb extrazelluläres Calcium nicht detektiert wird. Steigt die Calciumkonzentration in der Zelle durch die Stimulation mit Pinostrobin an, kann dies an einem Anstieg der Fluoreszenz erkannt werden. Da Fluo 3-AM lichtempfindlich ist, werden alle Arbeitsschritte im Dunkeln durchgeführt.

HUVEC werden für diese Versuchsreihe in 24-Well Platten für 2 Tage gezüchtet. Es handelt sich hierbei um Zellen der zweiten oder dritten Passage. Zu den bereits vorhandenen 500 μl Medium werden in jedes Well entweder 5 μl Badlösung oder 5 μl Badlösung mit Fluo 3-AM pipettiert. Das Fluo 3-AM wurde zuvor im Verhältnis von 1:1 mit Badlösung verdünnt, so dass es nun eine Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ hat.

Das Beladungsmuster der 24-Well Platten ist im Folgenden dargestellt:

BL	BL +Fluo 3-AM				
BL	BL +Fluo 3-AM				
BL +Fluo 3-AM					
BL +Fluo 3-AM					

Tab. 5: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Die 24-Well Platte wird nun für 1 h verdunkelt inkubiert. In dieser Zeit wird Fluo 3-AM durch Diffusion in die Zelle aufgenommen. Nachdem die Lösung abgekippt und die Wells mit Badlösung gespült wurden, werden in jedes Well 500 µl Badlösung gegeben. Für weitere 20 min wird die Platte erneut inkubiert. Diese Zeit ist notwendig, um der Zelle die Möglichkeit zu geben, jede Estergruppe des intrazellulären Fluo 3-AM zu hydrolisieren. Die HUVEC werden nun aus dem Inkubator entnommen und die Lösung wird abgekippt. In jedes Well wird nun Badlösung oder ein Gemisch aus Badlösung und Pinostrobin gegeben. Das Beladungsmuster der 24-Well Platten ist im Folgenden dargestellt:

BL	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL
BL	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL
BL	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL
BL	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL +Pinostrobin	BL

Tab. 6: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Die Menge der Lösung, die sich nun in jedem Well befindet, beträgt 500 µl. Die Konzentration des Pinostrobin von der zweiten bis zur fünften Spalte variiert je nach Experiment. Es wurden Konzentrationen von 100 µmol/l und 500 µmol/l gemessen. Die erste und die sechste Spalte werden als Kontrollproben gewertet. Nach Beladung wird die Platte im Dunkeln in den Tecan Infinite eingesetzt und das Messprogramm Magellan 6 wird gestartet. Die Messung beginnt zum Zeitpunkt Null. Die Messdauer beträgt 1 h und beinhaltet 61 Messzyklen. Die Messungen wurden mit n=6 vorgenommen (Messungen von 100 µmol/l und 500 µmol/l Pinostrobin je n=3).

2.5.1 Tecan Infinite M 200-Messung der Änderung der Calciumkonzentration (Vorinkubation der Zellen mit BAPTA-AM)

BAPTA-AM ist ein lipophiler und somit membranpermeabler Calciumchelator. Der Stoff wird in die Zelle aufgenommen und durch Esterasen hydrolysiert, womit er seine Membranpermeabilität verliert und die Zelle nicht mehr verlassen kann. In diesen Experimenten wird erforscht, ob die Wirkung des Pinostrobins calcium-

abhängig ist. Bei dem Einsatz des Chelators BAPTA-AM gemeinsam mit Fluo 3-AM bindet BAPTA-AM das Calcium. Durch diesen Vorgang ist BAPTA-AM komplett gebunden und mit Calcium gesättigt. Wenn es nach der Stimulation mit Pinostrobin zur Leuchtkrafterhöhung kommt, dann zeigt es, dass erneut Calcium entweder aus intrazellulären Speichern freigesetzt wurde, oder aus dem Extrazellulärraum eingeströmt ist. Das bereits vor der Zugabe von Pinostrobin existente Calcium ist an BAPTA-AM gebunden. Somit ist die Calciumreaktion abhängig vom Pinostrobin und man kann davon ausgehen, dass die Calciumänderung intrazellulär ist.

Bei diesem Experiment werden die 24-Well Platten wie im vorangegangenen Experiment mit Fluo 3-AM und Badlösung beladen und für eine Stunde in den Inkubator gestellt. Nun wird auf die 24-Well Platte Badlösung und BAPTA-AM gegeben. Die Endkonzentration entspricht $10 \mu\text{mol/l}$, da die Stocklösung 10 mmol/l beträgt, wird $1 \mu\text{l}$ BAPTA-AM zu 1 ml BL gegeben. Das Beladungsmuster der 24-Well Platten ist im Folgenden dargestellt:

BL	BL	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL
BL	BL	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL
BL	BL	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL
BL	BL	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL

Tab. 7: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Nach einer halben Stunde wird die Platte von den Lösungen befreit und erneut mit Badlösung, BAPTA-AM oder BAPTA-AM und Pinostrobin beladen. In den Experimenten werden Pinostrobinkonzentrationen von $100 \mu\text{mol/l}$ und $500 \mu\text{mol/l}$ gemessen. Das Beladungsmuster der 24-Well Platten ist im Folgenden dargestellt:

BL	BL +500 µmol/l Pinostrobin	BL +100 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +500 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL
BL	BL +500 µmol/l Pinostrobin	BL +100 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +500 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL
BL +100 µmol/l Pinostrobin	BL +500 µmol/l Pinostrobin	BL +100 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +500 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL
BL +100 µmol/l Pinostrobin	BL +500 µmol/l Pinostrobin	BL +100 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +500 µmol/l Pinostrobin +BAPTA-AM	BL +BAPTA-AM	BL

Tab. 8: Beladungsmuster der 24-Well Platte

Die 24-Well Platte mit den stimulierten HUVEC wird nach Abschluss der Beladung zur Messung in den Tecan Infinite gestellt. Die Messung beginnt zum Zeitpunkt Null. Die folgende Messung dauert eine Stunde und umfasst 61 Messzyklen. Die Anzahl der Messungen liegt bei n=10 (Messungen von 100 µmol/l mit und ohne BAPTA-AM je n=5) und n=10 (bei 500 µmol/l Pinostrobin mit und ohne BAPTA-AM je n=5).

2.6 Perfusionsstoffe, Lösungen und Materialien

Für die Experimente wurden folgende Materialien verwendet:

BaCl₂: BaCl₂ (B-0750, Sigma) wird in H₂O gelöst, so dass eine 10 mmol/l Stammlösung entsteht. Die Lösung ist toxisch und wird bei -20 °C gelagert.

Badlösung: Es handelt sich um eine physiologische Badlösung mit dem pH von 7,3. In Aqua dest. werden 140,0 mmol/l NaCl, 5,5 mmol/l d-Glukose, 10,0 mmol/l HEPES, 5,0 mmol/l KCl, 0,5 mmol/l MgCl₂ und 1,5 mmol/l CaCl₂ gelöst.

BAPTA-AM: BAPTA-AM (196419, Calbiochem) wird in DMSO gelöst, so dass eine Stammlösung von 10 mmol/l entsteht. Die Probe soll vor Licht geschützt und bei -20 °C gelagert werden.

Borosilikatkapillaren: GC 150 F -7.5, Harvard Apparatus

DiBAC: DiBAC (B-24570 Molecular Probes) wird in DMSO gelöst, so dass eine 1 mmol/l Stammlösung entsteht. Die Lösung ist lichtempfindlich und wird in braunen Eppendorfgefäßen (1 ml) bei -20 °C gelagert.

DMSO: Dimethylsulfoxid, Sigma, D 8418

Endothelial Cell Basal Medium: Promocell, C-22210, 500 ml

Endothelial Cell Growth Medium: Promocell, C-39210

FCS: Biowest, S1810, 500 ml

Fluo-3 AM: Fluo-3 AM (F 14218 Invitrogen) ist ein Pentaacetoxymethylester. 1 mmol/l Fluo-3 AM wird in DMSO gelöst. Die Lösung ist toxisch und wird bei -20 °C gelagert. Da es sich um eine lichtempfindliche Lösung handelt, wird Fluo-3 AM in braunen Eppendorfgefäßen (1 ml) aufbewahrt.

Gelatine: Serva, Gelatin 22151, 500 g

Gentamycin: Gentamycin, Promocell, C-42060

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Hydrocortison: HC 500 Promocell C-31061

Neubauer Zählkammer: Die Proliferationsversuche von HUVEC unter dem Einfluss von Pinostrobin wurden in Neubauer Zählkammern unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

PBS: phosphate buffered saline, PBS Tablets, Gibco, 18912-014

Pinostrobin: Bei Pinostrobin handelt es sich um (S)-2,3-Dihydro-5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on

Pinostrobin (80614, Fluka) wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, so dass eine Stammlösung von 25 mmol/l entsteht, man gibt 3700 µl DMSO auf 25 mg Pinostrobin. Gelagert wird es lichtgeschützt bei -20 °C.

Pipettenlösung: Die Pipettenlösung ist auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt. 110 mmol/l K-Aspartat werden mit 5 mmol/l HEPES, 30 mmol/l KCl und 1 mmol/l MgCl₂ in Aqua bidest. gelöst.

Trypsin: Trypsin-EDTA Solution for endothelial cell cultures, SIGMA, T4299

Waschlösung: Hank's BSS (1X), PAA, H15-009

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Proliferationsversuche wurde mit dem Post-hoc Tukey's Test durchgeführt. Die Patch-Clamp-Ergebnisse wurden mit einer Messwiederholungs-Varianzanalyse (ANOVA; unabhängige Variable: Zeit, Klemmspannung; abhängige Variable: Ionenströme) und einer Multivariaten Varianzanalyse (MANOVA; unabhängige Variable: Blocker / Chelator; abhängige Variable: Klemmspannung, Konzentration) ausgewertet. Die Calciumkonzentrationsmessungen und Membranpotentialmessungen wurden mit der zwei- bzw. dreifachen Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. Zur Durchführung der statistischen Auswertungen wurde das Programm SPSS (Version 20) verwendet. Als signifikant wurden P-Werte $< 0,05$ erachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationsversuche

Nach 48 Stunden Inkubation mit Pinostrobin zeigen die Proben eine signifikant geringere Zellzahl als die Kontrollgruppe. Die Zellen, die mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin stimuliert wurden, zeigen nach 48 Stunden einen Abfall der Zellzahl von ca. 11 %. Die Reduktion der Zellzahl beträgt bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ 37 % und bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ 50 %. Bei einer Pinostrobinkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ beträgt der Zellabfall 65 %, bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ lässt sich eine Zellreduktion von 87% erkennen. Die signifikanteste Reduktion der Zellzahl lässt sich bei einer Pinostrobinkonzentration von 1000 $\mu\text{mol/l}$ erkennen. Hier beträgt sie 99 %.

Die Ergebnisse werden in Abbildung 7 verdeutlicht:

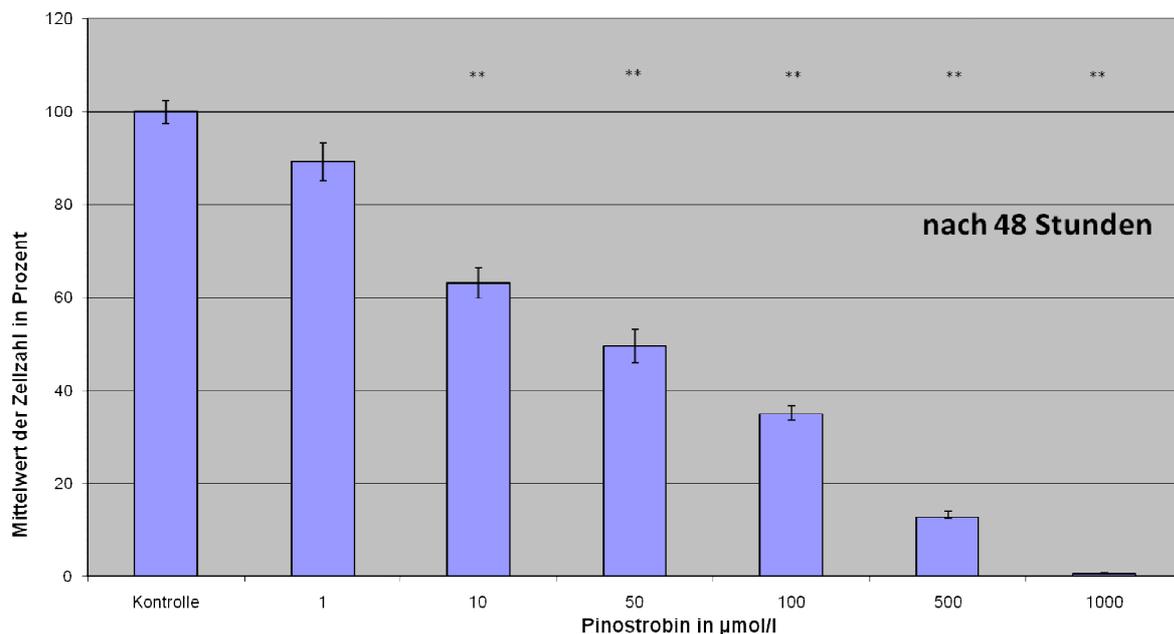


Abb. 7: Abhängigkeit der Pinostrobinkonzentration auf die Proliferation von HUVEC über einen Zeitraum von 48 h, Mittelwert der Zellzahl in [%] nach Zugabe unterschiedlicher Pinostrobinkonzentrationen nach 48 h; n=105 (Kontrollgruppen n= 36, bei 1 $\mu\text{mol/l}$ n=9, bei 10 $\mu\text{mol/l}$ n=9, bei 50 $\mu\text{mol/l}$ n=18, bei 100 $\mu\text{mol/l}$ n=17, bei 500 $\mu\text{mol/l}$ n=7 und bei 1 mmol/l Pinostrobin n=9); Dosis Pinostrobin 1 $\mu\text{mol/l}$ vs Kontrolle $p>0,05$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$ und 1000 $\mu\text{mol/l}$ $**p<0,01$ vs Kontrolle; MW in [%] \pm SEM in [%] Kontrollgruppe $100\pm 2,53$, Dosis 1 $\mu\text{mol/l}$ $89,25\pm 4,05$, Dosis 10 $\mu\text{mol/l}$ $63,09\pm 3,34$, Dosis 50 $\mu\text{mol/l}$ $49,64\pm 3,55$, Dosis 100 $\mu\text{mol/l}$ $34,96\pm 1,81$, Dosis 500 $\mu\text{mol/l}$ $12,7\pm 1,32$, Dosis 1000 $\mu\text{mol/l}$ $0,6\pm 0,22$

In der folgenden Experimentreihe soll herausgefunden werden, welche antiproliferative Wirkung das zu untersuchende Flavonoid bereits nach einer Stunde auf HUVEC besitzt.

Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin wurden für die weiteren Versuche gewählt. Diese Werte wurden auf Basis der vorangegangenen Experimente herausgegriffen. Die Zellen, die mit Pinostrobin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert wurden, zeigen nach einer Stunde eine Reduktion von 4%. Bei der zweiten untersuchten Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ beträgt der Zellabfall 8%. Die Ergebnisse der Untersuchung nach einer Stunde Inkubation im Vergleich zu den entsprechenden Werten nach 48 Stunden Inkubation sind in Abbildung 8 dargestellt.

Die Unterschiede der Auswirkungen von Pinostrobin nach 1 h und 48 h sind signifikant:

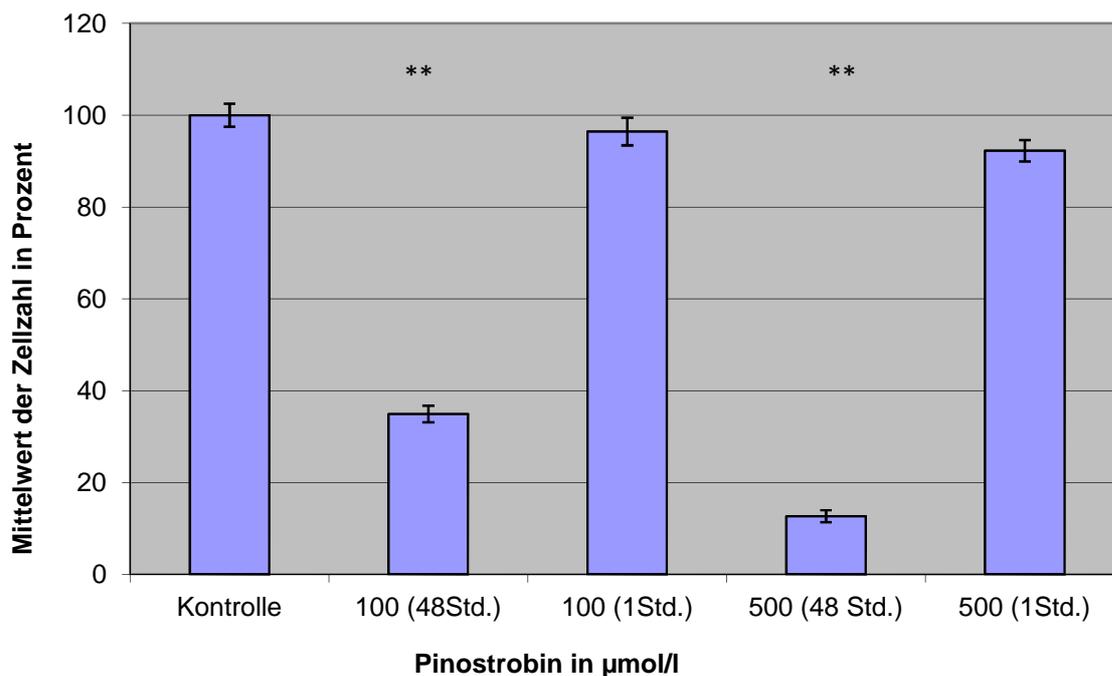


Abb. 8: Abhängigkeit der Pinostrobinkonzentration auf die Proliferation von HUVEC; Vergleich der Ergebnisse nach 1 h und 48 h; Mittelwert der Zellzahl in [%] nach Zugabe unterschiedlicher Pinostrobinkonzentrationen, Auswertung nach 1 h und 48 h; $n=78$ (Kontrollgruppen $n=36$, nach 48 h Inkubation bei 100 $\mu\text{mol/l}$, $n=17$, bei 500 $\mu\text{mol/l}$, $n=7$, nach 1 h Inkubation bei 100 $\mu\text{mol/l}$, $n=9$, bei 500 $\mu\text{mol/l}$, $n=9$); Dosis Pinostrobin nach 48 h Inkubation 100 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$ vs Kontrolle $**p<0,01$, Dosis Pinostrobin nach 1 h, Inkubation 100 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$ vs Kontrolle, $p>0,05$; MW in [%] $\pm\text{SEM}$ in [%] Kontrollgruppe $100\pm 2,53$, nach 48 h Inkubation: Dosis 100 $\mu\text{mol/l}$, $34,96\pm 1,81$, Dosis 500 $\mu\text{mol/l}$, $12,7\pm 1,32$, nach 1 h Inkubation: Dosis 100 $\mu\text{mol/l}$, $96,45\pm 3$, Dosis 500 $\mu\text{mol/l}$, $92,29\pm 2,33$

In dieser Abbildung wurde deutlich, dass Pinostrobin signifikante Unterschiede in der Wirkung nach 1 h und nach 48 h zeigt. Die Wirkung des Pinostrobins zeigt schon

nach 1 h eine geringe Änderung der Werte (nicht signifikant). Allerdings ist sie wesentlich geringer als die Reaktion nach 48 h.

3.2 Patch-Clamp-Messungen (Whole Cell Ableitung):

Messungen der Leitfähigkeit der Zellmembran

3.2.1 Patch-Clamp-Messungen

Untersucht wurde der Effekt von Pinostrobin auf HUVEC in drei verschiedenen Konzentrationen: 100 $\mu\text{mol/l}$, 300 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$.

Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ wurden in einer zweiten Untersuchung der Kaliumkanalblocker Bariumchlorid oder der Calciumchelator BAPTA-AM hinzugegeben. Barium verschließt die Poren der Kaliumkanäle und verhindert so den Kaliumstrom [10]. Bariumchlorid inhibiert unter anderem auch die Kalium-einwärts-gleich-richtenden-Kanäle (K_{ir}) [37]. BAPTA-AM fungiert (als durch Esterasen entstandenes BAPTA) als Calciumchelator, da es intrazellulär das freie Calcium bindet. Somit gibt es kaum ungebundenes Calcium, das durch die Calciumkanäle strömen kann.

Durch diese verschiedenen Experimente wurde untersucht, ob die Wirkung des Pinostrobins dosisabhängig ist und ob Calcium und Kalium bei den Effekten eine Rolle spielen.

Der Vergleich der Dosen von 100 $\mu\text{mol/l}$, 300 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ liefert signifikante Ergebnisse bei der Auswertung der Klemmspannungen von -100 mV bis 100 mV (11 Spannungssprünge). In der 2. Minute, 10. Minute, 12. Minute und 14. Minute ist keine signifikante Änderung der Leitfähigkeit zu detektieren. Dem hingegen verändern sich die Mittelwerte der gemessenen Ströme in der 4. Minute ($F(11/6)=7,069$; $P=0,13$), 6. Minute ($F(11/6)=19,549$; $p=0,01$), und 8. Minute ($F(11/5)=18,257$; $p=0,02$) signifikant. Die Pinostrobinkonzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$, 300 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ wurden gegeneinander getestet. Bei der Auswertung der Ergebnisse der Klemmspannungen von -20 mV bis 20 mV (3 Spannungssprünge) waren keine signifikanten Ergebnisse zu detektieren.

3.2.2 Patch-Clamp-Messungen

(Vorinkubation mit Bariumchlorid oder BAPTA-AM)

Die folgende Messung untersuchte den Effekt von Pinostrobin auf Zellen, die vor Zugabe des Flavonoids mit Bariumchlorid oder BAPTA-AM inkubiert wurden.

Nach vier Minuten, sechs Minuten, acht Minuten, zehn Minuten und zwölf Minuten ist kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Bariumchlorid oder BAPTA-AM vorinkubierten und mit Pinostrobin stimulierten Zellen und den Zellen, die ausschließlich mit Pinostrobin behandelt, aber vorher nicht inkubiert wurden, zu erkennen. Die Daten der Messung nach 2 Minuten ($F(6/24)=2,596$; $p=0,044$) und nach 14 Minuten ($F(6/16)=3,635$; $p=0,018$) zeigen einen signifikanten Unterschied.

Die folgende Grafik verdeutlicht die Ergebnisse nach zwei Minuten:

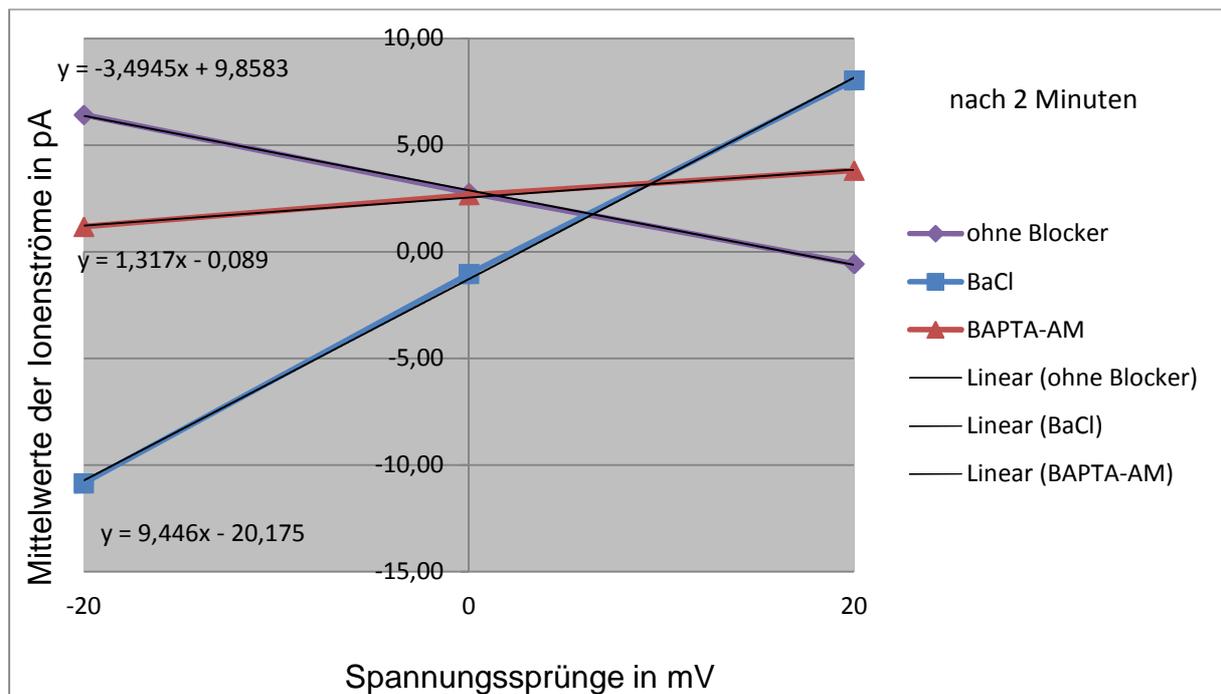


Abb. 9: Mittelwerte der Ionenströme (pA) der Zellen unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin. Ohne Vorinkubation, nach Vorinkubation mit Bariumchlorid oder nach Vorinkubation mit BAPTA-AM nach zwei Minuten. Klemmspannung: 3 Spannungssprünge von -20 mV bis 20 mV; $n=17$ (ohne Blocker $n=7$, mit Bariumchlorid $n=4$, mit BAPTA -AM $n=6$); Lineare Trendlinie und Steigungsformel; $p<0,05$

Die Reaktion der Zellen auf Pinostrobin nach Vorinkubation mit Bariumchlorid oder BAPTA-AM ist signifikant anders, als ohne Vorinkubation. Die Steigungen der Graphen und somit die Leitfähigkeiten der Zellmembranen unterscheiden sich signifi-

kant. Die Steigung der Trendlinie des Mittelwerts der Ionenströme unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin ohne Vorinkubation beträgt -3,5, nach Vorinkubation mit Bariumchlorid 9,4 und nach Vorinkubation mit BAPTA-AM 1,3. Im Gesamtvergleich unterscheiden sich die drei Gruppen signifikant. Im paarweisen Vergleich der einzelnen Werte unter unterschiedlichen Klemmspannungen zeigten sich keine Unterschiede.

Die Mittelwerte der Ströme sind in folgender Tabelle dargestellt:

Klemmspannung [mV]	Vorinkubation	Mittelwert [pA]	Standardfehler [pA]
-20	1	6,42	7,41
	2	-10,85	9,81
	3	1,17	8,01
± 0	1	2,76	2,19
	2	-1,04	2,90
	3	2,66	2,37
20	1	-0,57	11,65
	2	8,04	15,42
	3	3,81	12,59

Tab. 9: Mittelwerte der Ionenströme (pA) der Zellen in der zweiten Minute. 3 Spannungssprünge von -20 mV bis 20 mV. Vergleich der Ionenströme unter Pinostrobinkonzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$, mit und ohne Vorinkubation. Vorinkubation: 1=Ohne Vorinkubation, 2=Vorinkubation mit Bariumchlorid, 3=Vorinkubation mit BAPTA-AM; n=17 (ohne Blocker n=7, mit Bariumchlorid n=4, mit BAPTA-AM n=6), p<0,05

In der vierzehnten Minute der Messung zeigt sich erneut eine signifikante Differenz. Die Differenz zeigt sich zwischen den Daten ohne Vorinkubation unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin und nach Vorinkubation mit BAPTA-AM oder Bariumchlorid unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin.

Abbildung 10 stellt die Ergebnisse grafisch dar:

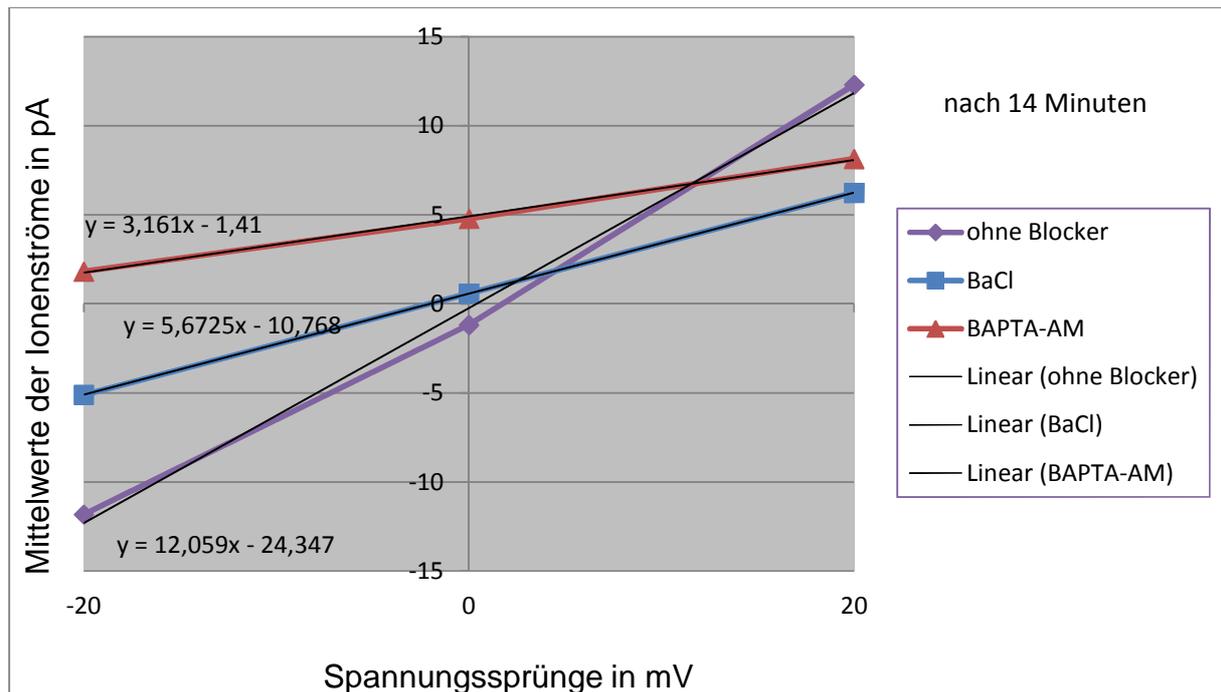


Abb. 10: Mittelwerte der Ionenströme (pA) der Zellen unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin. Ohne Vorinkubation, nach Vorinkubation mit Bariumchlorid oder nach Vorinkubation mit BAPTA-AM nach vierzehn Minuten. Klemmspannung: 3 Spannungssprünge von -20 mV bis 20 mV; n=13 (ohne Blocker n=4, mit Bariumchlorid n=4, mit BAPTA-AM n=5); Lineare Trendlinie und Steigungsformel; $p < 0,05$

Im Gesamtvergleich unterscheiden sich die drei Gruppen signifikant. Im paarweisen Vergleich der einzelnen Werte unter unterschiedlichen Klemmspannungen zeigten sich keine Unterschiede. Die Steigung der Trendlinie des Mittelwerts der Ionenströme unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin ohne Vorinkubation beträgt 12,1, nach Vorinkubation mit Bariumchlorid 5,7 und nach Vorinkubation mit BAPTA-AM 3,2.

Die Mittelwerte der Ionenströme sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Klemmspannung [mV]	Vorinkubation	Mittelwert [pA]	Standardfehler [pA]
-20	1	-11,815	2,922
	2	-5,105	2,922
	3	1,818	2,613
± 0	1	-1,175	1,573
	2	0,595	1,573
	3	4,778	1,407
20	1	12,303	5,069
	2	6,24	5,069
	3	8,14	4,534

Tab. 10: Mittelwerte der Ionenströme (pA) der Zellen in der vierzehnten Minute. 3 Spannungssprünge von -20 mV bis 20 mV. Vergleich der Ionenströme unter Pinostrobinkonzentrationen von 100 µmol/l, mit und ohne Vorinkubation. Vorinkubation: 1=Ohne Vorinkubation, 2=Vorinkubation mit Bariumchlorid, 3=Vorinkubation mit BAPTA-AM; n=13 (ohne Blocker n=4, mit Bariumchlorid n=4, mit BAPTA-AM n=5); p<0,05

Die Daten zeigen, dass Bariumchlorid und BAPTA-AM in der zweiten und in der vierzehnten Minute die Wirkung von Pinostrobin auf HUVEC signifikant verändern. Kaliumkanäle können mit Bariumchlorid blockiert werden. Die signifikante Differenz zwischen den Zellen ohne Vorinkubation und mit Vorinkubation mit Bariumchlorid zeigt, dass Kaliumkanäle einen gravierenden Einfluss auf die Reaktion von HUVEC auf Pinostrobin haben. Die signifikante Differenz zwischen den Zellen ohne Vorinkubation und mit Vorinkubation mit BAPTA-AM zeigt, dass die Reaktion der Zellen auf Pinostrobin calciumabhängig ist.

Die Ergebnisse der Experimente streuen weit, weshalb eine wesentlich höhere Anzahl von Zellen nötig gewesen wäre, um höhere Signifikanzen zeigen zu können. Dies kann allerdings unter den gegebenen Bedingungen mit der Patch-Clamp-Technik nicht geleistet werden. Die weiterführenden Messungen wurden mit dem Tecan Infinite durchgeführt. Bei diesen Experimenten ist es möglich, eine größere Anzahl von Zellen zu messen.

3.3 Tecan Infinite M 200-Messung der Membranpotentialänderung

Die Messungen des Membranpotentials werden mit dem Tecan Infinite durchgeführt. Die Zellen, die nicht mit Pinostrobin stimuliert wurden, werden als Kontrollgruppe verwendet. Die Kontrollgruppe wurde stets auf 100 % festgelegt.

Abb. 11 verdeutlicht die folgenden Beschreibungen:

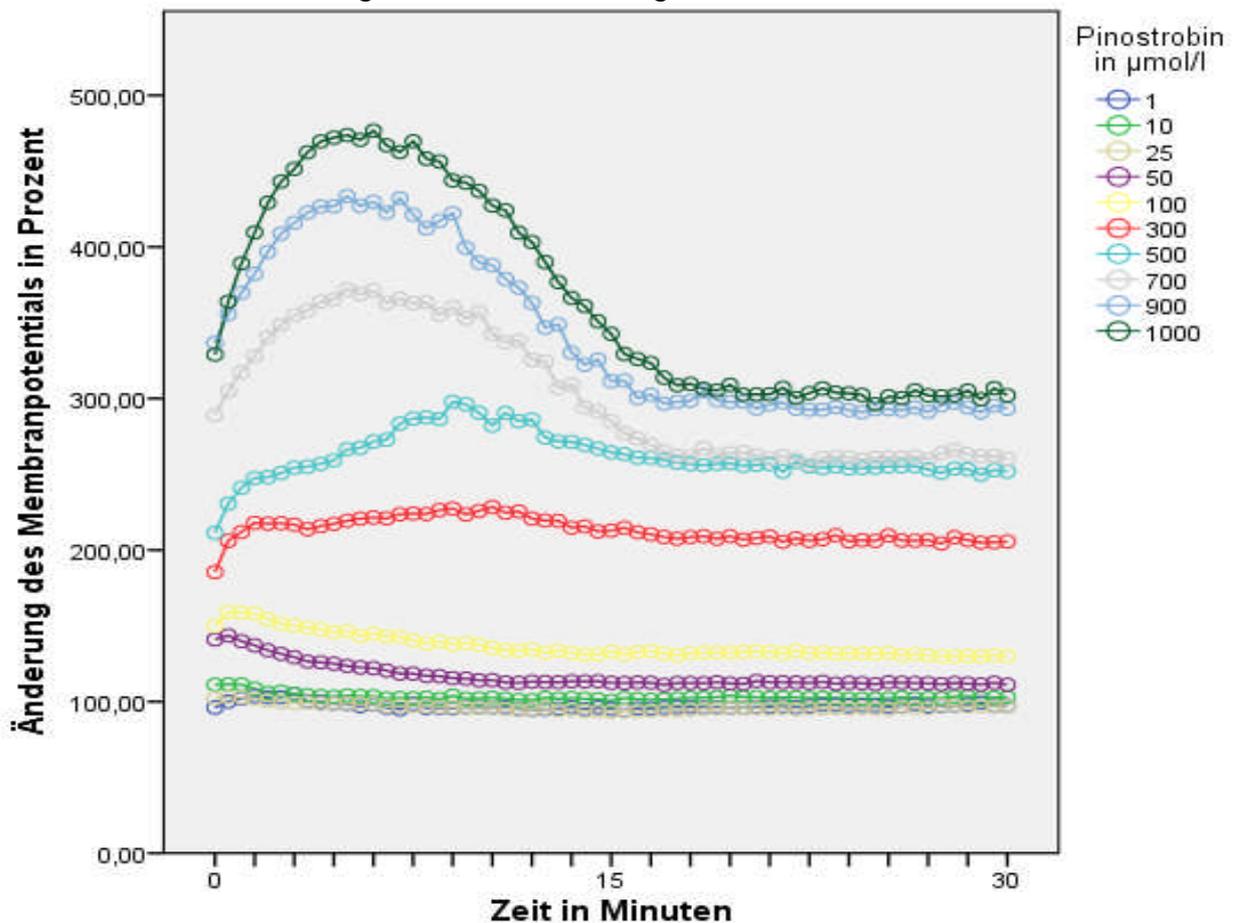


Abb. 11: Membranpotential, Y-Achse: Änderung des Membranpotentials in Prozent, X-Achse: Zeit in min (Zeitpunkt Null auf der Abszisse: Unmittelbar nach dem letzten Pipettierschritt auf der 24-Well-Platte wurde diese in den Tecan Infinite M 200 gegeben und die Messung gestartet); n=64 (Dosis 1 µmol/l n=4, 10 µmol/l n=7, 25 µmol/l n=7, 50 µmol/l n=7, 100 µmol/l n=7, 300 µmol/l n=7, 500 µmol/l n=7, 700 µmol/l n=7, 900 µmol/l n=7, 1000 µmol/l n=4); Mittelwerte der Membranpotentiale der Dosen über komplette Zeit: Dosis 1 µmol/l, 10 µmol/l, 25 µmol/l, 50 µmol/l p>0,05, Dosis 100 µmol/l p<0,01, Dosis 300 µmol/l, 500 µmol/l, 700 µmol/l, 900 µmol/l, 1000 µmol/l p<0,001 vs Dosis 1 µmol/l MW in [%]±SEM in [%] Dosis 1 µmol/l 96,77±11,83, Dosis 10 µmol/l 102,63±8,94, Dosis 25 µmol/l 96,01±8,94, Dosis 50 µmol/l 116,57±8,94, Dosis 100 µmol/l 136,46±8,94, Dosis 300 µmol/l 212,6±8,94, Dosis 500 µmol/l 261,59±8,94, Dosis 700 µmol/l 301,33±8,94, Dosis 900 µmol/l 342,39±8,94, Dosis 1000 µmol/l 365,35±1,83

Unter den Konzentrationen 1 µmol/l, 10 µmol/l und 25 µmol/l Pinostrobin ist keine nennenswerte Reaktion zu beschreiben. Die Kurven entsprechen annähernd der

Kontrolle. Die Kurven der Konzentrationen von 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin beginnen beide auf einem höheren Niveau, um kurz anzusteigen und nach ca. 2 min wieder abzufallen. Bei einem Anstieg der Kurve handelt es sich um einen Anstieg des Membranpotentials. Man spricht somit von einer Depolarisation. Im weiteren Messverlauf ändert sich das Membranpotential kaum noch. Ähnlich verhält sich die Messkurve bei einer Pinostrobinkonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$. Der Verlauf des Graphen entspricht dem der Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$, allerdings beginnt er auf einem höheren Niveau. Die Graphen der Konzentrationen von 300 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ verzeichnen eine große Ähnlichkeit. Sie beginnen auf einem höheren Niveau als der Kontrollwert. Die Graphen steigen langsam an, um ihre Maxima in der 9. und 10,5. min zu erreichen. In der folgenden Messung fällt das Membranpotential wieder ab, um parallel zur Kontrollgruppe zu verlaufen. Der Graph der Messung mit der Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ verläuft ähnlich.

Der Verlauf der Graphen der drei höchsten Konzentrationen ähnelt sich erneut sehr. Alle drei beginnen auf einem höheren Niveau als die Kontrollgruppe, steigern sich in eine noch höhere Depolarisation, um danach langsam wieder abzufallen und unter den Ausgangswert zu sinken. Das Maximum der Graphen zeigt sich nach 5 min. Die Depolarisation fällt steil ab, um sich nach ca. 15 min zu stabilisieren. Die Graphen verlaufen in der weiteren Messung parallel zum Kontrollgruppe. Somit ist das Membranpotential ab der zweiten Hälfte des Messversuches niedriger als der Ausgangswert. Dies kann als Hyperpolarisation interpretiert werden.

Die gezeigte Fluoreszenzerhöhung repräsentiert eine Membranpotentialerhöhung. Allerdings kann in der vorliegenden Messung nicht davon ausgegangen werden, dass eine Erhöhung der Fluoreszenzkapazität um 500 % einer Membranpotentialerhöhung von 500 mV entspricht. Eine Depolarisation von 500 mV ist biologisch unmöglich. Werte bis 500 mV wurden in der vorliegenden Messung erreicht, da in dieser Messung eine gesamte Zellpopulation gemessen wurde, und nicht nur eine einzelne Zelle.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es mit den Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ und 25 $\mu\text{mol/l}$ keine nennenswerten Veränderungen in dem Membranpotential mit der Messung durch den Tecan Infinite zu verzeichnen gibt. Je höher die Konzentration ab der Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ ist, desto höher sind der Ausgangswert und das Niveau des Graphen, folglich das Membranpotential, die Depolarisation und die folgende Hyperpolarisation.

3.3.1 Tecan Infinite M 200–Messung der Membranpotentialänderung (Vorinkubation mit BAPTA-AM)

Abb. 12 zeigt die Membranpotentialmessungen an den Zellen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiBAC behandelt, mit dem Calciumchelator BAPTA-AM vorinkubiert und durch Pinostrobin stimuliert wurden:

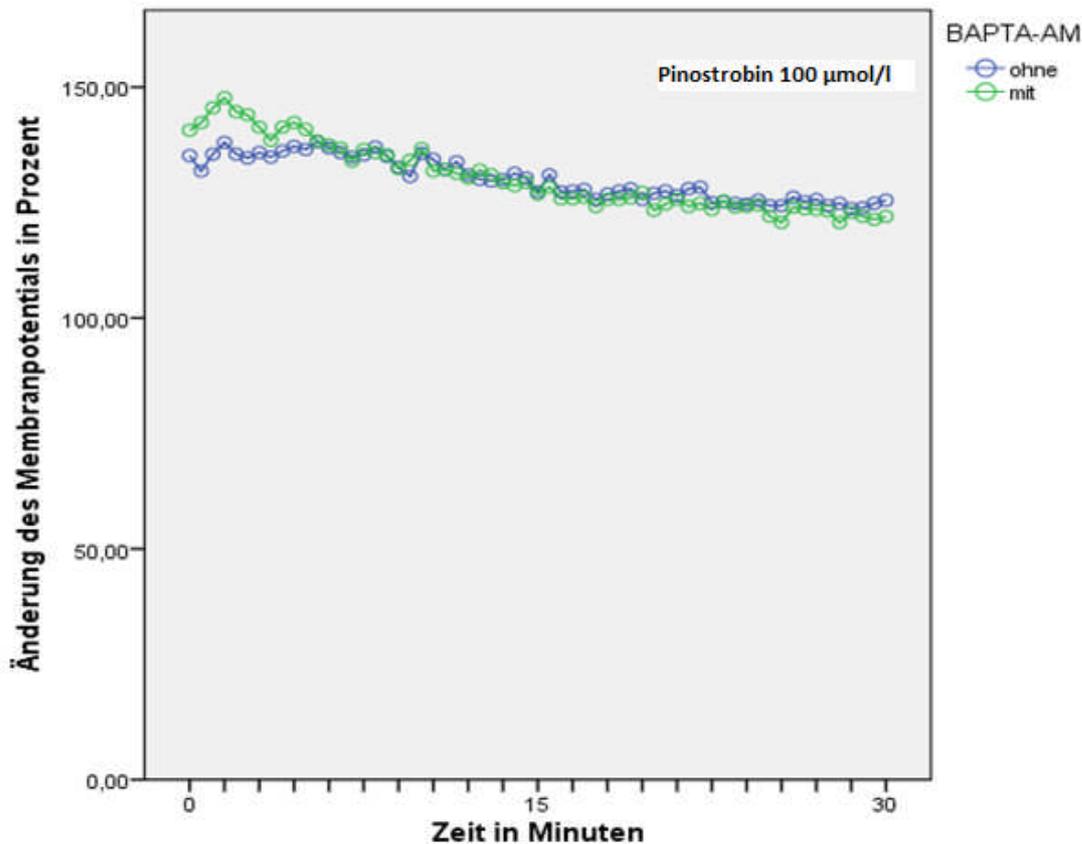


Abb. 12: Membranpotential, Y-Achse: Änderung in Prozent, X-Achse: Zeit in min; Mittelwerte über komplette Zeit $p < 0,01$ in Zeit vs. Kontrolle, $p < 0,01$ in BAPTA-AM vs. Kontrolle, $p > 0,05$ in BAPTA-AM vs. Pinostrobin; Legende: BAPTA-AM 0: ohne BAPTA-AM, BAPTA-AM 1: mit BAPTA-AM; (Zeitpunkt Null auf der Abszisse: Unmittelbar nach dem letzten Pipettierschritt auf der 24-Well Platte wurde diese in den Tecan Infinite M 200 gegeben und die Messung gestartet); $n=12$ (mit BAPTA-AM $n=6$, ohne BAPTA-AM $n=6$); MW in [%] \pm SEM in [%] ohne BAPTA-AM $130,09 \pm 6,34$, mit BAPTA-AM $130,4 \pm 6,34$

Als Kontrollgruppe wurden Zellen verwendet, die nicht mit BAPTA-AM vorinkubiert wurden. In der ersten Auswertung werden die Messergebnisse von Pinostrobin in einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ und Pinostrobin in derselben Konzentration, zusätzlich mit BAPTA-AM vorinkubiert, beschrieben. Die beiden Kurven verlaufen ähnlich. In ihrem Verlauf sind beide Graphen dadurch gekennzeichnet, dass die

Messwerte um einen leicht hyperbolischen Abfall pendeln. Außerdem beginnen beide Kurven mit einer hohen Depolarisation, um im Verlauf langsam abzufallen. Allerdings beginnen die beiden Graphen auf unterschiedlichen Niveaus. Die Kurve ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM beginnt auf einem niedrigeren Niveau als die Kurve nach Vorinkubation mit BAPTA-AM. Die Kurve der Zellen nach Vorinkubation mit BAPTA-AM fällt steil ab, um nach ca. 6 min auf annähernd demselben Niveau wie die Kurve des Messversuches ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM zu verlaufen.

Abb. 13 gibt denselben Versuch mit einer Pinostrobinkonzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ wieder:

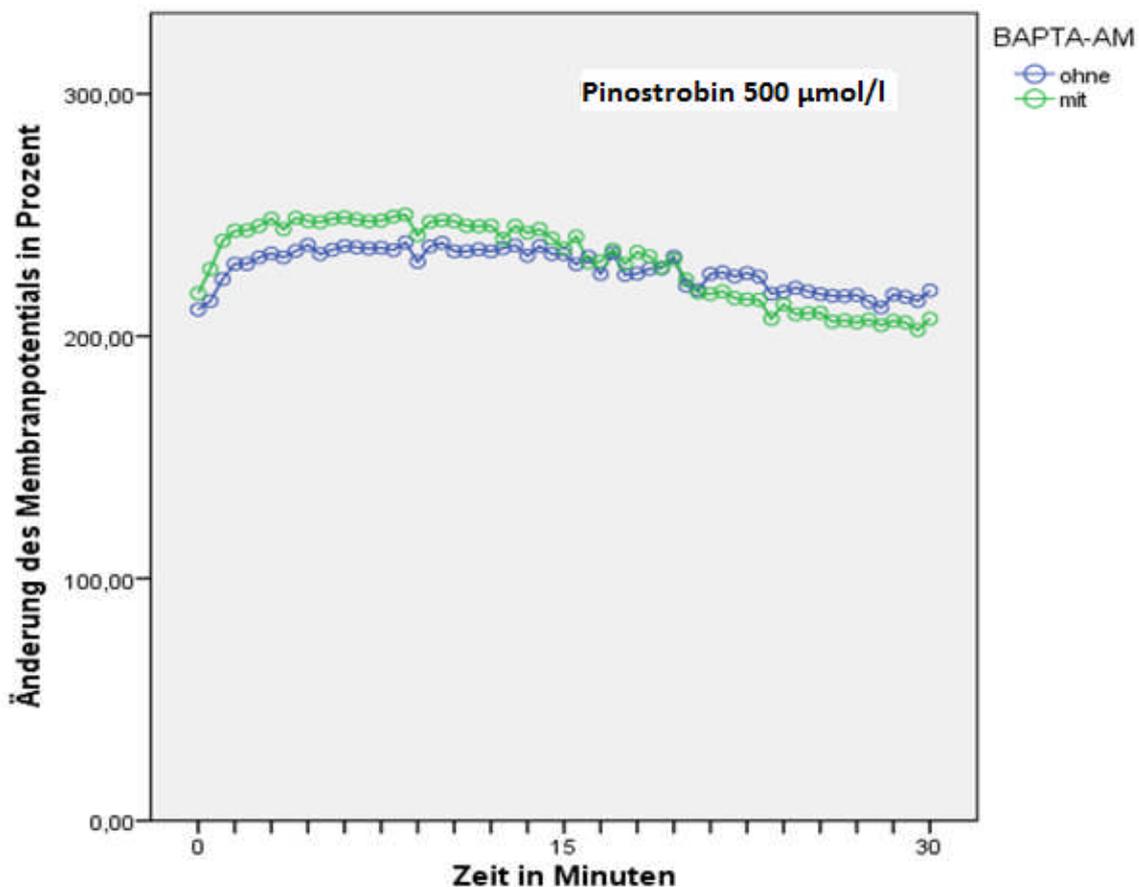


Abb. 13: Membranpotential, Y-Achse: Änderung in Prozent, X-Achse: Zeit in min; Mittelwerte über komplette Zeit $p < 0,01$ in Zeit vs. Kontrolle, $p < 0,01$ in BAPTA-AM vs. Kontrolle, $p > 0,05$ in BAPTA-AM vs. Pinostrobin; Legende: BAPTA-AM 0: ohne BAPTA-AM, BAPTA-AM 1: mit BAPTA-AM; (Zeitpunkt Null auf der Abszisse: Unmittelbar nach dem letzten Pipettierschritt auf der 24-Well Platte wurde diese in den Tecan Infinite M 200 gegeben und die Messung gestartet); $n=12$ (mit BAPTA-AM $n=6$, ohne BAPTA-AM $n=6$); MW in [%] \pm SEM in [%] ohne BAPTA-AM $227,76 \pm 6,34$, mit BAPTA-AM $230,84 \pm 6,34$

Wie in den vorangegangenen Experimenten schon verdeutlicht wurde, verlaufen die Kurven anders, je höher die hinzugefügte Pinostrobinkonzentration ist (vgl. Abb. 11,

12, 13). Dies ist auch in diesem Messversuch der Fall. Die zwei zu beschreibenden Kurven resultieren aus dem Experiment mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin und 500 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin nach Vorinkubation mit BAPTA-AM. Im Unterschied zu vorher steigen die Messwerte, um dann nach 20 min langsam abzufallen. Auch hier verlaufen beide Kurven ungefähr parallel. Der Graph der Zellen, die nicht mit BAPTA-AM vorinkubiert wurden, beginnt auf einem niedrigeren Niveau als der Graph der Zellen, die nicht vorinkubiert wurden. Die Graphen schneiden sich ca. bei 20 min.

3.4 Tecan Infinite M 200-Messung der Änderung der Calciumkonzentration

Die Kontrollgruppe wurde stets auf 100 % festgelegt. Dieses Experiment wurde mit 100 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin durchgeführt:

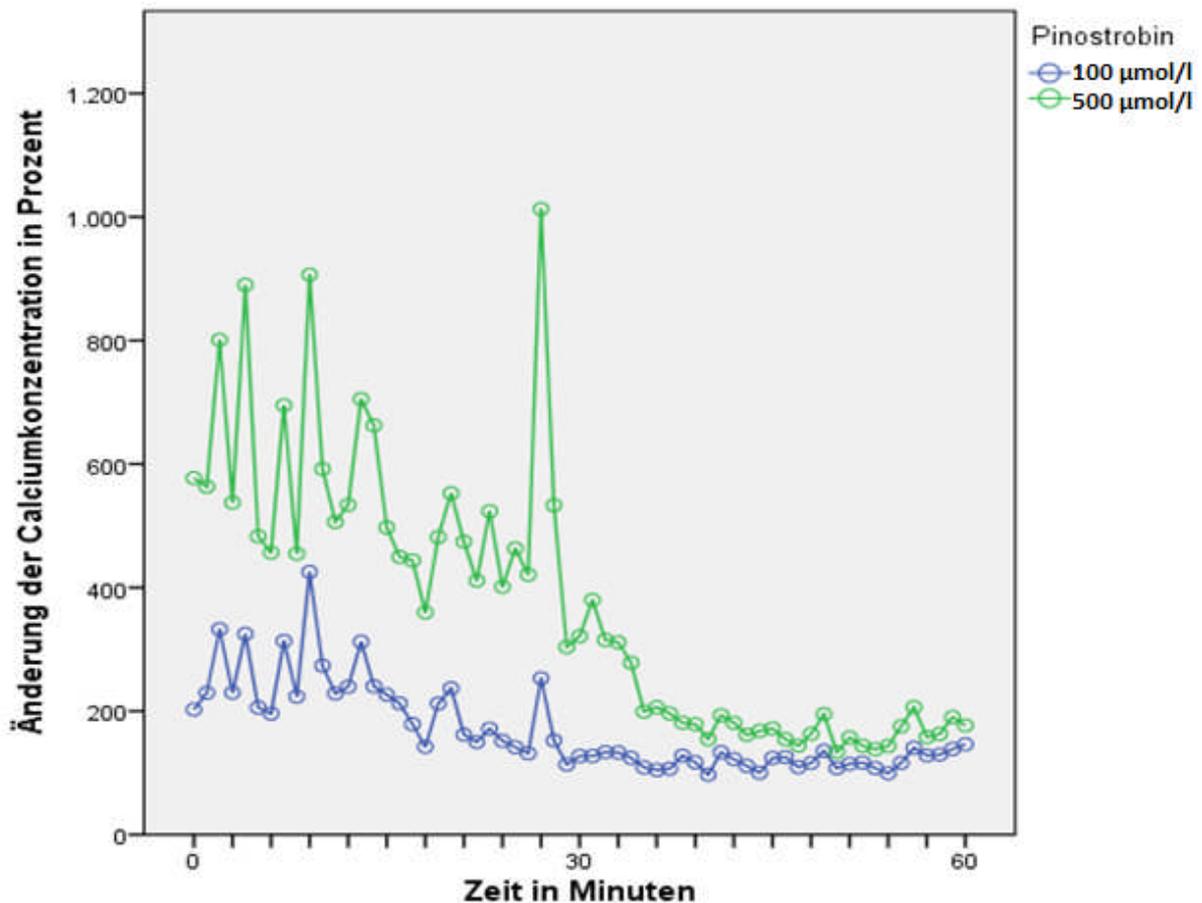


Abb. 14: Calciumkonzentration, Y-Achse: Änderung in Prozent, X-Achse: Zeit in min; Mittelwerte über komplette Zeit $p < 0,01$ in Zeit vs. Kontrolle, $p < 0,01$ in Dosis vs. Kontrolle; $p < 0,01$ Dosis 100 $\mu\text{mol/l}$ vs. Dosis 500 $\mu\text{mol/l}$; (Zeitpunkt Null auf der Abszisse: Unmittelbar nach dem letzten Pipettierschritt auf der 24-Well Platte wurde diese in den Tecan Infinite M 200 gegeben und die Messung gestartet); $n=6$ (Dosis 100 $\mu\text{mol/l}$ $n=3$, Dosis 500 $\mu\text{mol/l}$ $n=3$); MW in [%] \pm SEM in [%] Dosis 100 $\mu\text{mol/l}$ $169,67 \pm 3,99$, Dosis 500 $\mu\text{mol/l}$ $372,79 \pm 3,99$

Als Kontrollgruppe wurden Zellen verwendet, die nicht mit Pinostrobin stimuliert wurden. In Abb. 14 zeigen die Messkurven einen ähnlichen Verlauf. In den Calciumkonzentrationsmessungen ist eine Dosisabhängigkeit zu erkennen, denn die Graphen verlaufen auf unterschiedlichen Niveaus. Der Graph der Messreihe mit der Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ beginnt auf einem niedrigeren Niveau als der Graph der Zellen, die mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin stimuliert wurden. Nach der Hälfte der Messzeit wird in beiden Kurven ein Ausreißer sichtbar. Da es sich bei der Messapparatur um ein geschlossenes System handelt, kann, sobald die Messung gestartet wurde, keine externe Beeinflussung der Messung erfolgen. Es liegt der Schluss nahe, dass es sich hierbei um ein Artefakt handeln könnte.

3.4.1 Tecan Infinite M 200–Messung der Änderung der Calciumkonzentration (Vorinkubation mit BAPTA-AM)

Abb. 15 zeigt die Calciumkonzentrationsmessungen an den Zellen, die mit dem Calciumindikator Fluo 3-AM behandelt, mit dem Calciumchelator BAPTA-AM vorinkubiert und durch Pinostrobin stimuliert wurden. Die Experimente wurden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin durchgeführt. Abb. 15 zeigt die Ergebnisse nach Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ Pinostrobin mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM:

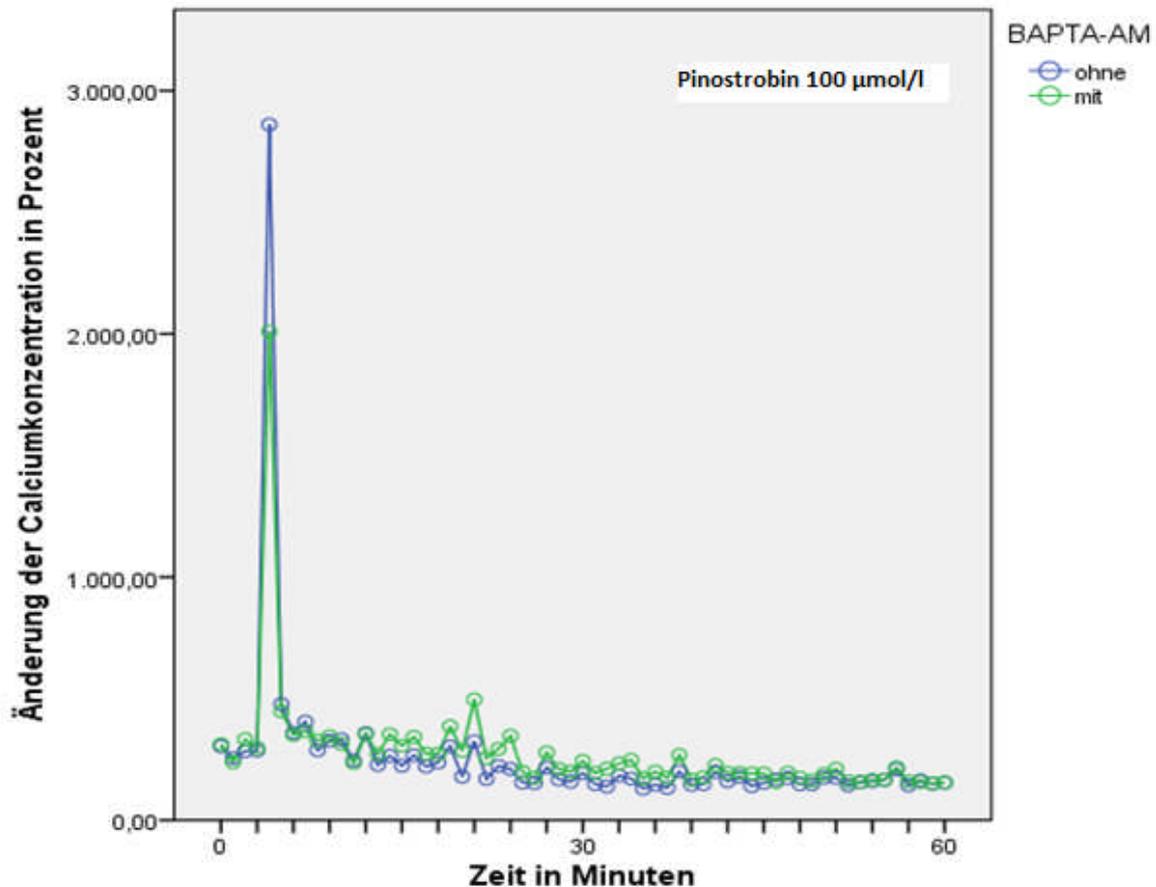


Abb. 15: Calciumkonzentration, Y-Achse: Änderung in Prozent, X-Achse: Zeit in min; Mittelwert über komplette Zeit $p < 0,01$ in Zeit vs. Kontrolle, $p < 0,05$ in BAPTA-AM vs. Kontrolle, $p > 0,05$ in BAPTA-AM vs. $100 \mu\text{mol/l}$ Pinostrobin; Legende: BAPTA-AM 0: ohne BAPTA-AM, BAPTA-AM 1: mit BAPTA-AM; (Zeitpunkt Null auf der Abszisse: Unmittelbar nach dem letzten Pipettierschritt auf der 24-Well Platte wurde diese in den Tecan Infinite M 200 gegeben und die Messung gestartet) $n=10$ (mit BAPTA-AM $n=5$, ohne BAPTA-AM $n=5$); MW in [%] \pm SEM in [%] ohne BAPTA-AM $253,46 \pm 72,48$, mit BAPTA-AM $274,15 \pm 72,48$

Die Graphen der Messreihen mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM verlaufen annähernd identisch. Die Graphen verlaufen fast parallel zur Kontrollgruppe. Ein herausragendes Maximum stellt sich zum Zeitpunkt nach 5 min dar. Derselbe Versuch wurde mit einer Pinostrobinkonzentration von $500 \mu\text{mol/l}$ durchgeführt:

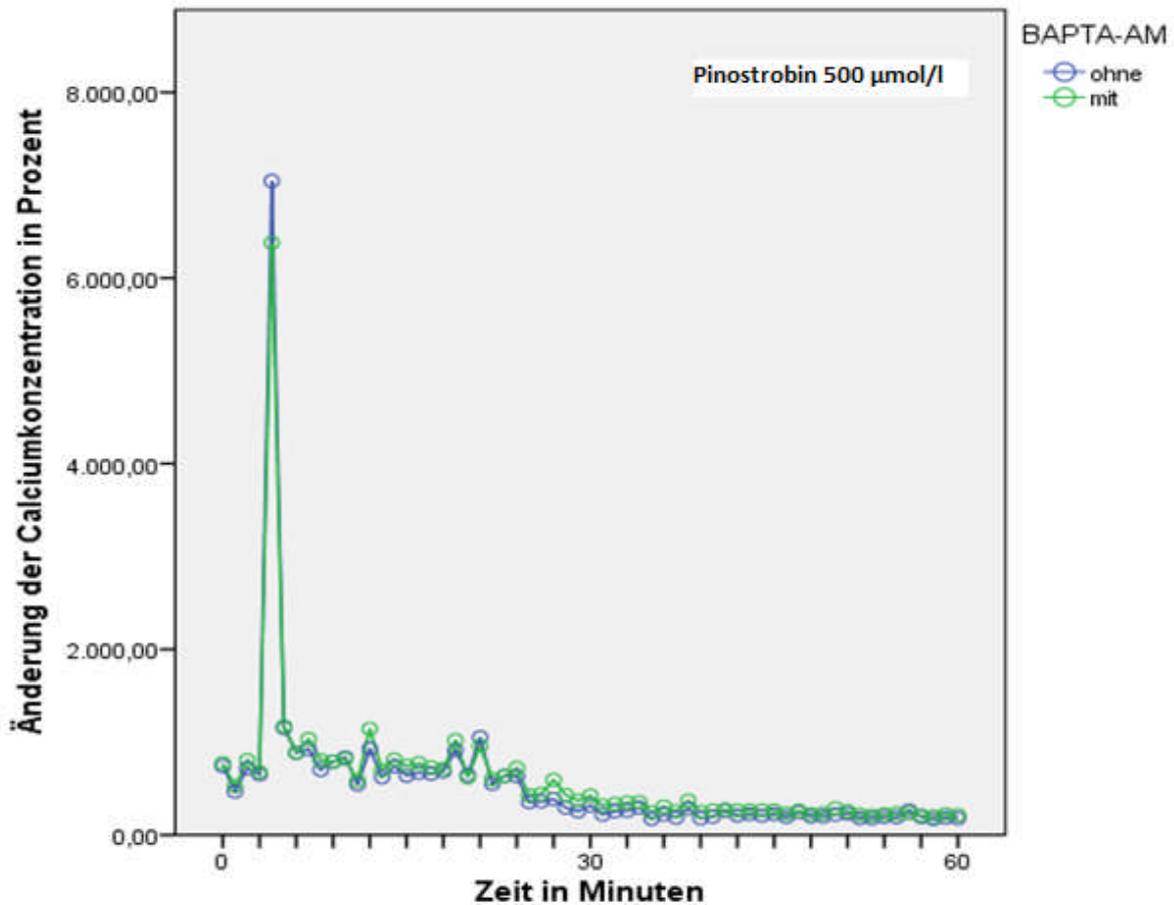


Abb. 16: Calciumkonzentration, Y-Achse: Änderung in Prozent, X-Achse: Zeit in min; Mittelwerte über komplette Zeit $p < 0,01$ in Zeit vs. Kontrolle, $p < 0,05$ in BAPTA-AM vs. Kontrolle, $p > 0,05$ in BAPTA-AM vs. Pinostrobin; Legende: BAPTA-AM 0: ohne BAPTA-AM, BAPTA-AM 1: mit BAPTA-AM; (Zeitpunkt Null auf der Abszisse: Unmittelbar nach dem letzten Pipettierschritt auf der 24-Well Platte wurde diese in den Tecan Infinite M 200 gegeben und die Messung gestartet); $n=10$ (mit BAPTA-AM $n=5$, ohne BAPTA-AM $n=5$); MW in $[\%]\pm\text{SEM}$ in $[\%]$ ohne BAPTA-AM $544,78\pm 72,48$, mit BAPTA-AM $589,01\pm 72,48$

Auch in diesem Experiment verlaufen die Kurven der Messungen mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM annähernd identisch. Die Graphen verlaufen fast parallel zur Kontrollgruppe. Auch hier sind die Maxima der beiden Graphen in der 5. min erreicht.

4. Diskussion

Bislang wurde hauptsächlich beschrieben, aus welchen Pflanzen Pinostrobin isoliert wurde [48, 19, 54, 62, 30, 10, 59, 1]. Es gab noch keine Forschungen in dem Bereich der Wirkung von Pinostrobin auf humane Endothelzellen.

Proliferationsversuche:

Pinostrobin wirkt antiproliferativ auf HUVEC. Je höher die Konzentration ist, desto stärker wirkt es antiproliferativ. Hohe Konzentrationen reduzieren die Zellzahl signifikant. Dies ist möglicherweise nicht nur ein wachstumshemmender Effekt, sondern eine aktive Zellschädigung. Die Messungen des Membranpotentials zeigen, dass das Membranpotential unter unterschiedlichen Pinostrobinkonzentrationen weniger negativ wurde. Dies könnte zu einer Instabilität der Zellmembran führen, was eine Zellzerstörung zur Folge hat. Dabei wurde auch gezeigt, dass eine tendenzielle Änderung der Zellzahl in der ersten Stunde beginnt, jedoch war der Effekt nicht signifikant. Die Wirkung (Abnahme der Zellzahl) entfaltet sich erst in den nachfolgenden 47 Stunden.

Messung der Calciumkonzentration:

Die mit Fluo3-AM inkubierten Zellen weisen unter der Zugabe von Pinostrobin eine Fluoreszenzerhöhung auf. Die Erhöhung der Leuchtkraft zeigt, dass sich die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht hat. Dies kann durch einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum oder aus intrazellulären Speichern verursacht sein. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch die Calciumkonzentrationserhöhung unter Pinostrobin dosisabhängig ist. Der Calciumgehalt in der Zelle erhöht sich umso stärker, je höher die Pinostrobinkonzentration ist. Folglich wurde gezeigt, dass Pinostrobin dosisabhängig für 30 Minuten nach Zugabe des Flavonoids eine Calciumkonzentrationserhöhung in der Zelle verursacht.

Dieser Versuch bestätigt die These, dass die Reaktionen der Zelle nach Stimulation mit Pinostrobin calciumabhängig sind.

In den Calciumkonzentrationsmessungen mittels Tecan Infinite M 200 zeigt Pinostrobin in den Experimenten mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM eine Reaktion. Sind die Reaktionen der Zelle calciumabhängig, sollte nach der Zugabe

von BAPTA-AM der Graph der Messergebnisse nach Vorinkubation mit BAPTA-AM auf einem niedrigeren Niveau im Vergleich zu den Messergebnissen ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM verlaufen. Steigt die Kurve trotz Zugabe von BAPTA-AM an, ist der Effekt von Pinostrobin unabhängig von Calcium. Beide Graphen verlaufen annähernd gleich. Möglich ist, dass die Konzentration des BAPTA-AM zu gering gewählt wurde. Eine andere Theorie würde erklären, warum sich die Reaktion unter dem Einfluss von BAPTA-AM nicht unterdrücken lässt. Demnach wären die Reaktionen der Zelle nicht calciumabhängig, sondern durch das einzige Elektrolyt, das einen Konzentrationsunterschied zwischen Zellinneren (Pipettenlösung) und Zelläußeren (Badlösung) aufrechterhält, gegeben. Hierbei handelt es sich um Chlorid. Folglich wäre die Reaktion chloridabhängig. Eine weitere Hypothese wäre, dass Pinostrobin BAPTA-AM inaktiviert. Es wäre denkbar, dass BAPTA-AM in der Gegenwart von Pinostrobin eine paradoxe Wechselwirkung ausbildet und BAPTA-AM inaktiviert wird. Somit ist auch in dieser Kurve eine calciumabhängige Fluoreszenzerhöhung möglich. In beiden Graphen ist ein hohes Maximum sichtbar, was eine intrazelluläre Calciumerhöhung beweist. Eine Chloridabhängigkeit ist somit eher unwahrscheinlich. Folglich ist auch durch diese Versuchsreihe dargestellt worden, dass Pinostrobin einen, und zwar dosisabhängigen, Calciumeinstrom auslöst.

Änderung des Membranpotentials:

Zur Untersuchung der Veränderung des Membranpotentials unter dem Einfluss von Pinostrobin wurde mit der Methode des Tecan Infinite gearbeitet. Die gezeigte Fluoreszenzerhöhung repräsentiert eine Membranpotentialerhöhung. Es wurde je Well eine gesamte Zellpopulation gemessen, so dass es sich nicht um absolute Werte pro Zelle, sondern um Tendenzen handelt. Je höher die Konzentration von Pinostrobin ab einer Dosis von 50 $\mu\text{mol/l}$ ist, desto höher sind der Ausgangswert und das Niveau der Graphen. Somit gibt es eine Membranpotentialerhöhung durch eine erhöhte Dosis von Pinostrobin. Folglich ist die Wirkung des Flavonoids dosisabhängig. Des Weiteren wurde herausgestellt, dass die Maxima mit den Konzentrationen von 300 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ im Vergleich zu den drei höchsten Dosen später auftreten. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass bei einer höheren Konzentration mehr Pinostrobin angeflutet wird, was gleichzeitig an mehr Orten wirken kann und somit ein früheres Maximum auslöst, als bei einer geringeren

Konzentration. Außerdem wurde gezeigt, dass das Pinostrobin seine Wirkung zeitverzögert entfaltet. Die Höhe der Maxima wird durch die Dosis des Pinostrobins beeinflusst. Je höher die Dosis, desto höher das Maximum. Danach fallen alle Graphen wieder ab. Bis zur Konzentration von 700 $\mu\text{mol/l}$ bleibt die zur Kontrollgruppe parallele Kurve über dem Ausgangsniveau. Ab der Konzentration von 700 $\mu\text{mol/l}$ sinkt das Membranpotential unter den Ausgangswert, um dann parallel zur Kontrollgruppe zu verlaufen. Es wäre möglich, dass die Zelle nach der Zugabe von geringen Konzentrationen und ihrer anschließenden Wirkung ein etwas erhöhtes Membranpotential behält, aber annähernd in die Ausgangsposition zurückkehrt. Es zeigt sich eine gravierende Änderung der Leitfähigkeit. Zuerst zeigt sich eine Depolarisation, auf die eine Hyperpolarisation folgt.

Durch diesen Versuch ist deutlich geworden, dass die Wirkung des Flavonoids Pinostrobin sowohl dosis-, als auch zeitabhängig ist.

Im darauffolgenden Experiment wurden die Zellen mit BAPTA-AM vorinkubiert. Die Messergebnisse zeigen, dass das Membranpotential höher ist, wenn die Zellen zusätzlich zu der Stimulation mit Pinostrobin mit BAPTA-AM inkubiert wurden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das Flavonoid in Wechselwirkung mit BAPTA-AM tritt. Möglich wäre auch, dass die Konzentration des BAPTA-AM zu gering gewählt wurde. Dieses Phänomen wurde bereits im vorangehenden Abschnitt beschrieben.

Messung der Leitfähigkeit der Zellmembran:

Eine Änderung der Leitfähigkeit wurde durch die Patch-Clamp-Messungen gezeigt. Im Vergleich der Wirkung der Pinostrobinkonzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$, 300 $\mu\text{mol/l}$ und 500 $\mu\text{mol/l}$ (bei Betrachtung der Werte bei Klemmspannungen von -100 mV bis 100 mV) zeigte sich, dass es signifikante Unterschiede der Zellreaktionen im Mittel über die Zeit gibt. Im Gesamtvergleich ändern sich somit die Ionenströme und die Leitfähigkeit der Zellmembran signifikant unter dem Einfluss verschiedener Pinostrobindosen. Die Wirkung des Pinostrobins ist somit dosisabhängig. Bei der Betrachtung der Werte der Klemmspannungen zwischen -20 mV und 20 mV wurden die Ergebnisse nicht signifikant. In den weiteren Versuchen wurde mit BAPTA-AM und Bariumchlorid gearbeitet. Um zu untersuchen, welcher Mechanismus am stärksten einen Einfluss auf die Änderung der Membranleitfähigkeit von HUVEC nach der Zugabe von Pinostrobin hat, wurde mit Bariumchlorid gearbeitet. Bariumchlorid

inhibiert Kaliumkanäle. Eine Zunahme der Leitfähigkeit kann durch Bariumchlorid verhindert werden. In den Patch-Clamp-Ergebnissen wurde gezeigt, dass die mit Bariumchlorid inkubierten Zellen eine signifikante Änderung der Reaktion nach Zugabe von Pinostrobin haben, verglichen mit Zellen, die nicht vorinkubiert waren. Folglich spielen Kaliumkanäle bei der Veränderung der Leitfähigkeit in HUVEC unter Pinostrobineinfluss eine große Rolle.

Die signifikante Differenz der Änderung der Zellreaktion auf Pinostrobin nach Vorinkubation mit BAPTA-AM im Vergleich zu Zellen, die nicht vorinkubiert wurden zeigt, dass die Reaktion der Zellen auf Pinostrobin calciumabhängig ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Messungen zeigen ein Nullstrompotential um 0 mV. Eine Messung des Ruhemembranpotentials zu Beginn der Untersuchung erfolgte nicht. Eine genaue Aussage über das Nullstrompotential kann somit nicht getroffen werden. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Untersuchung von Änderungen der Leitfähigkeit und nicht von Hyper- oder Depolarisation gesprochen. Ferner kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass ein einsetzender Zellschaden ursächlich für das gezeigte Potential ist. Einen signifikanten Einfluss hatte dies nicht, wie durch die Proliferationsversuche (nach einer Stunde Inkubationszeit) gezeigt werden konnte.

Zwei verschiedene Mechanismen werden aktiviert, wenn die Leitfähigkeit der Zelle abnimmt. Erstens werden calciumabhängige Kaliumkanäle geöffnet, was zu einer sehr starken Zunahme der Leitfähigkeit führt. Zweitens werden calciumabhängige Chloridkanäle geöffnet, was ebenfalls zu einer, allerdings wesentlich schwächeren, Zunahme der Leitfähigkeit führt. Zusätzlich zu diesen beiden Mechanismen wirken auch die Kalium-einwärts-gleichrichtenden-Kanäle an der Erzeugung einer Zunahme mit. Sie arbeiten als Kaliumsensoren. Durch die Aktivität der calciumabhängigen Kaliumkanäle steigt der extrazelluläre Kaliumgehalt an. Dies wird von den Kalium-einwärts-gleichrichtenden-Kanälen detektiert. Dadurch steigt ihre Leitfähigkeit an. Die K_{ir} sind in der Lage, die depolarisierende Wirkung der unselektiven Kationenkanäle zu überwinden. Durch die erhöhte Leitfähigkeit der K_{ir} entsteht eine Hyperpolarisation der Endothelzellmembran [37]. Nach der anfänglichen Depolarisation hyperpolarisieren die Endothelzellen wieder.

5. Zusammenfassung

Pinostrobin wirkt antiproliferativ auf HUVEC. Je höher die Konzentration dieses Flavonoids ist, desto antiproliferativer wirkt es. Seine Wirkung entfaltet Pinostrobin im Laufe von 48 Stunden. Möglich wäre eine zytotoxische Reaktion durch Membranstabilität bei einer gravierenden Leitfähigkeitsänderung durch hohe Pinostrobindosen.

Pinostrobin bewirkt eine Calciumerhöhung im Intrazellulärraum. Das Calcium strömt entweder aus dem Extrazellulärraum in die Zelle ein, oder es wird aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Diese Calciumerhöhung löst eine Depolarisation aus. Als Folge der Depolarisation regelt die Zelle selbstständig gegen. Sie setzt verschiedene Mechanismen in Gang. Es werden die calciumabhängigen Kaliumkanäle und die calciumabhängigen Chloridkanäle geöffnet. Die Öffnung dieser beiden Kanaltypen führt zu einer Hyperpolarisation. Im Zuge der Aktivitätssteigerung der calciumabhängigen Kaliumkanäle steigt der extrazelluläre Kaliumgehalt an. Auf die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration reagieren die Kalium-einwärts-gleichrichtenden-Kanäle (K_{ir}) mit einer Erhöhung ihrer Leitfähigkeit. Die K_{ir} sind in der Lage, die depolarisierende Wirkung der unselektiven Kationenkanäle zu überwinden und somit die Zelle zu hyperpolarisieren [37].

In den Experimenten wurde auch dargestellt, dass es einen signifikanten Unterschied der Wirkung von Pinostrobin auf HUVEC gibt, wenn die Zellen vor Zugabe des Pinostrobin mit Bariumchlorid inkubiert wurden. Ein großer Anteil an der Änderung der Leitfähigkeit der Zellmembran kommt somit den Kaliumkanälen zu.

In mehreren unterschiedlichen Versuchen wurde gezeigt, dass Pinostrobin BAPTA-AM möglicherweise inaktiviert (oder die Konzentration zu gering gewählt wurde). Es wäre möglich, dass BAPTA-AM nicht das gesamte vorhandene Calcium binden kann. Unter der Zugabe von Pinostrobin strömt etwas Calcium in die Zelle ein. Zusätzlich inaktiviert möglicherweise Pinostrobin BAPTA-AM. Das zuvor gebundene Calcium ist frei und strömt in die Zelle ein. Die Verwendung von BAPTA-AM führt zu einer Calciumkonzentrationserhöhung in der Zelle. In den Untersuchungen wurde auch dargestellt, dass es einen signifikanten Unterschied der Wirkung von Pinostrobin auf HUVEC gibt, wenn die Zellen vor Zugabe des Pinostrobin mit BAPTA-AM inkubiert wurden.

Ein großer Anteil an der Änderung der Leitfähigkeit der Zellmembran kommt somit der Calciumkonzentration zu.

In allen Experimenten wurde deutlich, dass die Wirkung des Pinostrobin zeitabhängig ist. Außerdem wurde gezeigt, dass Pinostrobin dosisabhängig wirkt. Je höher die Dosis des Flavonoids ist, desto größer ist seine Wirkung.

Pinostrobin setzt eine Reihe von Mechanismen in Gang. Am entscheidendsten in diesem Prozess sind die Aufgaben der Calciumkanäle und die der Kaliumkanäle.

Pinostrobin hat Einfluss auf das Membranpotential, die Leitfähigkeit, die intrazelluläre Calciumkonzentration und die Zellproliferation. Dies sind Eigenschaften, die das Flavonoid zu einem interessanten Forschungsobjekt der Arterioskleroseforschung machen.

6. Summary

Pinostrobin acts antiproliferative on HUVEC. Increasing concentration of this flavonoid is associated with a higher antiproliferative effect. The effect of Pinostrobin evolves within 48 hours. The change of conductance could lead to instability of the membrane, which might induce a cytotoxic reaction.

Pinostrobin causes an increase of the intracellular calcium concentration. Calcium either enters the cell from the extracellular space or gets released from intracellular storages. The increase of intracellular calcium concentration triggers depolarisation. This depolarisation induces different mechanisms. Ca^{2+} -activated K^+ -channels and Ca^{2+} -dependent Cl^- -channels open up. This causes hyperpolarisation. Due to the increased activity of the Ca^{2+} -activated K^+ -channels, the extracellular potassium concentration increases. The inwardly rectifying K^+ -channels react on this risen concentration with an increase of their conductance. The inwardly rectifying K^+ -channels are capable of conquering the depolarising action of the unselective cation channels. Therefore, they hyperpolarise the endothelial cell [37].

It was shown that there is a significant difference between the reaction of Pinostrobin on HUVEC whether the cells were pre-incubated with bariumchloride, or not. Therefore, the K^+ -channels play an important role in changing the conductance of the cell membrane.

Different experiments show that Pinostrobin might inactivate BAPTA-AM (although the concentration might have been chosen to low). Perhaps, BAPTA-AM does not bond the whole available calcium. Addition of Pinostrobin induces calcium influx. Furthermore Pinostrobin might inactivate BAPTA-AM. The previously bound calcium gets released and enters the cell. BAPTA-AM leads to an increase of the concentration of intracellular calcium.

It was shown that there is a significant difference between the reaction of Pinostrobin on HUVEC whether the cells were pre-incubated with BAPTA-AM, or not. Therefore, the concentration of calcium plays an important role in changing the conductance of the cell membrane.

All experiments clarify that the effect of Pinostrobin is time-dependent. Furthermore it has been shown that Pinostrobin appears dose-dependent. Increasing the dose of this flavonoid leads to a higher effect.

Pinostrobin induces several mechanisms. The most important ones are the functions of the calcium channels and the K^+ - channels.

Pinostrobin influences the membrane potential, the conductance of the cell membrane, the intracellular concentration of calcium and the proliferation of endothelial cells. Due to these characteristics, this flavonoid is interesting for further investigations in arteriosclerosis research.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel Pinostrobin	1
Abb. 2: Hyperpolarisation der Zellmembran in Endothelzellen	6
Abb. 3: Calciumeinstrom in Endothelzellen	7
Abb. 4: Patch-Clamp-Apparatur	10
Abb. 5: Patch-Clamp-Stand	11
Abb. 6: Patch-Clamp-Rechner und Monitorsystem	11
Abb. 7: Antiproliferativer Effekt von Pinostrobin nach 48 h	23
Abb. 8: Antiproliferativer Effekt von Pinostrobin, Vergleich der Ergebnisse nach 1 h und 48 h	24
Abb. 9: Mittelwerte der Ionenströme der Zellen unter dem Einfluss von 100 µmol/l Pinostrobin in der 2. Minute mit und ohne Blocker / Chelator	26
Abb. 10: Mittelwerte der Ionenströme der Zellen unter dem Einfluss von 100 µmol/l Pinostrobin in der 14. Minute mit und ohne Blocker / Chelator	28
Abb. 11: Membranpotential, Pinostrobinkonzentr. 1, 10, 25, 50, 100, 300, 500, 700, 900, 1000 µmol/l	30
Abb. 12: Membranpotential, Pinostrobinkonzentration 100 µmol/l, mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM	32
Abb. 13: Membranpotential, Pinostrobinkonzentration 500 µmol/l, mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM	33
Abb. 14: Calciumkonzentration, Pinostrobinkonzentrationen 100 µmol/l und 500 µmol/l	34
Abb. 15: Calciumkonzentration, Pinostrobinkonzentrationen 100 µmol/l, mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM	36
Abb. 16: Calciumkonzentration, Pinostrobinkonzentrationen 500 µmol/l, mit und ohne Vorinkubation mit BAPTA-AM	37

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beladungsmuster der 24-Well Platte	14
Tab. 2: Beladungsmuster der 24-Well Platte	15
Tab. 3: Beladungsmuster der 24-Well Platte	16
Tab. 4: Beladungsmuster der 24-Well Platte	16
Tab. 5: Beladungsmuster der 24-Well Platte	17
Tab. 6: Beladungsmuster der 24-Well Platte	18
Tab. 7: Beladungsmuster der 24-Well Platte	19
Tab. 8: Beladungsmuster der 24-Well Platte	20
Tab. 9: Mittelwerte der Ionenströme der Zellen unter dem Einfluss von 100 µmol/l Pinostrobin in der zweiten Minute mit und ohne Blocker / Chelator	27
Tab. 10: Mittelwerte der Ionenströme der Zellen in der vierzehnten Minute unter dem Einfluss von 100 µmol/l Pinostrobin mit und ohne Blocker / Chelator	29

9. Literaturliste

- [1] Abdelwahab SI, Mohan S, Abdulla MA, Sukari MA, Abdul AB, Taha MM, Syam S, Ahmad S, Lee KH. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: possible involvement of indirect antioxidant action. *J Ethnopharmacol.* 2011 Sep b2; 137(2): 963-70. Epub 2011 Jul 8. PubMed PMID: 21771650.
- [2] Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*; 3., korrigierte Auflage 2005, Wiley-VHC Verlag Weinheim; Deutschland (2005)
- [3] Baumhoer D, Steinbrück I, Götz W. *Histologie*; Urban und Fischer Verlag München; Deutschland (2000)
- [4] Bény J. Electrical coupling between smooth muscle cells and endothelial cells in pig coronary arteries. *Pflugers Arch.* 1997 Jan; 433(3): 364-7. PubMed PMID:9064654.
- [5] Betzen C, *Oxidativer Stress als Modulator der NMDA Rezeptorexpression auf zerebrovaskulären Endothelzellen*; Dissertation Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland (2010)
- [6] Born GVR, and Schwartz CJ. *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology and Therapeutics.* Stuttgart, Germany: Schattauer Verlag, 1997
- [7] Bregestovski P, Bakhrarov A, Danilov S, Moldobaeva A, Takeda K. Histamine-induced inward currents in cultured endothelial cells from human umbilical vein. *Br J Pharmacol.* 1988 Oct; 95(2): 429-36. PubMed PMID: 3147803; PubMed Central PMCID: PMC1854158
- [8] Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994 Oct 1; 84(7): 2068-101. Review. PubMed PMID: 7522621.
- [9] Colden-Stanfield M, Cramer EB, Gallin EK. Comparison of apical and basal surfaces of confluent endothelial cells: patch-clamp and viral studies. *Am J Physiol.* 1992 Sep; 263(3 Pt 1): C573-83. PubMed PMID: 1415508.
- [10] Fahey JW, Stephenson KK. Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): a potent flavonoid inducer of mammalian phase 2

- chemoprotective and antioxidant enzymes. *J Agric Food Chem.* 2002 Dec 4; 50(25): 7472-6. PubMed PMID: 12452678.
- [11] Fleischer W. Entwicklung von striatalen Neuronen zu funktionellen Netzwerken in vitro, Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Deutschland (2006)
- [12] Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jan 19; 92(2): 94-5. PubMed PMID: 10639502.
- [13] Fransen PF, Demolder MJ, Brutsaert DL. Whole cell membrane currents in cultured pig endocardial endothelial cells. *Am J Physiol.* 1995 May; 268 (5 Pt 2): H2036-47. PubMed PMID: 7771553.
- [14] Grgić I. Die Rolle der Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle bei Endothelzellproliferation und Angiogenese; Inaugural-Dissertation Philipps-Universität Marburg; Deutschland (2006)
- [15] Haburcák M, Wei L, Viana F, Prenen J, Droogmans G, Nilius B. Calcium-activated potassium channels in cultured human endothelial cells are not directly modulated by nitric oxide. *Cell Calcium.* 1997 Apr; 21(4): 291-300. PubMed PMID: 9160165.
- [16] Himmel HM, Whorton AR, Strauss HC. Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension.* 1993 Jan; 21(1): 112-27. Review. PubMed PMID: 8380279.
- [17] Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G. *Biochemie des Menschen*; 3., korrigierte Auflage 2005, Georg Thieme Verlag Stuttgart; Deutschland (2005)
- [18] Hoyer J, Distler A, Haase W, Gögelein H. Ca^{2+} influx through stretch activated cation channels activates maxi K^+ channels in porcine endocardial endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 15; 91(6): 2367-71. PubMed PMID: 7510889; PubMedCentral PMCID: PMC43372.
- [19] Hurabielle M, Eberle J, Paris M. [Flavonoids of *Artemisia campestris*, ssp. *glutinosa*]. *Planta Med.* 1982 Oct; 46(10): 124-5. German. PubMed PMID: 17396957.
- [20] Janigro D, West GA, Gordon EL, Winn HR. ATP-sensitive K^+ channels in rat aorta and brain microvascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1993 Sep; 265(3 Pt1): C812-21. PubMed PMID: 8214038.

- [21] Kamouchi M, Droogmans G, Nilius B. Membrane potential as a modulator of the free intracellular Ca^{2+} concentration in agonist-activated endothelial cells. *Gen Physiol Biophys*. 1999 Jun; 18(2): 199-208. PubMed PMID: 10517293.
- [22] Katnik C, Adams DJ. Characterization of ATP-sensitive potassium channels in freshly dissociated rabbit aortic endothelial cells. *Am J Physiol*. 1997 May; 272(5Pt 2): H2507-11. PubMed PMID: 9176323.
- [23] Katnik C, Adams DJ. An ATP-sensitive potassium conductance in rabbit arterial endothelial cells. *J Physiol*. 1995 Jun 15; 485 (Pt 3): 595-606. PubMed PMID: 7562603; PubMed Central PMCID: PMC1158030.
- [24] Kuhlmann C. Einfluss von oxidiertem LDL und Lysophosphatidylcholin auf den Ca^{2+} -aktivierten K^{+} -Kanal mit großer Leitfähigkeit und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Proliferation, NO- und Ca^{2+} -Homöostase humaner Endothelzellen; Inaugural-Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen; Deutschland (2003)
- [25] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004 Jun 1; 109 (21 Suppl 1): II 27-33. Review. PubMed PMID: 15173060.
- [26] Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol*. 1989; 51: 385-99. Review. PubMed PMID: 2653189.
- [27] Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000 Mar; 247(3): 349-58. Review. PubMed PMID: 10762452.
- [28] Ling BN, O'Neill WC. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -permeable ion channels in aortic endothelial cells. *Am J Physiol*. 1992 Dec; 263(6 Pt 2): H1827-38. PubMed PMID: 1282784.
- [29] Lohr M, Keppler B. *Innere Medizin*; 4. Korrigierte Auflage 2005, Urban und Fischer Verlag München; Deutschland (2005)
- [30] López SN, Sierra MG, Gattuso SJ, Furlán RL, Zacchino SA. An unusual homoisoflavanone and a structurally-related dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* (Polygonaceae). *Phytochemistry*. 2006 Oct; 67(19): 2152-8. Epub 2006 Aug PubMed PMID: 16884749
- [31] Lückhoff A, Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch*. 1990 May; 416(3): 305-11. PubMed PMID: 2381766.

- [32] Lüdders D. Einfluss des Phosphodiesterase-Typ-5 Inhibitors Sildenafil auf den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanal mit großer Leitfähigkeit in humanen Endothelzellen; Inaugural-Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen; Deutschland (2006)
- [33] Lüllmann-Rauch R. Histologie; Georg Thieme Verlag Stuttgart, Deutschland (2003)
- [34] Manabe K, Ito H, Matsuda H, Noma A, Shibata Y. Classification of ion channels in the luminal and abluminal membranes of guinea-pig endocardial endothelial cells. *J Physiol*. 1995 Apr 1; 484 (Pt 1): 41-52. PubMed PMID: 7541462; PubMedCentral PMCID: PMC1157920.
- [35] Mohr, Z. Eine pharmakologische Stimulierung der endothelialen Nitritoxid-Synthase führt zu einer Verbesserung der Gefäßfunktion in einem diabetischen Rattenmodell; Dissertation Medizinische Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin; Deutschland (2008)
- [36] Nicholson RA, David LS, Pan RL, Liu XM. Pinostrobin from *Cajanus cajan* (L.) Millsp. inhibits sodium channel-activated depolarization of mouse brain synaptoneuroosomes. *Fitoterapia*. 2010 Oct; 81(7): 826-9. Epub 2010 May 21. PubMed PMID: 20472040
- [37] Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*. 2001 Oct; 81(4): 1415-59. Review. PubMed PMID: 11581493.
- [38] Nilius B. Regulation of transmembrane calcium fluxes in endothelium. *News Physiol Sci*: 110-114, 1991
- [39] Nilius B. Signaltransduction in vascular endothelium: the role of intracellular calcium and ion channels. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 1998; 60(3): 215-50. Review. PubMed PMID: 9803881.
- [40] Nilius B, Schwarz G, Droogmans G. Modulation by histamine of an inwardly rectifying potassium channel in human endothelial cells. *J Physiol*. 1993 Dec; 472:359-71. PubMed PMID: 8145150; PubMed Central PMCID: PMC1160491.
- [41] Numberger M, Draguhn A. Patch-Clamp-Technik; Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- [42] Pschyrembel; 259. Korrigierte Auflage 2002, Walter de Gruyter Berlin; Deutschland (2002)
- [43] Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995; 57: 791-804. Review. PubMed PMID: 7778883.

- [44] Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22 Suppl 4: S1-14. Review. PubMed PMID:523767.
- [45] Rusko J, Tanzi F, van Breemen C, Adams DJ. Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca²⁺ sensitivity and block. *J Physiol.* 1992 Sep; 455: 601-21. PubMed PMID: 1484364; PubMed Central PMCID: PMC1175661.
- [46] Salvador MJ, Sartori FT, Sacilotto AC, Pral EM, Alfieri SC, Vichnewski W. Bioactivity of flavonoids isolated from *Lychnophora markgravii* against *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Z Naturforsch C.* 2009 Jul-Aug; 64(7-8): 509-12. PubMed PMID: 19791501
- [47] Schneider C, Endotheliale Kalziumsignaltransduktion bei Patienten nach Herz-Lungen-Maschine; Dissertation Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin; Deutschland (2007)
- [48] Smolarz HD, Mendyk E, Bogucka-Kocka A, Kocki J. Pinostrobin - an anti-leukemic flavonoid from *Polygonum lapathifolium* L. ssp. *nodosum* (Pers.) Dans. *Z Naturforsch C.* 2006 Jan-Feb; 61(1-2): 64-8. PubMed PMID: 16610219.
- [49] Strayer DS, Hoek JB, Thomas AP, White MK. Cellular activation by Ca²⁺ release from stores in the endoplasmic reticulum but not by increased free Ca²⁺ in the cytosol. *Biochem J.* 1999 Nov 15; 344 Pt 1: 39-46. PubMed PMID: 10548531; PubMed Central PMCID: PMC1220611.
- [50] Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2000; 23 (2-4): 185-90. PubMed PMID: 11321439.
- [51] Takahashi T, Fukuda K, Pan J, Kodama H, Sano M, Makino S, Kato T, Manabe T, Ogawa S. Characterization of insulin-like growth factor-1-induced activation of the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1999 Nov 12; 85(10): 884-91. PubMed PMID: 10559134.
- [52] Takeda K, Klepper M. Voltage-dependent and agonist-activated ionic currents in vascular endothelial cells: a review. *Blood Vessels.* 1990; 27(2-5): 169-83. Review. PubMed PMID: 1700734.
- [53] Vargas FF, Caviedes PF, Grant DS. Electrophysiological characteristics of

- cultured human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res.* 1994 Mar; 47(2): 153-65. PubMed PMID: 7517490.
- [54] Wangkangwan W, Boonkerd S, Chavasiri W, Sukapirom K, Pattanapanyasat K, Kongkathip N, Miyakawa T, Yompakdee C. Pinostrobin from *Boesenbergia pandurata* is an inhibitor of Ca²⁺-signal-mediated cell-cycle regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009 Jul; 73(7): 1679-82. Epub 2009 Jul 7. PubMed PMID: 19584530
- [55] Weiterer S. Einfluss von Statinen auf hypoxieinduzierte Proliferation humaner Endothelzellen; Inaugural-Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen; Deutschland (2009)
- [56] Wissler R. Update on the pathogenesis of atherosclerosis, Volume 91, Issue 1, Supplement 2, Pages S3-S9 (31 July 1991) *The American Journal of Medicine*
- [57] Wu N, Kong Y, Zu Y, Fu Y, Liu Z, Meng R, Liu X, Efferth T. Activity investigation of pinostrobin towards herpes simplex virus-1 as determined by atomic force microscopy. *Phytomedicine.* 2011 Jan; 18 (2-3): 110-8. Epub 2010 Aug 23. PubMed PMID: 20739162
- [58] <http://www.chemblink.com/products/480-37-5.htm> (26.09.2010)
- [59] Xian YF, Ip SP, Lin ZX, Mao QQ, Su ZR, Lai XP. Protective Effects of Pinostrobin on β -Amyloid-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Nov; 32 (8): 1223-30. Epub 2012 May 8. PubMed PMID: 22565301.
- [60] Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, and Ando J. Fluid shear stress activates Ca²⁺ influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circ Res* 87: 385-391, 2000
- [61] Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Qi Z, Sokabe M, Ando J. P2X (4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Jul; 279(1): H285-92. PubMed PMID: 10899068.
- [62] Yuan K, Zhu JX, Si JP, Cai HK, Ding XD, Pan YJ. [Studies on chemical constituents and antibacterial activity from n-butanol extract of *Sarcandra glabra*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2008 Aug; 33(15): 1843-6. Chinese. PubMed PMID: 19007012

10. Veröffentlichungen

Siekmann T.R., Hein M., Siekmann U.P.; Akuter Myokardinfarkt und zentrale arterielle Gasembolie bei einem Drucklufttauchgang. Caisson 23(4): 5-9, 2008 ISSN 0933-3991

Siekmann TR, Burgazli KM, Bobrich MA, Nöll G, Erdogan A. The antiproliferative effect of pinostrobin on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Mar; 17(5): 668-72. PubMed PMID: 23543451.

11. Danksagung

Von ganzem Herzen danke ich Frau Fackler und Dr. Siekmann für ihre Unterstützung.

Ferner danke ich Herrn Univ.- Prof. Dr. Diener, Herrn Univ.- Prof. Dr. Erdogan, Herrn Univ.- Prof. Dr. Kummer, Herrn Univ.- Prof. Dr. Nöll, Herrn Univ.- Prof. Dr. Schermuly und Frau Frey-Krug.

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.