

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

**Regulation von Expression und Aktivität der Arginase  
durch Pflanzenextrakte in humanen Endothelzellen  
unter experimenteller Hyperglykämie**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der

Universität Hamburg  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie

vorgelegt von

**Heike Monika Stang**

Januar 2024



**Abgabe der Dissertation:**

20.09.2023

Gutachter:innen:

PD Dr. Juliane Hannemann, PhD

Prof. Dr. Thorsten Burmester

**Tag der Disputation:**

19.01.2024

Mitglieder der Prüfungskommission:

PD Dr. Juliane Hannemann, PhD

Prof. Dr. Rainer Böger

Prof. Dr. Julia Kehr

Prof. Dr. Dominik Begerow



Leicht ist das Leben für keinen von uns.

Doch was nützt das,  
man muss Ausdauer haben  
und vor allem Zutrauen zu sich selbst.

Man muss daran glauben,  
für eine bestimmte Sache begabt zu sein,  
und diese Sache muss man erreichen,

koste es was es wolle.

- Marie Curie -

*Für meine Familie.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VI</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VII</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Diabetes mellitus</b> .....	<b>1</b>
1.1. Klassifikation .....	1
1.2. Spätkomplikationen des Diabetes mellitus .....	2
<b>2. Endothel</b> .....	<b>2</b>
2.1. Morphologie .....	2
2.2. Funktion .....	2
2.3. Stickstoffmonoxid .....	3
2.4. Endotheliale Dysfunktion und Diabetes mellitus .....	4
<b>3. L-Arginin-Metabolismus</b> .....	<b>6</b>
3.1. L-Arginin .....	6
3.2. Arginase .....	7
3.3. Stickstoffmonoxid-Synthase .....	9
3.4. Pathophysiologische Bedeutung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels .....	11
<b>4. Phytotherapie</b> .....	<b>14</b>
4.1. Definition .....	14
4.2. Klassifizierung der Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen .....	14
4.3. Indikation und Grenzen der Phytotherapie .....	15
4.4. Arzneipflanzen-Monographien .....	16
<b>5. Fragestellung</b> .....	<b>24</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
<b>1. Zellkultur</b> .....	<b>25</b>
1.1. Kryokonservierung von EA.hy926-Zellen .....	25
1.2. Auftauen und Kultivierung von EA.hy926-Zellen .....	26
1.3. Test auf Mykoplasmen .....	26
1.4. Stimulation von EA.hy926-Zellen .....	27
<b>2. mRNA-Analytik</b> .....	<b>29</b>
2.1. RNA-Isolierung und Messung der Konzentration .....	29
2.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.3. Synthese der cDNA .....	31
2.4. Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion .....	31
<b>3. Protein-Analytik</b> .....	<b>34</b>
3.1. Probengewinnung .....	34
3.2. Zelllyse und Messung der Proteinkonzentration .....	34
3.3. Western Blot .....	35
<b>4. Messung der Arginase-Aktivität</b> .....	<b>40</b>

<b>5. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin mittels LC-MS/MS</b> .....	<b>43</b>
5.1. Probengewinnung .....	43
5.2. Zellaufschluss mittels Ultraschall .....	43
5.3. Vorbereiten der Proben und Standards .....	44
5.4. Flüssigchromatographie .....	45
5.5. Massenspektrometrie .....	46
5.6. Auswertung .....	46
<b>6. Statistische Auswertung</b> .....	<b>46</b>
<b>7. Material</b> .....	<b>47</b>
7.1. Antikörper .....	47
7.2. Kits .....	47
7.3. Nährmedien, Lösungen, Puffer .....	48
7.4. Software .....	50
7.5. <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -Genexpressionsassays .....	51
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
<b>1. Glucose-Stimulation von EA.hy926-Zellen</b> .....	<b>52</b>
1.1. <i>ARG1</i> , <i>ARG2</i> und <i>NOS3</i> Genexpression .....	52
1.2. Arg2 und eNOS Proteinexpression .....	53
1.3. Arginase-Aktivität .....	54
1.4. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin .....	54
<b>2. Stimulation von EA.hy926-Zellen mit einzelnen Pflanzenextrakten</b> .....	<b>56</b>
2.1. Bestimmung des Referenzgens .....	56
2.2. <i>ARG2</i> und <i>NOS3</i> Genexpression .....	61
2.3. Arg2 und eNOS Proteinexpression .....	64
2.4. Arginase-Aktivität .....	67
2.5. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin .....	68
<b>3. Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombinationen</b> .....	<b>75</b>
3.1. Arginase-Aktivität .....	75
3.2. <i>ARG2</i> und <i>NOS3</i> Genexpression .....	77
3.3. Arg2 und eNOS Proteinexpression .....	78
3.4. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin .....	79
<b>Diskussion</b> .....	<b>82</b>
<b>1. Arginase-Regulation in EA.hy926 unter High Glucose</b> .....	<b>82</b>
<b>2. Beeinflussung des Arginase-eNOS-Gleichgewichts durch Glucose</b> .....	<b>86</b>
<b>3. Effekt der einzelnen Pflanzenextrakte und der Kombination</b> .....	<b>87</b>
3.1. Bestimmung des Referenzgens .....	87
3.2. Effekt der einzelnen Pflanzenextrakte .....	87
3.3. Effekt der Pflanzenkombination .....	92
<b>4. Ausblick</b> .....	<b>93</b>

<b>Anhang</b> .....	<b>96</b>
<b>I. Zusätzliche Daten</b> .....	<b>96</b>
Stoffklassen der pflanzlichen Sekundärstoffe.....	96
Bestimmung des Referenzgens: Pairwise- $\Delta c_T$ .....	98
<b>II. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>100</b>
<b>III. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>106</b>
<b>IV. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>108</b>
<b>V. Material</b> .....	<b>109</b>
Laborgeräte .....	109
Substanzen und Reagenzien .....	112
Verbrauchsmaterial .....	115
<b>Danksagung</b> .....	<b>117</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>119</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### 1

18S *18S ribosomal RNA*

### A

ABH 2(S)-Amino-6-borono-hexansäure  
ACTB  $\beta$ -Actin  
ADC Arginindecarboxylase  
ADMA asymmetrisches Dimethylarginin  
APS Ammoniumpersulfat  
Arg1 Arginase 1  
Arg2 Arginase 2  
AUC *area under the curve*

### B

B2M  $\beta_2$ -Mikroglobulin  
BAEC *Bovine Aortic Endothelial Cells*  
BH<sub>4</sub> (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin

### C

CaM Calmodulin  
cDNA *complementary DNA*  
cGMP cyclisches Guanosinmonophosphat  
c<sub>r</sub> *cycle threshold*  
CV Variationskoeffizient

### D

ddH<sub>2</sub>O Milli-Q®-Wasser  
DFMO  $\alpha$ -Difluoromethylornithin  
DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO Dimethylsulfoxid  
DNA *desoxyribonucleic acid*  
DPBS *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

### E

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure  
eNOS endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

### F

FAD Flavin-Adenin-Dinucleotid  
FAM 6-Carboxyfluorescein  
FBS *Fetal Bovine Serum*  
FMN Flavinmononucleotid

### G

GABA  $\gamma$ -Aminobuttersäure  
GNK Ginkgo  
GNS Ginseng  
GRA Granatapfel  
GTP Guanosintriphosphat

### H

HAEC *Human Aortic Endothelial Cells*  
HG High Glucose  
HUVEC *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

### I

iNOS induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase  
IP<sub>3</sub> Inositol-1,4,5-triphosphat  
IRAG IP<sub>3</sub>-Rezeptor assoziiertes PGK-Substrat  
ISPF  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon

### L

LC-MS/MS Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie  
LDL *Low Density Lipoprotein*  
LPS Lipopolysaccharide

### M

m/z Masse-zu-Ladung-Verhältnis  
MA Mariendistel  
mRNA *messenger RNA*

### N

NADP/ NADPH Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat  
NFDM *Non-fat dry milk*  
NG Normal Glucose  
nNOS neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Nitrit  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Nitrat  
NOS Stickstoffmonoxid-Synthase  
NOS3 endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

### O

O<sub>2</sub><sup>-</sup> Superoxid  
OAT Ornithinaminotransferase  
ODC Ornithindecarboxylase  
OLI Olive  
ONOO<sup>-</sup> Peroxynitrit

### P

pAVK periphere arterielle Verschlusskrankung  
PCR *polymerase chain reaction*  
PKG Proteinkinase G  
PNS peripheres Nervensystem  
PPIA Peptidylprolylisomerase A  
PUM1 *Pumilio RNA binding family member 1*

### Q

qRT-PCR quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

## R

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RO	Roskastanie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPL13A	<i>Ribosomal Protein L13a</i>
RT	Raumtemperatur

## S

SD	Standardabweichung
SDHA	Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i>

## T

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

## U

UBC	Ubiquitin C
-----	-------------

## V

VIC	2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein
-----	---

## Z

ZNS	zentrales Nervensystem
-----	------------------------

## **Zusammenfassung**

Endothelzellen sind an vielen physiologischen Prozessen des kardiovaskulären Systems beteiligt. Eine wichtige Funktion ist die Synthese des vasoprotektiven Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO), welches die Relaxation von Blutgefäßen bewirkt. Eine Störung der Endothelfunktion gilt als Beginn der Pathogenese vieler Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Auch beim Diabetes mellitus ist die gestörte Funktion des Endothels und die dadurch reduzierte Bildung von NO ein wesentlicher Mechanismus der Entstehung von diabetischen Gefäßschädigungen. Einige Studien fanden heraus, dass die unter pathophysiologischen Bedingungen verminderte Bildung von NO auf die eingeschränkte Verfügbarkeit des Substrats der NO-Synthase, L-Arginin, zurückzuführen ist. Dabei berichteten verschiedene Autoren, dass es im diabetischen Gefäßsystem zu einer Veränderung der Expression und / oder Aktivität des Enzyms Arginase kommt. Die Arginase hydrolysiert L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff, sodass eine unter pathophysiologischen Bedingungen überaktive Arginase das NO-Defizit und die endotheliale Dysfunktion erklären könnte. Welche Mechanismen zum Anstieg von Expression und Aktivität der Arginase im diabetischen Gefäß führen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

In dieser Arbeit wurden die Expression und Aktivität der Arginase und ihre Regulation in kultivierten humanen Endothelzellen unter hyperglykämischen Bedingungen untersucht. In der immortalisierten Zelllinie EA.hy926 wurde untersucht, ob die in der Literatur beschriebene Hochregulation der Arginase auf der Transkriptionsebene (mRNA), der Translationsebene (Protein) oder der Funktionsebene (Aktivität) stattfindet. Mit Hilfe ausgewählter Pflanzenextrakte wurde schließlich versucht, die Hochregulation der Arginase unter High Glucose zu verringern oder zu verhindern, da dies ein neuer Ansatz zur Prävention der frühzeitigen diabetischen Gefäßschädigungen sein könnte. Parallel hierzu wurde untersucht, wie sich die Hochregulation der Arginase auf die Expression der endothelialen NO-Synthase auswirkt.

Es zeigte sich, dass von den beiden bekannten Arginase-Isoformen (Arginase 1 und 2) Arginase 2 die prädominante Isoform in EA.hy926-Zellen ist. Die Hochregulation der Arginase 2 unter High Glucose erfolgte auf der Transkriptionsebene. Die Änderung der Genexpression von *ARG2* und *NOS3* verlief dabei in entgegengesetzte Richtungen (*ARG2* ↑, *NOS3* ↓). Von den untersuchten Pflanzenextrakten wurden Ginseng, Ginkgo und Rosskastanie als Arginase-Inhibitoren identifiziert. Granatapfel und Mariendistel steigerten die Arginase-Aktivität, während Olive keinen Effekt hatte. Durch die Kombination der hemmenden Pflanzenextrakte konnte der inhibitorische Effekt der Einzelnextrakte verstärkt werden. Der Zusatz von Olive zu der Pflanzenkombination verstärkte die Hemmung der Enzymaktivität nicht weiter.

Die Hochregulation der endothelialen Expression und Aktivität der Arginase 2 scheint ein Mechanismus zu sein, der die Bildung des gefäßprotektiven NO bei Diabetes mellitus durch Einschränkung der Verfügbarkeit von L-Arginin vermindert. Ausgewählte Pflanzenextrakte können diesen Effekt reduzieren und potentiell in der Prävention früher diabetischer Gefäßfunktionsschädigungen eingesetzt werden.

## **Summary**

Endothelial cells are involved in many physiological processes of the cardiovascular system. One important function is the synthesis of the vasoprotective mediator nitric oxide (NO), which causes vasodilatation. Impaired endothelial function is considered to be the beginning of the pathogenesis of many cardiovascular diseases. In diabetes mellitus, endothelial dysfunction caused by reduced endothelial synthesis of NO is an essential mechanism leading to diabetic vascular damage. Some studies found that the impaired availability of the substrate of NO synthase, L-arginine, underlies reduced NO synthesis. In this regard, various authors reported that there is an alteration in the expression and / or activity of the enzyme arginase in the diabetic vasculature. Arginase hydrolyzes L-arginine to L-ornithine and urea. Therefore, overactive arginase under hyperglycaemic conditions could explain the NO deficit and endothelial dysfunction. The mechanisms leading to increased arginase expression and activity in diabetic blood vessels have not been fully elucidated yet.

In this work, the expression and activity of arginase and its regulation in cultured human endothelial cells under hyperglycaemic conditions were investigated. The immortalized cell line EA.hy926 was used to investigate whether the upregulation of arginase described in the literature occurs at the transcriptional level (mRNA), the translational level (protein) or the functional level (activity). Further, selected plant extracts were used to reduce or prevent the upregulation of arginase under high glucose, as this might be a new approach to prevent early vascular damage in diabetes. In parallel, the effect of arginase upregulation on the expression of endothelial NO synthase was investigated.

It was shown that out of the two known isoforms of arginase (arginase 1 and 2), arginase 2 is the predominant one in EA.hy926 cells. The upregulation of arginase 2 under high glucose occurred at the transcriptional level. We found that regulation of the gene expression of *ARG2* and *NOS3* occurred in opposite directions (*ARG2* ↑, *NOS3* ↓). Among the investigated plant extracts, ginseng, ginkgo, and horse chestnut were identified as arginase inhibitors. Pomegranate and milk thistle increased arginase activity, whereas olive had no effect. The combination of the inhibitory plant extracts enhanced the inhibitory effect of the individual extracts. Adding olive to the plant combination did not further enhance the inhibition of enzyme activity.

The upregulation of endothelial expression and activity of arginase 2 appears to be a mechanism that reduces the formation of vasoprotective NO in diabetes mellitus. Selected plant extracts can reduce this effect and thus might be useful for the prevention of early diabetic vascular dysfunction.

## **Einleitung**

### **1. Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, bei der vorrangig der Kohlenhydratstoffwechsel betroffen ist, in dessen Folge aber auch der Fett- und Eiweißstoffwechsel gestört sein können. Charakteristisch für die Erkrankung ist eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels [1]. Weltweit sind derzeit, bei zunehmender Prävalenz, 573 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt [2]. Nach aktuellen Zahlen des Robert-Koch-Instituts wurde in Deutschland bei 7,2% der Erwachsenen zwischen 18 und 79 Jahren (4,6 Millionen) ein Diabetes diagnostiziert, wobei Typ 2-Diabetes mit 90% der am häufigsten vorkommende Diabetes-Typ ist [3].

#### **1.1. Klassifikation**

Je nach Ätiologie der Erkrankung werden verschiedene Diabetes-Typen unterschieden. Alle Krankheitsformen haben eine chronische Hyperglykämie gemeinsam, welche auf eine nicht ausreichende Insulinproduktion und / oder auf eine mangelnde Insulinwirkung zurückzuführen ist.

##### **Typ 1-Diabetes**

Typ 1-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, bei der die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas allmählich zerstört werden. Der daraus resultierende absolute Insulinmangel erfordert eine lebenslange Insulinsubstitution der betroffenen Personen. Da die Erkrankung meist im Kindes- und Jugendalter auftritt, wird sie auch als „juveniler Diabetes“ bezeichnet [4], [5].

##### **Typ 2-Diabetes**

Typ 2-Diabetes ist durch einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet, welcher auf einer Störung der Inselzellfunktion und / oder einer Resistenz der Zielzellen auf das freigesetzte Insulin beruht. Da die Erkrankung meist im Erwachsenenalter auftritt, wird diese auch als „Altersdiabetes“ bezeichnet. 80% der an Typ 2-Diabetes erkrankten Personen sind übergewichtig [4], [5].

##### **Sonstige Diabetes-Typen**

In diese Kategorie fallen Diabetes-Typen, deren Entstehung auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden kann. Hierzu gehören Diabetes-Typen, welche infolge von Erkrankungen des exokrinen Pankreas oder aus Endokrinopathien und Infektionen entstanden sind. Weitere Krankheitsformen dieser Gruppe sind medikamentös-chemisch induzierter Diabetes und seltene Formen eines autoimmunvermittelten Diabetes. Andere Ursachen sind genetische Defekte der  $\beta$ -Zell-Funktion, der Insulinwirkung und andere genetische Syndrome [5].

##### **Gestationsdiabetes**

Ein Gestationsdiabetes (Schwangerschaftsdiabetes) liegt vor, wenn eine Störung der Glucoseverwertung erstmals in der Schwangerschaft diagnostiziert wird [5]. In Deutschland tritt dieser Diabetes-Typ bei bis zu 6% aller Schwangerschaften auf [6].

## 1.2. Spätkomplikationen des Diabetes mellitus

Nicht selten führt ein Diabetes zu Folgeerkrankungen. Diese werden als „diabetische Sekundärerkrankungen“ bezeichnet und basieren auf makro- oder mikroangiopathischen Veränderungen der arteriellen Blutgefäße. Zu den Makroangiopathien, welche für Typ 2-Diabetes typisch sind, gehören die koronare Herzkrankheit (KHK), mit der Folge der chronischen Herzinsuffizienz, zerebrale Durchblutungsstörungen und die periphere arterielle Verschlusskrankung (pAVK). Mikroskopische Gefäßschädigungen (Glomerulosklerose, Retinopathien und Neuropathien) treten vorrangig bei Typ 1-Diabetes auf und sind durch eine Verdickung der kapillären Basalmembran gekennzeichnet [1]. Die aus einer Diabetes-Erkrankung folgende Gefäßschädigung wird mit einer Funktionsveränderung beziehungsweise einem Funktionsverlust des Gefäßendothels in Verbindung gebracht. Hierzu gehören Veränderungen der Gefäßweitstellung (Vasodilatation/ Vasokonstriktion), eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Aktivierung von inflammatorischen Prozessen und eine Veränderung der Barrierefunktion des Endothels [7].

## 2. Endothel

### 2.1. Morphologie

Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel, welches das Lumen von Blut- und Lymphgefäßen auskleidet. Je nach Körperregion sind die Zellen des Endothels stärker (z.B. Gehirn) oder weniger stark verknüpft beziehungsweise abgedichtet und somit mehr oder weniger permeabel für Moleküle unterschiedlicher Größe [8]. Die einzelnen Endothelzellen sind länglich polygonal mit einem Längsdurchmesser von 25 bis 50 µm und einem Querdurchmesser von etwa 10 bis 20 µm. Über Zonulae occludentes (Tight Junctions), Nexus (Gap Junctions) und Adhärens-Kontakte sind Endothelzellen miteinander verbunden. Die apikale Oberfläche trägt ein bis zu 500 nm dickes Glykokalyx mit vielen Negativladungen, welches zur selektiven Permeabilität des Endothels beiträgt. Über kleine Gap Junctions ist das Endothel mit den innersten Muskelzellen der Media verknüpft [9], [10].

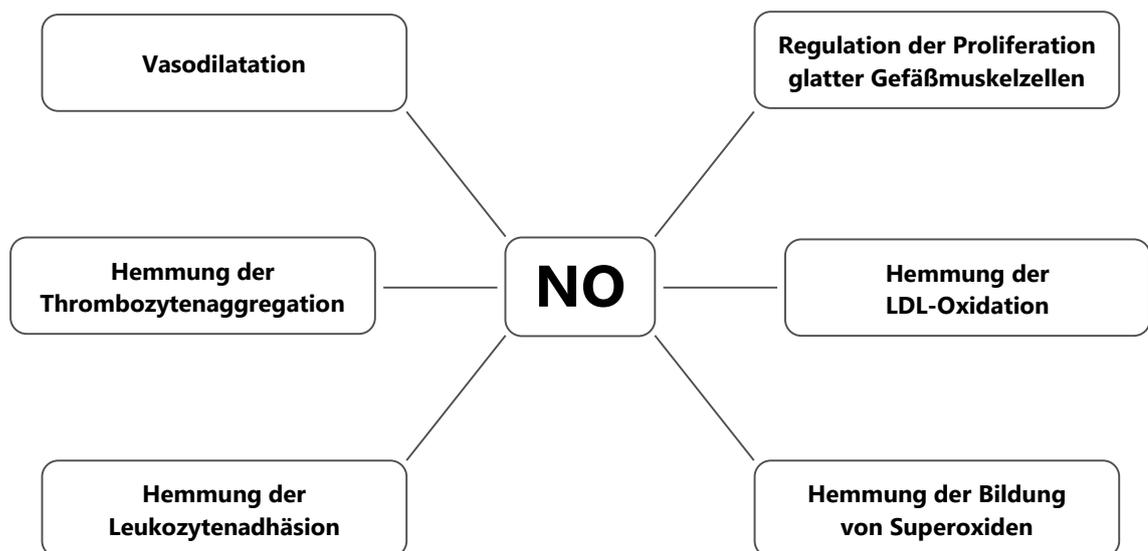
### 2.2. Funktion

Die Funktionen des Endothels, welche über zirkulierende Hormone, Gewebshormone und mechanische Einflüsse gesteuert werden, sind vielseitig. Zu der Hauptfunktion des Endothels gehört die Regelung des Gas- und Stoffaustauschs zwischen Blut und Gewebe als Diffusionsbarriere. Eine weitere wichtige Funktion ist die Modulation der Gefäßweite, welche durch die Bildung von Vasokonstriktoren (Endothelin) und Vasodilatoren (Stickstoffmonoxid, Prostacyclin) bewirkt wird. Durch die Bildung von wachstumsstimulierenden Faktoren, wie die des *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) und des *Fibroblast Growth Factor* (FGF), reguliert das Endothel das Wachstum von Zellen. Weiter ist es durch die Bildung von Interleukinen und Adhäsions- und Histokompatibilitätsmolekülen an Entzündungsprozessen beteiligt und ein wichtiger Regulator der Leukozytenmigration. Das Endothel reguliert pro- und antikoagulatorische Prozesse, in dem es Prostacyclin (Hemmung der Thrombozytenaggregation) und

den von-Willebrand-Faktor (Förderung der Thrombozytenadhäsion) sezerniert. Zudem bildet es Matrixkomponenten (Kollagen IV, Proteoglykane, Laminin) und ist am Abbau von Blutfetten beteiligt [9], [10].

### 2.3. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines gasförmiges Radikal, welches in Konzentrationen von 10 bis 100 nM biologisch aktiv ist. Das sehr instabile Molekül wird durch den Kontakt mit Sauerstoff innerhalb weniger Sekunden zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oxidiert. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von 3 bis 5 s ist die Wirkung von NO nur auf das umgebende Gewebe begrenzt [11]. Es ist als wichtiges Signalmolekül an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt und im kardiovaskulären System für die vaskuläre Homöostase unentbehrlich (s. Abbildung 1). Zu den Hauptfunktionen von NO gehören die Regulation der Gefäßweite und des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen, die Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Oxidation von Blutfetten (*Low Density Lipoprotein*, LDL) und der Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand. Zudem verhindert es als Antioxidans die Bildung von Superoxiden [12], [13].



**Abbildung 1: Physiologische Funktionen von Stickstoffmonoxid im kardiovaskulären System.** Zu den Funktionen von Stickstoffmonoxid (NO) zählen die Regulation der Gefäßweite und des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen. Zudem hemmt es die Aggregation von Thrombozyten, die Oxidation von Blutfetten (*Low Density Lipoprotein*, LDL) und die Leukozytenadhäsion. Weiter inhibiert es als Antioxidans die Bildung von Superoxiden.

Wie viele der physiologischen Effekte von NO, wird auch dessen vasodilatierende Wirkung durch den second Messenger cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt. Diese beruht auf der Aktivierung der im Zytosol vorkommenden löslichen Guanylylcyclase (*soluble guanylate cyclase*, sGC) durch NO [4]. Nach der Aktivierung der sGC wird vermehrt cGMP aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet. Die durch cGMP aktivierte Proteinkinase G (PKG) führt anschließend über drei Hauptwege zu der Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen und somit zur Vasodilatation (s. Abbildung 2):

- **Myosinphosphatase**

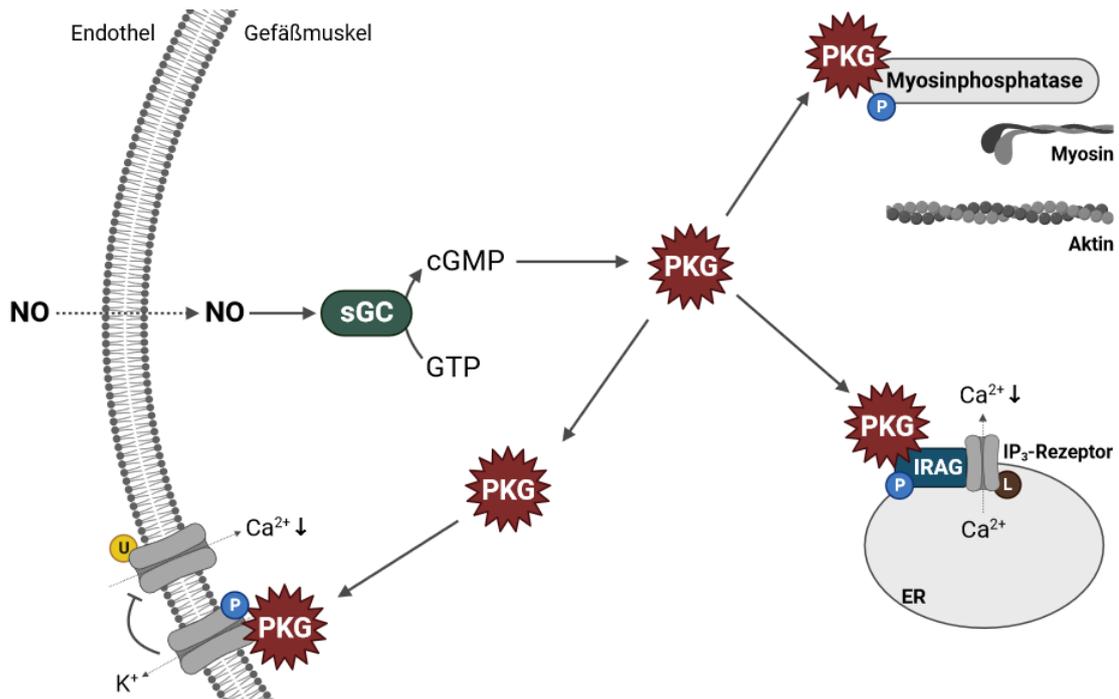
Die Aktivierung der Myosinphosphatase durch PKG führt zur Dephosphorylierung der Myosinköpfe und damit zur einer verminderten Interaktion zwischen Aktin und Myosin.

- **IP<sub>3</sub>-Rezeptor assoziiertes PGK-Substrat (IRAG)**

Die Phosphorylierung des Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>)-Rezeptor assoziierten PGK-Substrats (IRAG) hemmt die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum.

- **K<sup>+</sup>-Kanäle**

Die Phosphorylierung von K<sup>+</sup>-Kanälen durch PKG führt zu deren Aktivierung und Ausstrom von K<sup>+</sup>-Ionen. Durch die daraus resultierende Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle wird die Öffnungswahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle reduziert und der Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen herabgesetzt.



**Abbildung 2: Hauptwege der durch Stickstoffmonoxid vermittelten Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen** (nach [4]). Nach Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (*soluble guanylate cyclase*, sGC) durch Stickstoffmonoxid (NO) wird vermehrt cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) gebildet. cGMP aktiviert die Proteinkinase G (PKG), welche durch Phosphorylierung der Myosinphosphatase die Interaktion von Myosin und Aktin inhibiert. Die Phosphorylierung des Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>)-Rezeptor assoziierten PGK-Substrats (IRAG) und die Phosphorylierung von K<sup>+</sup>-Kanälen führen zu einem Absinken der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und dadurch zu einer Vasodilatation. ER: Endoplasmatisches Retikulum, L: Liganden-abhängiger Ionenkanal, P: Phosphatgruppe, U: Spannungsabhängiger Ionen-Kanal (Abbildung erstellt mit BioRender.com)

Die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin wird von der Enzymfamilie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) katalysiert (s. Einleitung, Kapitel 3.3).

## 2.4. Endotheliale Dysfunktion und Diabetes mellitus

Das intakte Endothel ist an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt (s. Einleitung, Kapitel 2.2). Eine Störung der Endothelfunktion wird als „endotheliale Dysfunktion“ bezeichnet. Ihre Entwicklung wird durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt (s. Abbildung 3). Zu diesen zählen Hypertonie, Hyperglykämie und Hypercholesterinämie, Rauchen, das Alter und genetische Faktoren. Diese Risikofaktoren führen zu einem Funktionsverlust des Endothels und daraus resultierend vermehrt zu Entzündungsprozessen, Thrombosen, Plaquebildungen und Plaquerupturen. Zudem wird die Entstehung vaskulärer Läsionen, Remodellierungsprozessen und die Konstriktion der Blutgefäße



Chronische Hyperglykämie verursacht eine vermehrte mitochondriale  $O_2^-$ -Produktion, aus welcher die Hemmung des in der Glykolyse aktiven Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) folgt. Durch die sich anhäufenden Metabolite werden weitere Stoffwechselwege aktiviert, die den oxidativen Stress in der Zelle weiter fördern [7], [17]. Des Weiteren führen Hyperinsulinämie und eine Insulinresistenz zu einer verstärkten Bildung des vasokonstriktorischen Endothelin-1, während das vasodilatatorisch wirkende NO weniger gebildet wird [18]. Die daraus resultierende Störung der Endothelfunktion (s. Tabelle 1) fördert die Entstehung der kardiovaskulären Spätfolgen des Diabetes mellitus.

Tabelle 1: Mit Diabetes mellitus assoziierte Störungen der Endothelfunktion (nach [7]).

<b>Strukturelle Veränderungen</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Zunahme der Dicke der Basalmembran</li><li>- Abnahme der Glykokalyx</li><li>- Gestörte Vernetzung der extrazellulären Matrix</li></ul>
<b>Dysbalance der die Gefäßweite modulierenden Faktoren</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Vasodilatation: NO ↓</li><li>- Vasokonstriktion: Endothelin-1 ↑</li></ul>
<b>Förderung proinflammatorischer Prozesse</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Expression von Zelladhäsionsmolekülen ↑</li><li>- Leukozytenadhäsion ↑</li><li>- Entzündungsmediatoren ↑</li></ul>
<b>Veränderung der Hämostase</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Thrombomodulin ↓</li><li>- von-Willebrand-Faktor ↑</li><li>- Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 ↑</li></ul>

NO: Stickstoffmonoxid

### 3. L-Arginin-Metabolismus

Der Aminosäure L-Arginin und deren Metabolismus wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion zugewiesen, da L-Arginin als Ausgangsmolekül für die Synthese des vasoprotektiven NO notwendig ist.

#### 3.1. L-Arginin

L-Arginin (2-Amino-5-guanidinopentansäure) ist eine basisch reagierende Aminosäure, die eine Guanidinium-Gruppe als Seitenkette trägt (s. Abbildung 5). Sie wird als bedingt-essentiell eingestuft, da der Bedarf unter physiologischen Bedingungen durch de novo-Synthese und Proteolyse gedeckt werden kann, in Stresssituationen oder bei bestimmten Krankheitsbildern L-Arginin aber von außen zugeführt werden muss, um den erhöhten Bedarf zu decken [19].

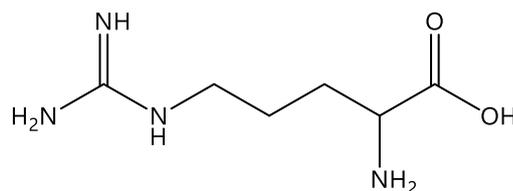
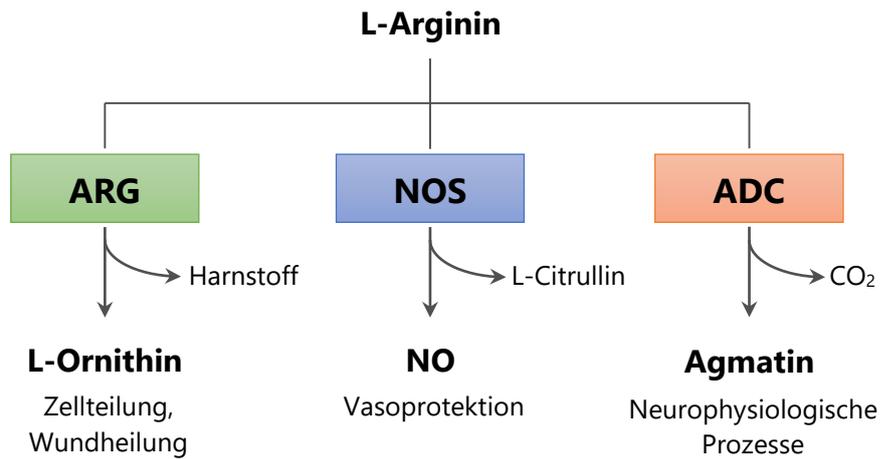


Abbildung 5: Strukturformel von L-Arginin. Die funktionelle Gruppe der basischen Aminosäure ist eine Guanidinium-Gruppe.

Die physiologische Bedeutung von L-Arginin ist vielseitig, da es das Ausgangsmolekül vieler Verbindungen und dadurch an diversen Stoffwechselprozessen beteiligt ist. Allgemein wird L-Arginin über drei Hauptwege metabolisiert (s. Abbildung 6).

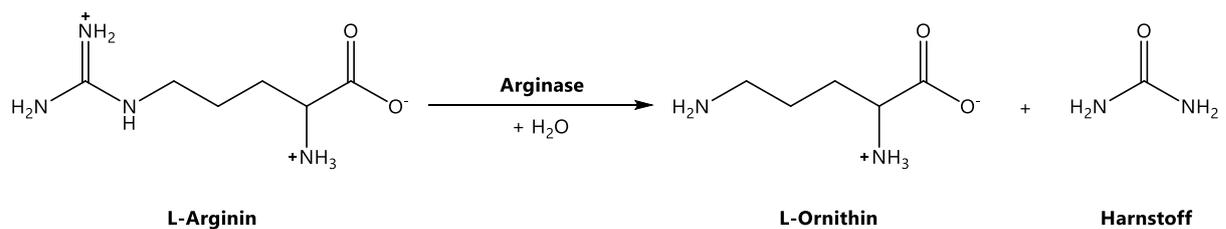


**Abbildung 6: Hauptwege des L-Arginin-Metabolismus.** Das Enzym Arginase (ARG) katalysiert die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) baut L-Arginin zu Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin ab. Die Decarboxylierung von L-Arginin durch das Enzym Arginindecarboxylase (ADC) führt zu Agmatin.

Durch das Enzym Arginase wird L-Arginin in den Mitochondrien und im Zytosol zu L-Ornithin hydrolysiert, welches unter anderem für die Zellteilung und die Kollagensynthese bedeutend ist. Des Weiteren bildet die Familie der NOS-Enzyme im Zytosol aus L-Arginin das Signalmolekül NO. In den Mitochondrien entsteht durch Decarboxylierung von L-Arginin das biogene Amin Agmatin, welches für neurophysiologische Prozesse notwendig ist. Die Reaktion wird durch das Enzym Arginindecarboxylase (ADC) katalysiert [20], [21].

### 3.2. Arginase

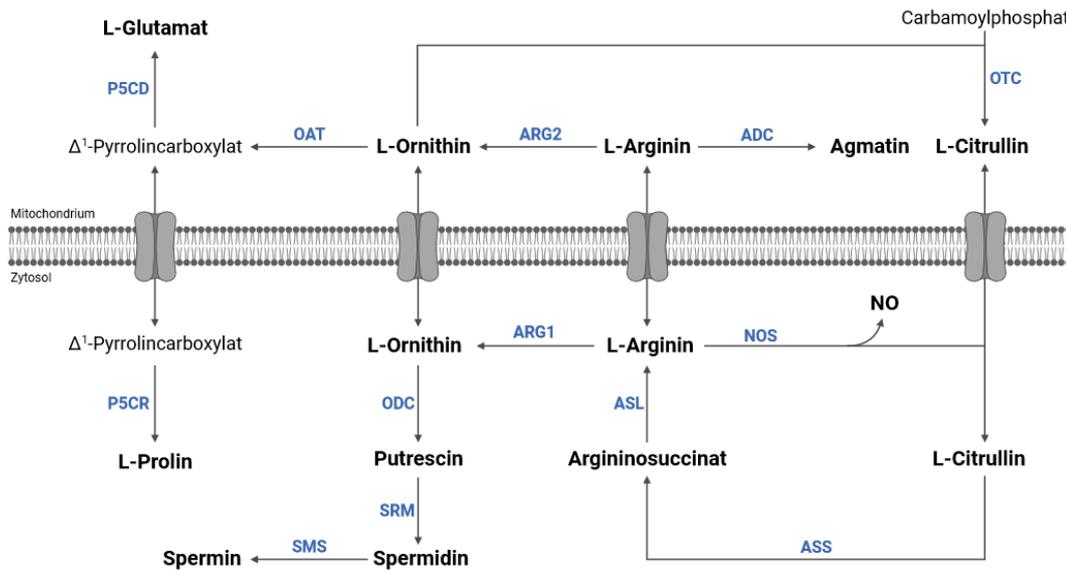
Das Enzym Arginase (EC 3.5.3.1) gehört zur Enzymklasse der Hydrolasen und katalysiert als solche die Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff (s. Abbildung 7) [22]. Die Reaktion findet im Zytosol und im Mitochondrium statt. In Abhängigkeit des Reaktionsorts sind zwei unterschiedliche Isoformen an der Reaktion beteiligt. Diese werden am Ende dieses Unterkapitels näher beschrieben.



**Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff.** Die Reaktion wird durch das Enzym Arginase katalysiert.

Das bei der Hydrolyse von L-Arginin gebildete L-Ornithin wird in unterschiedlichen Folgereaktionen umgesetzt (s. Abbildung 8). Das Enzym Ornithindecarboxylase (ODC) baut das im Zytosol gebildete L-Ornithin zu Putrescin ab. Dieses ist die Vorstufe der Polyamine Spermidin und Spermin, welche für die Regulation der Zellteilung von großer Bedeutung sind. Das in den Mitochondrien gebildete L-Ornithin ist das Substrat der Ornithinaminotransferase (OAT). Das gebildete  $\Delta^1$ -Pyrrolinecarboxylat wird in den Mitochondrien zu L-Glutamat, dem Vorläufermolekül des Neurotransmitters  $\gamma$ -Aminobuttersäure

(GABA), umgesetzt. Im Zytosol dient  $\Delta^1$ -Pyrrolinecarboxylat wiederum der Bildung von L-Prolin, welches für die Kollagensynthese und die Wundheilung relevant ist [20], [21].



**Abbildung 8: L-Arginin-Metabolismus** (nach [23], [24]). L-Arginin wird in den Mitochondrien durch Arginase 2 (ARG2), im Zytosol durch Arginase 1 (ARG1) zu L-Ornithin hydrolysiert. In den Mitochondrien wird L-Ornithin durch die Ornithinaminotransferase (OAT) zu  $\Delta^1$ -Pyrrolinecarboxylat umgesetzt. Dieses ist in den Mitochondrien das Vorläufermolekül von L-Glutamat. Im Zytosol wird ausgehend von  $\Delta^1$ -Pyrrolinecarboxylat L-Prolin gebildet. Das im Zytosol entstandene L-Ornithin wird durch die Ornithindecaboxylase (ODC) zu Putrescin und in Folgeaktionen zu den Polyaminen Spermidin und Spermin abgebaut. ADC: Arginindecarboxylase, ASL: Argininosuccinat-Lyase, ASS: Argininosuccinat-Synthetase, NO: Stickstoffmonoxid, NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase, OTC: Ornithin-Transcarbamylase, P5CD: Pyrrolin-5-carboxylat-Dehydrogenase, P5CR: Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase, SMS: Spermin-Synthase, SRM: Spermidin-Synthase (Abbildung erstellt mit BioRender.com)

In Abhängigkeit des Reaktionsorts wird die Hydrolyse von L-Arginin von zwei unterschiedlichen Arginase-Isoformen katalysiert. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Eigenschaften der Arginase-Isoformen.

Isoform	Arginase 1 (Arg1)	Arginase 2 (Arg2)
Aminosäuresequenz	322 Aminosäuren	354 Aminosäuren
Größe	105 kDa	129 kDa
Zellkompartiment	Zytosol	Mitochondrium
Vorkommen im Körper	Leber	Niere
	Endothelzellen, Erythrozyten glatte Gefäßmuskulatur	Prostata, Magen-Darm-Trakt, glatte Gefäßmuskulatur
Funktion	Harnstoffzyklus (Abbau von Ammoniak)	Synthese von L-Ornithin (Polyamine, L-Prolin, L-Glutamat)

**Arginase 1** (Arg1) ist ein zytosolisches Enzym, welches hauptsächlich in der Leber exprimiert wird. Sie wurde aber auch in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Erythrozyten nachgewiesen. Als Leberenzym ist sie maßgeblich am Abbau von Ammoniak beteiligt. Dort katalysiert sie die finale Reaktion des Harnstoffzyklus [25].

**Arginase 2** (Arg2) ist ein mitochondriales Enzym und ubiquitär exprimiert. Sie kommt hauptsächlich in der Niere, aber auch in Prostata, im Gastrointestinal-Trakt (GIT) und in der glatten Gefäßmuskulatur vor.

Ihre Hauptfunktion ist die Synthese von L-Ornithin, welches das Edukt für die Synthese der Polyamine, L-Prolin und L-Glutamat ist. Somit ist Arg2 an physiologischen Prozessen der Zellteilung, Kollagen- und GABA-Synthese beteiligt [25], [26].

Die Signalsequenz, welche für die Lokalisierung von Arg2 in die Mitochondrien benötigt wird, erklärt die unterschiedliche Länge der Aminosäuresequenzen der beiden Isoformen. Diese ist für Arg1 322 und für Arg2 354 Aminosäuren lang. Die Aminosäureseitenketten der beiden Isoformen stimmen zu 60% miteinander überein. Die Übereinstimmung in den aktiven Zentren beträgt 100% [27]. Hochauflösende kristallographische Strukturanalysen zeigten, dass Arg1 und Arg2 Homotrimere sind. Das aktive Zentrum befindet sich jeweils am unteren Ende eines 15 Å großen Spalts. Für die Aktivität des Enzyms ist die Bindung von Mangan-Ionen ( $Mn^{2+}$ ) am aktiven Zentrum notwendig [28].

### 3.3. Stickstoffmonoxid-Synthase

Das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (EC 1.14.13.39) ist eine Oxidoreduktase und katalysiert die Reaktion von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin und NO (s. Abbildung 9) [20], [22].

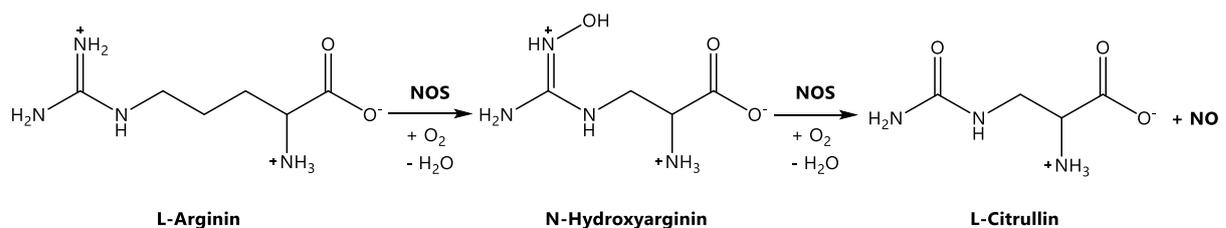


Abbildung 9: Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO). Die Reaktion wird von der Oxidoreduktase Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) unter Verbrauch von Sauerstoff katalysiert.

Es sind drei Isoformen bekannt. Diese sind nach den jeweiligen Zelltypen benannt, in denen sie zuerst entdeckt wurden (s. Tabelle 3) [29].

Die **neuronalen NOS** (nNOS, NOS1) wird konstitutiv in Neuronen des zentralen (ZNS) und peripheren (PNS) Nervensystems exprimiert. Im ZNS ist sie an der synaptischen Plastizität (Langzeitpotenzierung, Langzeithemmung) beteiligt, welche für die Gedächtnisbildung und für Lernvorgänge wichtig ist. Ein weiterer Prozess, bei dem nNOS eine Rolle spielt, ist die zentrale Blutdruckregulation. Im PNS wirkt das von nNOS synthetisierte NO als atypischer Neurotransmitter und als solcher relaxierend auf Darm, Blutgefäße und den Schwellkörper.

Die Expression der **induzierbaren NOS** (iNOS, NOS2) wird durch inflammatorische Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) ausgelöst. Obwohl erstmals in Makrophagen identifiziert, kann die Expression des Enzyms in jeder Zelle beziehungsweise in jedem Gewebe stimuliert werden. Es werden große Mengen an NO hergestellt, die die zytotoxischen und zytostatischen Effekte auf parasitäre Mikroorganismen vermitteln. Weiter ist das von iNOS synthetisierte NO an Prozessen bei entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel Vasodilatation und Blutdruckabfall beim septischen Schock, beteiligt.

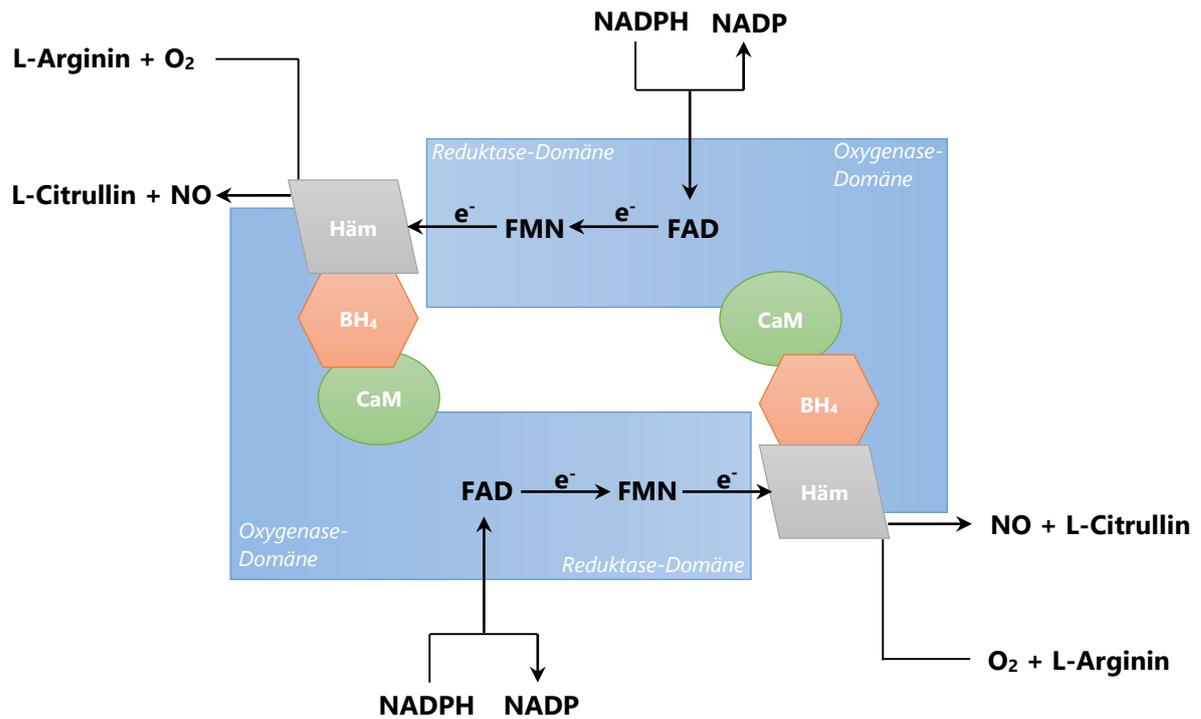
Die **endotheliale NOS** (eNOS, NOS3) wird vorrangig in Endothelzellen exprimiert. Sie wurde jedoch auch in Herzmuskelzellen, Thrombozyten und bestimmten Neuronen des Gehirns nachgewiesen. Das von eNOS gebildete NO ist ein vasoprotektives Signalmolekül, welches unter anderem die Relaxation von Blutgefäßen auslöst und für die physiologische Funktion des Endothels unabdinglich ist (s. Einleitung, Kapitel 2.3).

Tabelle 3: Eigenschaften der Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen.

Isoform	nNOS (NOS1) „neuronal“	iNOS (NOS2) „induzierbar“	eNOS (NOS3) „endothelial“
Expression	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
	Neuronen (ZNS, PNS)	Auslöser: LPS, Cytokine	Endothelzellen
Produzierte NO-Menge	Niedrig	Hoch	Niedrig
Aktivierung/ Regulierung	Ca <sup>2+</sup> abhängig	Ca <sup>2+</sup> unabhängig	Ca <sup>2+</sup> abhängig
Funktion	<u>ZNS</u> – Synaptische Plastizität – Regulation des Blutdrucks	<u>Unspezifische Immunabwehr</u> – Entzündungen – Septischer Schock	<u>Physiologische Endothelfunktion</u> – Vasodilatation – Vasoprotektion – Anti-atherosklerotisch
	<u>PNS</u> – Atypischer Neurotransmitter (Relaxation)		

eNOS: endotheliale NO-Synthase, iNOS: induzierbare NO-Synthase, LPS: Lipopolysaccharide, nNOS: neuronale NO-Synthase, NO: Stickstoffmonoxid, PNS: peripheres Nervensystem, ZNS: zentrales Nervensystem

Alle NOS-Isoformen sind Homodimere. Ihre Monomere bestehen jeweils aus einer Oxygenase- und einer Reduktase-Einheit. Das funktionelle Homodimer entsteht nach der Bindung von Calmodulin (CaM) an die Monomere und der daraus resultierenden Änderung der Proteinkonformation. Während die konstitutiv exprimierten Isoformen nNOS und eNOS für die Bindung von CaM einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (200 bis 400 nM) benötigen, bindet iNOS CaM bereits bei niedrigeren Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen (< 40 nM). Die Bildung des Homodimers ermöglicht den Elektronentransfer zwischen den Monomeren. Es erfolgt die Übertragung der Elektronen von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADP/ NADPH) über Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) der C-terminalen Reduktase-Domäne des einen Monomers auf die Häm-Gruppe der N-terminalen Oxygenase-Domäne des anderen Monomers. Sind (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und L-Arginin in ausreichender Menge vorhanden, werden beide Substanzen von der Häm-Gruppe der Oxygenase-Domäne gebunden und molekularer Sauerstoff reduziert. In dieser zweistufigen Oxidation wird L-Arginin über N-Hydroxyarginin zu L-Citrullin und NO oxidiert (s. Abbildung 10) [29]. Der Co-Faktor BH<sub>4</sub> ist für die NOS-Aktivität essentiell, da dieser die für die Reduktion des Sauerstoffs benötigten Elektronen liefert und die Dimerisierung der NOS-Monomere stabilisiert [23].



**Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)** (nach [30]). Das funktionelle Homodimer entsteht nach der Bindung von Calmodulin (CaM). In einer zweistufigen Oxidationsreaktion wird L-Arginin zu L-Citrullin und NO oxidiert. Dabei werden Elektronen von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADP/ NADPH) über Flavinadeninucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) der C-terminalen Reduktase-Domäne des einen Monomers auf die Häm-Gruppe der N-terminalen Oxygenase-Domäne des anderen Monomers übertragen. Für die Reaktion werden CaM und (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) als Co-Faktoren benötigt.

### 3.4. Pathophysiologische Bedeutung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels

Zahlreiche Erkrankungen werden mit einer Störung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels in Verbindung gebracht, da durch die reduzierte Verfügbarkeit von NO die Endothelfunktion beeinträchtigt ist [29]. So ist auch bei Diabetes mellitus die reduzierte NO-Synthese ein wesentlicher Mechanismus der frühen Störung der vaskulären Funktion, aus welcher sich langfristig die bereits genannten chronischen Gefäßschädigungen entwickeln (s. Einleitung, Kapitel 1.2). In verschiedenen Studien wurde versucht, das vorhandene NO-Defizit durch Supplementierung von L-Arginin auszugleichen. Während im Tiermodell die positiven Effekte der Substrat-Supplementierung aufgezeigt werden konnten, waren die Ergebnisse in klinischen Studien mit unterschiedlichen Patientenkollektiven widersprüchlich, sodass ein reiner Substratmangel nicht die Ursache für die verminderte NO-Verfügbarkeit zu sein scheint [31], [32]. Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  von eNOS beträgt 3  $\mu\text{M}$ , sodass das Enzym bei einer intrazellulären L-Arginin-Konzentration zwischen 100 und 800  $\mu\text{M}$  gesättigt vorliegen und eine Supplementierung keinen Effekt haben sollte [21]. Die Beobachtung, dass die von NO vermittelten Prozesse dadurch dennoch beeinflusst werden, wird als „L-Arginin-Paradoxon“ bezeichnet [33].

### **L-Arginin-Paradoxon**

Es gibt unterschiedliche Theorien, die versuchen die Mechanismen hinter diesem Phänomen und der Ursache des lokalen L-Arginin-Mangels zu erklären.

#### **Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)**

Eine mögliche Erklärung basiert auf der intrazellulären Akkumulation von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), einem endogenen NOS-Inhibitor [34]. Dieses wird bei der Übertragung von Methylgruppen auf L-Arginin-Seitenketten von Proteinen und Polypeptiden durch N-Methyltransferasen gebildet und durch Proteolyse freigesetzt. In der Zelle konkurriert ADMA mit L-Arginin als kompetitiver Inhibitor um die Substratbindungsstelle der NOS. Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten ADMA-Konzentration und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen gilt als erwiesen [35], sodass ADMA durch NOS-Inhibierung zu dem lokalen NO-Defizit beitragen könnte.

#### **Cationic Amino Acid Transporter-1 (CAT-1)**

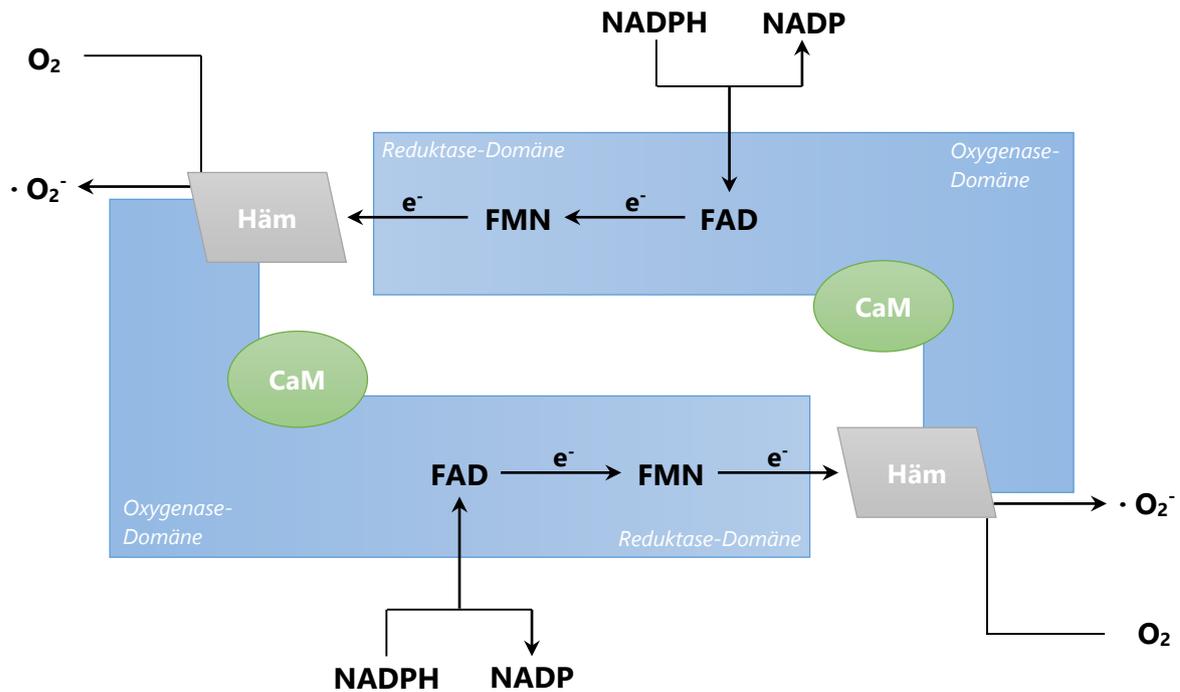
Eine andere Theorie erklärt den intrazellulären L-Arginin-Mangel durch eine gestörte intrazelluläre Aufnahme von L-Arginin durch den *Cationic Amino Acid Transporter-1* (CAT-1). Der lokale Mangel an L-Arginin entstünde durch eine reduzierte Expression und / oder Veränderung der Funktion des Transporters, sowie durch eine Erhöhung der Konzentration von konkurrierenden Verbindungen (z.B. L-Ornithin) [33].

#### **Arginase**

Eine weitere Theorie basiert auf dem Enzym Arginase. Ein gesteigerter Abbau von L-Arginin durch die Arginase würde die reduzierte Verfügbarkeit der Aminosäure erklären. Zwar ist die Affinität von L-Arginin für NOS um das 1000-fache größer als die Affinität für Arginase ( $K_m(\text{Arg}) = 2 \text{ mM}$ ,  $K_m(\text{eNOS}) = 3 \mu\text{M}$ ), allerdings wird L-Arginin um das 1000-fache schneller von der Arginase umgesetzt, sodass eine Konkurrenz der beiden Enzyme um das Substrat durchaus möglich wäre. Tatsächlich wurde in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Arginase-Aktivität und einer Veränderung der NO-Produktion beobachtet [25], [26], [33].

### **eNOS-Entkopplung**

Die reduzierte Verfügbarkeit von L-Arginin führt zu einem Funktionsverlust der NOS („Entkopplung“) (s. Abbildung 11). Bei der Übertragung von Elektronen auf den molekularen Sauerstoff wird in diesem Fall das reaktive  $\text{O}_2^-$  gebildet, welches wiederum mit dem weniger synthetisierten NO zu dem toxischen  $\text{ONOO}^-$  reagiert und zusammen mit anderen ROS zu erheblichen Schäden in den Zellen führen kann [4].  $\text{O}_2^-$  und  $\text{ONOO}^-$  sind zudem in der Lage  $\text{BH}_4$  zu  $\text{BH}_2$  zu oxidieren. Durch den Mangel an Co-Faktoren wird der Funktionsverlust des Enzyms zusätzlich gefördert [36].



**Abbildung 11: Funktionsverlust der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) („Entkopplung“)** (nach [32]). Intrazelluläre pathophysiologische Veränderungen führen zu einem Funktionsverlust der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). Bei dem als „Entkopplung“ bezeichneten Prozess wird bei der Elektronenübertragung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphats (NADP/ NADPH) über Flavinadenindinucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) auf molekularen Sauerstoff vermehrt  $\text{O}_2^-$  und weniger NO gebildet. Dies führt zu einem Anstieg des oxidativen Stresses in der Zelle.

### **Arginase und Diabetes mellitus**

Eine Diabetes-Erkrankung ist von einer Vielzahl von Gefäßpathologien begleitet, welche das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen erhöhen (s. Einleitung, Kapitel 1.2). Eine Veränderung der Expression und / oder Aktivität der Arginase wurde bei vielen Krankheitsbildern beobachtet, so auch in Studien mit diabetischen Patienten und in diabetischen Tier- und Zellmodellen [33]. Es besteht die Hypothese, dass die Ursache der Dysfunktion des diabetischen Endothels in einem Anstieg der Arginase-Aktivität und der dadurch verminderten NO-Bildung liegt. Zusammen mit dem Funktionsverlust der eNOS und dem damit verbundenen Anstieg des intrazellulären oxidativen Stresses wird die Entstehung von Gefäßschäden begünstigt. Welche Mechanismen zum Anstieg der Arginase im diabetischen Gewebe führen, ist noch nicht vollständig geklärt [26].

## **4. Phytotherapie**

### **4.1. Definition**

Gemäß der *European Scientific Cooperative on Phytotherapy* (ESCOP) ist die Phytotherapie die „wissenschaftlich begründete medizinische Verwendung von Pflanzen und aus ihnen gewonnenen Zubereitungen zur Behandlung, Linderung und / oder Vorbeugung von Krankheiten oder Verletzungen nach anerkannten Standards für Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit“ [37]. Das deutsche Arzneimittelgesetz (AMG) definiert pflanzliche Arzneimittel als „Arzneimittel, die als Wirkstoff ausschließlich einen oder mehrere pflanzliche Stoffe oder eine oder mehrere pflanzliche Zubereitungen oder eine oder mehrere solcher pflanzlichen Stoffe in Kombination mit einer oder mehreren solcher pflanzlichen Zubereitungen enthalten“ (AMG §4 Abs. 29). Der Begriff „Droge“ bezeichnet dabei die getrocknete Arzneipflanze beziehungsweise die getrockneten Pflanzenteile [38]. Die verwendeten Zubereitungen werden „Phytopharmaka“ oder „Phytotherapeutika“ genannt. Hierzu gehören Rohdrogen, Extrakte oder Spezialextrakte sowie die zugehörigen Zubereitungsformen (Tabletten, Tropfen, etc.). Wirkstoffe, die aus Arzneipflanzen isoliert und als Reinsubstanz eingesetzt werden, gehören definitionsgemäß nicht mehr zur Phytotherapie [39]. Bei der Anwendung wird zwischen traditionellen und rationalen Phytotherapeutika unterschieden. Während traditionelle Phytotherapeutika basierend auf den Erfahrungen der langjährigen Anwendung eingesetzt werden (Erfahrungsmedizin), beruht die Anwendung von rationalen Phytotherapeutika auf klinischen Daten [40].

### **4.2. Klassifizierung der Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen**

Pflanzliche Drogen und ihre Zubereitungen enthalten als Vielstoffgemische diverse Verbindungen des Primär- und Sekundärstoffwechsels einer Arzneipflanze. Der Primärstoffwechsel dient der Aufrechterhaltung der Lebensfunktion der Pflanze. Die darin gebildeten Verbindungen werden nur teilweise pharmakologisch genutzt. Hierzu gehören Monosaccharide, Fettsäuren und Aminosäuren. Für die therapeutische Anwendung bedeutender sind die Verbindungen des Sekundärstoffwechsels [41]. Sekundärstoffe sind niedermolekulare Verbindungen, die von einer Pflanze gebildet werden, um diese beispielsweise vor Mikroorganismen und UV-Strahlen zu schützen oder um bestäubende beziehungsweise samenverbreitende Tieren anzulocken. Die inhaltliche Zusammensetzung von pflanzlichen Drogen und den Pflanzenzubereitungen unterliegt einer natürlichen Schwankung und ist stark abhängig vom Ausgangsmaterial, dem Extraktionsmittel und des Herstellungsverfahrens, welches angewendet wird [42]. Zur Standardisierung und Beurteilung der pharmazeutischen Qualität einer pflanzlichen Zubereitung werden die Inhaltsstoffe allgemein kategorisiert (s. Tabelle 4) [40].

**Tabelle 4: Klassifizierung der Inhaltsstoffe in der Phytotherapie.** Phytopharmaka sind Vielstoffgemische. Ihre Inhaltsstoffe werden zwecks Qualitätsbeurteilung und Standardisierung in verschiedene Klassen unterteilt [40], [43].

<b>Klasse</b>	<b>Funktion</b>
<b>Hauptwirkstoffe</b> Wirksamkeitsbestimmend	Inhaltsstoffe, welche (eindeutig) alleine für die klinische Wirksamkeit verantwortlich sind („Effektoren“). Sie haben im isolierten Zustand den gleichen oder ähnlichen therapeutischen Effekt wie der Gesamtextrakt.
<b>Wirkstoffe/ Nebenwirkstoffe</b> Pharmazeutisch relevante Inhaltsstoffe	Inhaltstoffe mit wirksamkeitsmitbestimmenden Charakter. Sie haben im isolierten Zustand nicht den gleichen oder ähnlichen therapeutischen Effekt wie der Gesamtextrakt, sind aber für die Gesamtwirkung mitverantwortlich.
<b>Begleitstoffe</b>	Inhaltsstoffe, die nicht direkt zur pharmakodynamischen Wirkung beitragen, die Pharmakokinetik der Wirkstoffe aber (positiv oder negativ) beeinflussen können („Co-Effektoren“).
<b>Leitsubstanzen</b>	Inhaltsstoffe für die Beurteilung der phytochemischen Qualitätsprüfung (Identifizierung, Charakterisierung), unabhängig davon, ob sie zur Wirkung beitragen oder nicht.
<b>Gerüstsubstanzen</b>	Inhaltsstoffe, die zum Aufbau der Pflanzenzelle gebraucht werden und für die Stabilität der Pflanze verantwortlich sind (Primärstoffwechsel).

Die Sekundärstoffe sind die aktiven Substanzen einer Arzneipflanze. Sie sind häufig multifunktionell und weisen mehr als eine pharmakologisch aktive Wirkgruppe auf, sodass sie als „Multi-Target-Wirkstoffe“ mit mehr als einer Zielstruktur interagieren können. Charakteristisch für Phytotherapeutika ist, dass sich ihre pharmakologische Wirkung nicht auf einen einzelnen Inhaltstoff zurückführen lässt, sondern diese die Summe der pharmakologischen Wirkungen mehrerer Komponenten des Vielstoffgemischs darstellt [39]. Sekundärstoffe werden gemäß ihrer chemischen Struktur in unterschiedliche Stoffklassen eingeteilt. Hierzu gehören ätherischen Öle, Alkaloide, Bitterstoffe, Flavonoide, Gerbstoffe, Glykoside, Saponine, Schleimstoffe und Senföle (s. Anhang, Tabelle 37). Sekundärstoffe haben ein großes Wirkspektrum, da sie strukturell bedingt in der Lage sind mit Proteinen, Biomembranen und DNA zu interagieren. Weiter können sie als Hormone oder Neurotransmitter wirken und so direkt Signalkaskaden auslösen [41].

### 4.3. Indikation und Grenzen der Phytotherapie

Insbesondere in der Selbstmedikation haben Phytotherapeutika einen großen Stellenwert eingenommen. 2022 wurden 94 Millionen Packungen in deutschen Apotheken abgegeben. Im Vergleich zum Vorjahr stellt dies eine Zunahme um 25% dar [44]. Vorrangig indiziert sind Phytotherapeutika zur alleinigen Therapie bei Befindlichkeitsstörungen (z.B. Katarrhe der oberen Luftwege, Reizmagen) und bei leichten bis mittelschweren funktionell bedingten und chronischen Erkrankungen (z.B. Obstipation). Auch werden sie zur adjuvanten Therapie in Kombination mit chemisch-synthetischen Arzneimitteln bei schweren Erkrankungen und Infektionen eingesetzt. Die komplexe Zusammensetzung des Vielstoffgemischs ist für die große therapeutische Breite der Phytotherapeutika verantwortlich. Das Multi-Target-Prinzip erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass auch Personen, die auf einen einzelnen Inhaltstoff nicht reagieren (Non-Responder), auf die phytotherapeutische Behandlung ansprechen. Ein weiterer Vorteil der Phytotherapie ist ihr erhöhtes Sicherheitspotential aufgrund der weniger häufig auftretenden Nebenwirkungen und selteneren Interaktionen. Nichts desto trotz gilt auch für

Phytopharmaka, dass eine exakte Indikationsstellung, eine adäquate Dosierung und die Beachtung eventueller Kontraindikationen und Wechselwirkungen für den Therapieerfolg beachtet werden müssen [40], [45].

#### **4.4. Arzneipflanzen-Monographien**

In dieser Arbeit wurden insgesamt sechs Pflanzenextrakte untersucht:

- Ginkgo (Blätter)
- Ginseng (Wurzel)
- Granatapfel (Frucht)
- Mariendistel (Frucht)
- Olive (Blätter)
- Rosskastanie (Samen)

Im Nachfolgenden sind die Pflanzenprofile als Kurzmonographien beschrieben.

## **Ginkgo (Ginkgo biloba)**

Tabelle 5: Kurzmonographie des Ginkgos [40], [43].

<b>Stammpflanze</b>	<i>Ginkgo biloba</i>
	Seinen Ursprung hat der Ginkgobaum in Asien (China, Japan). Seit dem 18. Jahrhundert wird er auch in Europa angepflanzt. Der bis zu 40 m große Baum ist sehr langlebig und widerstandsfähig. Die lang gestielten, zweilappigen Blätter sind fächerförmig und von gabelartig verlaufenden Blattnerve durchzogen (parallelnervig). Es sind männliche und weibliche Zapfen vorhanden, wobei die Außenschicht der weiblichen Zapfen nach Buttersäure riecht.
<b>Familie</b>	Ginkgogewächse ( <i>Ginkgoaceae</i> )
<b>Droge</b>	Blätter ( <i>Ginkgo bilobae folium</i> )
<b>Inhaltsstoffe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4,0 - 12,0% Oligomere Proanthocyanidine (Prodelphinidine), komplexe Diterpenlactone (Ginkgolide A, B, C, J, M), Bilobalide (Sesquiterpen), Polyprenole</li> <li>- 1,0 - 2,0% Ginkgolsäuren</li> <li>- 0,5 - 2,0% Flavon- und Flavonolglykoside (Derivate von Kaempferol, Quercetin, Isorhamnetin, Apigenin, Luteolin)</li> <li>- 0,4 - 2,0% Biflavone (Amentoflavon, Bilobetin, Ginkgetin)</li> </ul>
<b>Wirkung</b>	<p>Die Wirkungen der Ginkgo-Blätter sind vielseitig. Einige der Effekte konnten experimentell oder klinisch nachgewiesen werden:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Steigerung der Hypoxietoleranz, insbesondere des Hirngewebes</li> <li>- Förderung der Sauerstoff-, Glucoseaufnahme und -verwertung</li> <li>- Hemmung der Entwicklung eines toxisch oder traumatisch bedingten Hirnödems und Beschleunigung seiner Rückbildung</li> <li>- Verminderung des Retinaödems und Läsionen der Zellen der Netzhaut</li> <li>- Steigerung der Gedächtnisleistung und des Lernvermögens</li> <li>- Förderung der Kompensation von Gleichgewichtsstörungen</li> <li>- Förderung der Durchblutung, insbesondere der Mikrozirkulation</li> <li>- Verbesserung der Fließeigenschaften des Bluts</li> <li>- Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion</li> <li>- Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffradikalen</li> <li>- Neuroprotektive Wirkung</li> </ul>
<b>Wirkmechanismus</b>	<p><u>Gefäße</u></p> <p>Insgesamt lassen sich die Effekte der Ginkgoblätter auf eine Verbesserung der Durchblutung, insbesondere der Mikrozirkulation, zurückführen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sie bewirken die Hemmung der bradykinin- und histamininduzierten Vasokonstriktion und der Erythrozytenaggregation. Dadurch nimmt die Flexibilität der Erythrozyten zu und die Fibrinogenwerte werden reduziert.</li> <li>- Ginkgolide sind Antagonisten des plättchenaktivierenden Faktors (PAF). Dadurch wird die Thrombozytenaggregation gehemmt, die Kapillarpermeabilität reduziert und die Vasodilatation gefördert.</li> </ul>
	<p><u>Gehirn</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Allgemein antioxidativ wirksam (Radikalfänger)</li> <li>- Steigerung der Hypoxietoleranz eventuell durch PAF-Antagonismus der Ginkgolide</li> <li>- Hemmung der altersbedingten Reduktion von muskarinergen Cholinrezeptoren und <math>\alpha_2</math>-Adrenozeptoren und Steigerung der Cholinaufnahme im Hippokampus</li> </ul>
<b>Indikation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) im Stadium IIa-IIb (Fontaine)</li> <li>- Zerebrovaskuläre Insuffizienz (Aufmerksamkeit, Konzentrationsfähigkeit usw.)</li> <li>- Demenz</li> <li>- Vaskulärer Schwindel, Tinnitus, Hörsturz</li> <li>- Netzhautödeme, Netzhautzellläsionen</li> </ul>
<b>Nebenwirkungen</b>	Diese treten sehr selten auf. Hierzu gehören leichte Magen-Darm-Beschwerden, Kopfschmerzen oder allergische Hautreaktionen.
<b>Interaktion</b>	Eine Wechselwirkung mit blutgerinnungshemmenden Arzneimitteln (Acetylsalicylsäure, Phenprocoumon, usw.) ist möglich.

PAF: Plättchenaktivierender Faktor, pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit

Durch industrielle Standardisierung des Herstellungsverfahrens konnte der Gehalt der Flavonoide und Terpenoide maximiert und der Gehalt der neurotoxischen Ginkgolsäuren minimiert werden. Der dadurch gewonnene Spezialextrakt EGb 761® setzt sich wie folgt zusammen:

- 22,0 - 27,0% Flavonglykoside (Kaempferol, Quercetin, Isorhamnetin)
- 5,0 - 7,0% Terpenlactone
  - 2,6 - 3,2% Bilobalid
  - 2,8 - 3,4% Ginkgolide A, B, C
- max. 5 ppm Ginkgolsäuren

Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Ginkgo-Extrakts stimmte mit der des Spezialextrakts überein.

## **Ginseng (*Panax ginseng*)**

Tabelle 6: Kurzmonographie des Ginsengs [39], [40], [43], [46].

<b>Stammpflanze</b>	<i>Panax ginseng</i>
	Die Pflanze wird in den Gebirgswäldern Ostasien (Nordchina, Japan, Korea) kultiviert.
	Die bis zu 80 cm große Staude besitzt ein bis vier gefingerte Blätter und unscheinbare, in Dolden angeordnete weiße Blüten. Die Beeren sind hellrot gefärbt und enthalten jeweils zwei Samen. Die Wurzel ist 8 bis 12 cm lang und von der Mitte an mehrfach geteilt.
<b>Familie</b>	Araliengewächse ( <i>Araliaceae</i> )
<b>Droge</b>	Wurzel ( <i>Ginseng radix</i> )
<b>Inhaltsstoffe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 0,8 - 8,6% glykolisierte Triterpensaponine („Ginsenoside“: Rg1, Rc, Rd, Rb1, Rb0)</li> <li>– 0,05% Ätherische Öle (Monoterpene, z.B. Limonen, Terpeneol, Citral)</li> <li>– Vitamine (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, C, Folsäure)</li> <li>– Phytosterole</li> <li>– Wasserlösliche Polysaccharide (Panaxane A-U)</li> </ul>
<b>Wirkung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Unspezifische Steigerung der körpereigenen Abwehr gegen Stress und Erkrankungen</li> <li>– Steigerung der Leistungs- und Konzentrationsfähigkeit</li> <li>– Beschleunigung der postoperativen Rekonvaleszenz</li> <li>– Antioxidativ</li> <li>– Beeinflussung des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels</li> <li>– Steigerung der Glucoseaufnahme in Erythrozyten</li> <li>– Regulation der physiologischen Darmflora</li> <li>– Hemmung der Thrombozytenaggregation und Thromboxanbildung</li> </ul>
<b>Wirkmechanismus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Immunstimulierende Wirkung der Ginsenoside beruht auf der Stimulation von T-Helferzellen und B-Lymphozyten und der Erhöhung der Interferonproduktion</li> <li>– Verbesserung der Gedächtnisleistung und Antistresswirkung durch Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse: Anstieg von Adrenocorticotropin und Corticosteron</li> <li>– Erhöhung der kortikalen Dopamin-, Noradrenalin-, Serotoninspiegel und der cAMP-Konzentration</li> <li>– Förderung der aeroben Glucoseoxidation im Gehirn und gleichzeitige Senkung des Lactat-Pyruvat-Quotienten</li> <li>– Steigerung der hepatischen Protein- und RNA-Synthese</li> </ul>
<b>Indikation</b>	Tonikum zur Stärkung und Kräftigung
<b>Nebenwirkungen</b>	Unter hohen Dosen und / oder längerer Anwendungsdauer <sup>1</sup> können sehr selten erhöhter Blutdruck, Unruhezustände, Schlaflosigkeit, Durchfall und Blutungen in der Menopause auftreten.
<b>Interaktion</b>	n.a.

<sup>1</sup> Aufgrund nicht auszuschließender hormonartiger oder hormoninduzierender Wirkungen sollte Ginseng nicht länger als drei Monate eingenommen werden.

## **Granatapfel (*Punica granatum*)**

Tabelle 7: Kurzmonographie des Granatapfels [39], [46].

<b>Stammpflanze</b>	<i>Punica granatum</i>
	Die Pflanze hat ihren Ursprung im südwestlichen Asien. Heute wird sie in allen Gebieten mit warmem Klima kultiviert. Der bis zu 5 m große Strauch besitzt kleine Blätter und orangerote Blüten. Die essbare Frucht besitzt eine saftige rote Außenschicht und zahlreiche Samen.
<b>Familie</b>	Weiderichgewächse ( <i>Lythraceae</i> )
<b>Droge</b>	Rinde von Stamm und Wurzel (Granatrinde - <i>Granati cortex</i> ) Fruchtperikarp (Granatapfelschalen - <i>Granati pericarpium</i> ) Granatapfel Frucht
<b>Inhaltsstoffe</b>	<u>Rinde</u> – Bis zu 20% Gerbstoffe (Ellagitannine: Punicalin, Punicalagin) – ca. 0,4% Alkaloide <sup>1</sup> (Isopelletierin, N-Methylisopelletierin, Pseudopelletierin)
	<u>Fruchtschalen</u> – Bis zu 28% Gerbstoffe (Ellagitannine: Punicalin, Punicalagin) – Schleimstoffe – Harz
	<u>Fruchtextrakt</u> – Anthocyanidine (Delphinidin, Cyanidin, Pelargonidin) – Ellagitannine (Punicalin, Punicalagin, Pedunculagin, Pedunculagin, Ellagsäure)
<b>Wirkung</b>	antibakteriell, antiparasitär adstringierend
<b>Wirkmechanismus</b>	<u>Alkaloide</u> Über den nicotinergen Acetylcholinrezeptor werden (Band)Würmer betäubt und gelähmt, sodass diese sich nicht mehr an der Darmwand des Wirts festsaugen und ausgeschieden werden können.
	<u>Gerbstoffe</u> Gegen Durchfall (Adstringens)
<b>Indikation</b>	<u>Rinde</u> Traditionell als Entwurmungsmittel
	<u>Fruchtschalen</u> Beschwerden des Magen-Darm-Trakts, insbesondere bei Durchfall
	<u>Granatapfel-Extrakt</u> Wird als Nahrungsergänzungsmittel zur Stärkung des Herz-Kreislauf-Systems, der Bluthochdruck- und Blutzuckerregulierung und ferner zur Prävention viraler Infektionen angewendet.
<b>Nebenwirkungen</b>	Alkaloide werden im Darm resorbiert und führen zu unerwünschten Wirkungen im ZNS (Steigerung des Blutdrucks, Sehstörungen und Erbrechen).
<b>Interaktion</b>	n.a.

<sup>1</sup> Alkaloide nur in Wurzeln, Rinde, Blättern und jungen Früchten, nicht aber in der Fruchtschale.

ZNS: Zentrales Nervensystem

## **Mariendistel (*Silybum marianum*)**

Tabelle 8: Kurzmonographie der Mariendistel [39], [40], [43].

<b>Stammpflanze</b>	<i>Silybum marianum</i>
	Ursprünglich in Südeuropa, Südrussland, Kleinasien und Nordafrika beheimatet, nun auch in Mitteleuropa kultiviert. Die 30 bis 150 cm große Pflanze besitzt einen oben verzweigten und behaarten Stängel mit großen, dunkelgrün-weiß marmorierten, dornig gezähnten Blättern. Die einzelnen purpurvioletten und kugelförmigen Körbchenblüten sitzen an den Stängelspitzen. Die Früchte sind etwa 6 mm lang und braunschwarz.
<b>Familie</b>	Korbblütler ( <i>Asteraceae</i> )
<b>Droge</b>	Früchte ( <i>Cardui mariae fructus</i> )
<b>Inhaltsstoffe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bis zu 30% fettes Öl (hoher Anteil an Linolsäure, Linolensäure, Palmitinsäure)</li> <li>- 2,0 - 3,0% Flavolignane (Silymarin = Isomerenmischung aus ca. 50% Silybinin und geringere Mengen an Isosilybinin, Silychristin, Silydianin)</li> <li>- Flavonoide (Apigenin, Chrysoeriol, Quercetin)</li> <li>- Triterpene</li> </ul>
<b>Wirkung</b>	hepatoprotektiv antifibrotisch antiphlogistisch antioxidativ verdauungsfördernd
<b>Wirkmechanismus</b>	<u>Hepatoprotektiv</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Silymarin interagiert mit der Zellmembran und den Membranproteinen von Hepatozyten. Die Lipidstruktur wird dadurch stabilisiert und verhindert das Eindringen von Toxinen.</li> <li>- Förderung der Regenerationsfähigkeit von Hepatozyten durch Stimulation der Aktivität der nukleolären Polymerase A durch Silymarin. Ribosomale RNA wird vermehrt und schneller gebildet, sodass die Proteinsynthese gesteigert wird.</li> <li>- Stimulation der Bildung neuer Leberzellen</li> </ul>
	<u>Antitoxin bei Knollenblätterpilzvergiftung</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Silibinin-dihydrogensuccinat (i.v.) verdrängt kompetitiv Phalloidin und Amanitin (Toxine) von der hepatischen RNA-Polymerase. Eine Hemmung der RNA-Polymerase durch die Toxine führt innerhalb von 12 bis 24 h zum Zelltod.</li> </ul>
	<u>Antifibrotisch</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemmung der Umwandlung von Ito-Zellen in Fibroblasten</li> <li>- Hemmung der Expression der fibrogenen Matrix und TGF-β</li> <li>- Beschleunigung des Fibronektin-Abbaus</li> </ul>
	<u>Antiphlogistisch</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemmung des 5-Lipoxygenase-Signalwegs führt zur verminderten Freisetzung von Leukotrien-B<sub>4</sub> aus den Kupffer-Zellen</li> </ul>
<b>Indikation</b>	Verdauungs- und Gallebeschwerden (Verwendung als Magenbitter)
	Knollenblätterpilzvergiftung (i.v. Gabe von Silybinin)
	Chronische Leberentzündung und -zirrhose
<b>Nebenwirkungen</b>	Nur vereinzelt laxierend.
<b>Interaktion</b>	n.a.

i.v.: intravenös, TGF-β: Transforming growth factor β

## **Olive (*Olea europaea*)**

Tabelle 9: Kurzmonographie der Olive [39], [43], [46].

<b>Stammpflanze</b>	<i>Olea europaea</i>
	Die Pflanze wird in subtropischen Arealen, insbesondere im Mittelmeergebiet (Europa, Nordafrika, Westasien) angebaut. Der bis zu 10 m hohe Baum besitzt einen knorrigen Stamm. Die schmal-elliptische Blätter sind ledrig und an der Unterseite behaart und silbrig. Der Olivenbaum bildet weißliche, stark duftende Blüten aus. Aus den öl- und eiweißreichen, fleischigen Steinfrüchten wird durch Pressung das Olivenöl gewonnen.
<b>Familie</b>	Olivengewächse ( <i>Oleaceae</i> )
<b>Droge</b>	Blätter ( <i>Olea folium</i> )
	Öl ( <i>Olea oleum</i> )
<b>Inhaltsstoffe</b>	<u>Blätter</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 6,0 - 9,0% Oleuropein (Secoiridoidglykosid)</li> <li>- Secoiridoide (Elenolsäure, Ligustrosid, Oleacein)</li> <li>- Triterpene (Oleanolsäure, Maslinsäure, Uvaol)</li> <li>- Flavonoide (Glykoside von Chrysoeriol, Apigenin, Luteolin)</li> <li>- Phenolcarbonsäuren</li> </ul>
	<u>Öl</u> <sup>1</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 56,0 - 83,0% Ölsäure</li> <li>- 7,5 - 20,0% Palmitinsäure</li> <li>- 3,5 - 21,0% Linolsäure</li> <li>- 0,5 - 3,5% Stearinsäure</li> <li>- 0,1 - 0,3% Steroide (<math>\beta</math>-Sitosterol, <math>\delta</math>7-Stigmasterol, <math>\delta</math>5-Avenasterol)</li> <li>- Tocopherole (&lt; 0,1%)</li> </ul>
<b>Wirkung</b>	<u>Blätter</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- blutdrucksenkend, harntreibend</li> <li>- antiarrhythmisch und koronardilatierend (Tiermodell)</li> </ul>
	<u>Öl</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Innerlich: mild abführend, gallenflussfördernd, blutzuckersenkend</li> <li>- Äußerlich: reizlindernd</li> </ul>
<b>Wirkmechanismus</b>	<u>Blutdrucksenkend</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Steigerung der Durchblutung der Herzkranzgefäße (Oleuropein)</li> <li>- Hemmung des Angiotensin Converting Enzyme (Oleacin)</li> </ul>
	<u>Antiatherosklerotisch</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Beeinflussung des Serumlipidspiegels des Öls und Senkung des Cholesterinspiegels (Oleuropein)</li> </ul>
<b>Indikation</b>	<u>Blätter</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Traditionelle Anwendung bei Bluthochdruck und zur Durchspülungstherapie bei leichten Harnwegsbeschwerden</li> </ul>
	<u>Öl</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Trägerstoff für lipophile Arzneistoffe (peroral, perkutan)</li> <li>- Darmgleitmittel (Obstipation, Gallensteinerkrankungen)</li> <li>- Psoriasis</li> </ul>
<b>Nebenwirkungen</b>	n.a.
<b>Interaktion</b>	n.a.

<sup>1</sup> Wird aus der Frucht durch Pressung gewonnen (15 - 40% ganze Frucht, 65 - 85% Fruchtfleisch, 15 - 35% Samen)

## **Roskastanie (*Aesculus hippocastanum*)**

Tabelle 10: Kurzmonographie der Roskastanie [39], [40], [43].

<b>Stammpflanze</b>	<i>Aesculus hippocastanum</i>
	Der Baum ist in einem Bereich von Griechenland bis Skandinavien weit verbreitet.
	Der bis zu 35 m große Laubbaum besitzt große, fünf- bis siebenzählig gefingerte Blätter und weiß-rot gefleckte Blütenkerzen. Die charakteristische, stachelige Fruchtkapsel enthält bis zu drei glänzende, braun gefärbte Samen mit einem hellen Nabelfleck.
<b>Familie</b>	Seifenbaumgewächse ( <i>Sapindaceae</i> )
<b>Droge</b>	Samen ( <i>Hippocastani semen</i> )
<b>Inhaltsstoffe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3,0 - 10,0% komplexes Gemisch aus mindestens 30 Saponinglykosiden („Aescin“)</li> <li>- Gerbstoffe (Cinnamtannine B1, B2)</li> <li>- Cumarine (Aesculin, Fraxin)</li> <li>- Triterpene</li> <li>- Phytosterole</li> <li>- Samenschale enthält antioxidativen Proanthocyanidine (Oligomere von Epicatechin, Catechin) und Procyanidin-B2 sind Hauptkomponenten</li> </ul>
<b>Wirkung</b>	antiexsudativ gefäßabdichtend ödemprotektiv venentonisierend
<b>Wirkmechanismus</b>	<u>Antiexsudativ</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduktion der bei Venenkranken erhöhten Konzentration und Aktivität lysosomaler Enzyme durch Stabilisierung der Lysosomenmembran (Aescin)</li> <li>- Durch die Hemmung werden weniger Gefäßwände im Kapillarbereich geschadet und weniger Glykokalyx der Venenwände abgebaut, sodass die Durchlässigkeit der Gefäßwände reduziert wird.</li> </ul>
	<u>Gefäßabdichtend</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Normalisierung der gestörten Gefäßpermeabilität und Minderung der Gefäßfragilität in der Anfangsphase einer Entzündung</li> </ul>
	<u>Venentonisierend</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Durch Wirkung am Endothelin-Rezeptor wird der venöse Rückfluss gefördert (Aescin)</li> <li>- Flavonoide wirken entzündungshemmend</li> </ul>
<b>Indikation</b>	Chronische Veneninsuffizienz Posttraumatische und postoperative Weichteilschwellungen
<b>Nebenwirkungen</b>	Vereinzelt können Juckreiz, Übelkeit und Magenbeschwerden als Folge von Reizungen der Schleimhaut im Magen-Darm-Bereich auftreten.
<b>Interaktion</b>	n.a.

## 5. Fragestellung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Enzym Arginase und seiner Regulation im diabetischen Endothel unter hyperglykämischen Bedingungen. Das Ziel war es mit Hilfe von Pflanzenextrakten, die in der Literatur beschriebene erhöhte Arginase-Aktivität im diabetischen Endothel zu reduzieren, um dieses durch die Pflanzenextrakte vor der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion zu schützen und damit potentiell die Gefäßgesundheit zu verbessern.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage nach der Enzymregulation in kultivierten humanen Endothelzellen unter High Glucose. Auf welcher Ebene erfolgt die Hochregulation der Arginase durch Glucose in EA.hy926-Zellen? Findet die Regulation auf der Transkriptionsebene (mRNA), der Translationsebene (Protein) oder der Funktionsebene (Aktivität) statt? Wie wirkt sich die Stimulation der Arginase auf die eNOS Regulation aus?

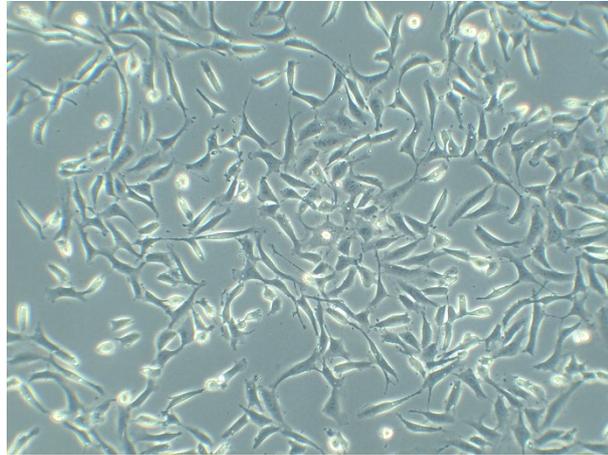
Im nächsten Teil wurde untersucht, ob es möglich ist, die Regulation der Arginase mit Pflanzenextrakten insofern zu beeinflussen, dass diese therapeutisch oder prophylaktisch zum Schutz der Endothelfunktion eingesetzt werden könnten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden ausgewählte Einzelextrakte auf ihre Arginase-beeinflussenden Eigenschaften in EA.hy926-Zellen unter physiologischen (5,5 mM Glucose) und unter pathophysiologischen Bedingungen (25,0 mM Glucose) untersucht. Welche Pflanzenextrakte hemmen die Arginase und auf welcher Regulationsebene findet die Beeinflussung statt? Inwiefern wirkten sich die Einzelextrakte auf die eNOS Regulation aus?

Im letzten Teil wurde untersucht, ob eine Verstärkung der Arginase-Inhibition durch die Kombination der hemmenden Einzelextrakte möglich ist.

## **Material und Methoden**

### **1. Zellkultur**

Alle Versuche dieser Arbeit wurden an der immortalisierten Zelllinie EA.hy926 durchgeführt. Diese wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, US) bezogen.



**Abbildung 12: Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten EA.hy926-Zellen.** Die Konfluenz der Zellen betrug zum Zeitpunkt der Aufnahme etwa 45% (10-fache Vergrößerung).

Zur Kultivierung der Zellen wurden das Nährmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) und die phosphatgepufferte Kochsalzlösung *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) verwendet. Standardmäßig wurden dem Nährmedium 10% fötales Rinderserum (*Fetal Bovine Serum*, FBS) und 1% Penicillin/ Streptomycin zugesetzt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden das Nährmedium und DPBS vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

#### **1.1. Kryokonservierung von EA.hy926-Zellen**

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung wurde der Kryocontainer am Vortag mit Isopropanol befüllt und über Nacht bei 4 °C gekühlt. Am nächsten Tag wurde zu Beginn das Kryomedium angesetzt: Pro Zellkulturschale wurden 900 µl Nährmedium mit 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und auf Eis gestellt. Nach Entfernen des alten Nährmediums wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml DPBS gewaschen. Jede Zellkulturschale wurde im Anschluss mit 1 ml Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung versetzt und 3 min bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen vom Schalenboden abgelöst und in je 10 ml Nährmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 120 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 5 ml Nährmedium resuspendiert und im Anschluss unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in je 1 ml kaltes Kryomedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in dem vorgekühlten Kryocontainer zunächst für 2 h bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend folgte die Lagerung bei -80 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstofftank umgesetzt und die Zellen bis zum Auftauen bei -196 °C gelagert.

## 1.2. Auftauen und Kultivierung von EA.hy926-Zellen

Zur Vorbereitung des Auftauens wurden jeweils 8 ml Nährmedium in zwei T25-Zellkulturflaschen vorgelegt und auf 37 °C bei 7% CO<sub>2</sub> erwärmt. Weiter wurden pro Kryoröhrchen 9 ml Nährmedium in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt.

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Flüssigstickstofftank auf Eis gesetzt und langsam in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald nur noch ein kleines Eispellet zu sehen war, wurde die Zellsuspension in das vorbereitete 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (120 x g, 5 min, RT) und nach Entfernen des Überstands in 2 ml Nährmedium resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in die vorbereiteten T25-Zellkulturflaschen pipettiert. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche über die gesamte Fläche verteilt und im Anschluss bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Nährmedium gewechselt. Nach Überprüfen der Vitalität der Zellen unter dem Lichtmikroskop wurde das alte Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit je 10 ml DPBS gewaschen und je 10 ml neues Nährmedium hinzugegeben.

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage bei einer Konfluenz von 90 bis 100% gesplittet. Das Ablösen der Zellen vom Schalenboden erfolgte mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml DPBS (s. Material und Methoden, Kapitel 1.1). In Abhängigkeit von den nachfolgenden Stimulationsversuchen und der bevorstehenden Stimulationsdauer wurden die Zellen in unterschiedlichen Zelldichten ausgesät (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Zelldichten der EA.hy926-Zellen, die in Abhängigkeit der Stimulationsversuchen ausgesät wurden.

Stimulus	Inkubationsdauer	Verhältnis	Konfluenz zu Beginn [%]	Konfluenz am Ende [%]
Glucose	24 h	1 : 2,0 - 1 : 3,0	55 - 70	95 - 100
	48 h	1 : 3,5 - 1 : 4,0	25 - 45	95 - 100
	72 h	1 : 4,5 - 1 : 6,0	10 - 20	95 - 100
Pflanzenextrakte	48 h	1 : 3,5 - 1 : 5,0	25 - 45	70 - 100

## 1.3. Test auf Mykoplasmen

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen mit Hilfe des *Mycoplasma PCR Detection Kits* auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Das Vorgehen erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers.

Als Probe diente das Nährmedium, welches mindestens 48 h Kontakt mit den Zellen hatte. 500 µl wurden direkt aus der Zellschale entnommen, in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß überführt, auf Eis gesetzt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C für maximal 24 h gelagert. Unabhängig von der Lagertemperatur wurden die Proben zur Testung auf eine Mykoplasmen-Kontamination auf Raumtemperatur erwärmt. In einem 0,2 ml Reagiergefäß wurden 12,5 µl *ExpressTaq 2x PCR MasterMix* und 1,0 µl *Mycoplasma PCR Primer Mix* vorgelegt und auf Eis gesetzt. Für die Proben und die

Positivkontrolle wurden 2,5 µl Nährmedium beziehungsweise 2,5 µl *Mycoplasma Positive Control* und jeweils 9,0 µl Nuklease-freies Wasser zu den Reaktionsansätzen pipettiert. Das Gesamtvolumen der Reaktionen betrug 25,0 µl, sodass der Ansatz der Negativkontrolle mit 11,5 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt wurde. Alle Reaktionsansätze wurden gevortext, abzentrifugiert und im Anschluss die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) gestartet (s. Tabelle 12).

**Tabelle 12: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Testung der EA.hy926-Zellen auf eine Mykoplasmen-Kontamination.** Es wurde das *Mycoplasma PCR Detection Kit* der Firma Abcam plc. (Cambridge, UK) verwendet. Das Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Polymeraseaktivierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Annealing	55 °C	15 s	
Extension	72 °C	15 s	
Finale Extension	72 °C	1 min	1
Holding	4 °C	-	-

Im Anschluss wurden die Proben mit dem Farbstoff MIDORI<sup>Green</sup> Direct versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Gelkammer wurde mit 0,5x Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Puffer befüllt und die Gelelektrophorese bei 65 V gestartet. Die Auftrennung wurde anhand des Größenmarkers beobachtet und die Elektrophorese nach einer Laufzeit von 60 bis 90 min beendet. Danach wurde das Gel im Detektionssystem ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+ detektiert. Die Positivkontrolle zeigte eine deutliche Bande auf Höhe der 500 bp-Bande des DNA-Größenmarkers. Diese war bei der Negativkontrolle und nicht kontaminierten Zellproben nicht sichtbar.

#### 1.4. Stimulation von EA.hy926-Zellen

##### Glucose

Zur Herstellung des High Glucose-Mediums wurden 2,28 g Glucose-Monohydrat in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Aus einer vollen, alle Zusätze enthaltenen DMEM-Flasche wurden 35 ml Nährmedium entnommen und das abgewogene Glucose-Monohydrat durch Vortexen darin gelöst. Die hochkonzentrierte Glucose-Lösung wurde in mehreren Teilschritten mit einer 20 ml Einmalspritze aufgezogen und durch einen 0,2 µm Membranfilter in die DMEM-Flasche, aus der die 35 ml Nährmedium entnommen wurden, überführt. Im Anschluss wurde die Integrität des verwendeten Membranfilters überprüft [47]. Hierzu wurde ein 50 ml Becherglas mit Wasser befüllt und ungefähr 20 ml Wasser in die Einmalspritze aufgezogen. Der zu prüfende Filter wurde auf die Spritze gesetzt und mit Wasser durchspült. Nach Entfernen des Filters wurden 10 ml Luft in die Spritze aufgezogen, der Sterilfilter erneut auf die Spritze gesteckt und in das mit Wasser befüllte Becherglas getaucht. Die Spritze wurde langsam zusammengedrückt und der Luftblasenstrom beobachtet. Konnte die Luft in der

Einmalspritze ohne einen konstanten Luftblasenstrom auf 2 ml zusammengedrückt werden, konnte die Filterintegrität bestätigt und das hergestellte High Glucose-Medium verwendet werden.

Die Zellen wurden wie in Kapitel 1.2 (Material und Methoden) beschrieben kultiviert und entsprechend der Inkubationsdauer ausgesät (s. Tabelle 11). 24 h nach dem Aussäen wurde die Stimulation durch den Wechsel des Nährmediums gestartet. Im Falle der 48 h und 72 h andauernden Inkubationen erfolgte ein erneuter Wechsel des Nährmediums nach jeweils 24 h.

### **Einzelextrakte**

Alle verwendeten Pflanzenextrakte wurden von der Firma Euromed S.A. (Barcelona, ES) bereitgestellt. Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte jeweils frisch am Tag des Mediumwechsels. Die Extrakte wurden unter Nutzung einer Analysenwaage in ein 2 ml Reagiergefäß eingewogen, in 70% DMSO beziehungsweise Milli-Q®-Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst (s. Tabelle 13) und bis zu ihrer Verwendung dunkel bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Pflanzenextrakte und die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen.** Es wurden die Pflanzenextrakte der Firma Euromed S.A. (Barcelona, ES) verwendet. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%.

<b>Extrakt</b>	<b>Ginkgo</b>	<b>Ginseng</b>	<b>Granatapfel</b>	<b>Mariendistel</b>	<b>Olive</b>	<b>Roskastanie</b>
<b>Pflanzenteil</b>	Blätter	Wurzel	Frucht	Frucht	Blätter	Samen
<b>Leitsubstanz</b>	Flavonglycoside	Ginsenosid Rg1	Punicalagine A+B	Silymarin	Oleuropein	Aescin
[Gehalt]	[24,50%]	[29,70%]	[30,20%]	[61,27%]	[22,00%]	[21,80%]
<b>Lösungsmittel</b>	70% DMSO	ddH <sub>2</sub> O	70% DMSO	70% DMSO	70% DMSO	70% DMSO
<b>Stammlösung</b> [mg/ml]	34,78	7,00	52,17	17,39	34,78	5,22
<b>Endkonzentration</b> [µg/ml]	100,00	70,00	150,00	50,00	100,00	15,00
<b>Referenz</b>	[48]	[49]	[50]	[51]	[52]	[53]

Unter der sterilen Werkbank wurden 40 ml Standardnährmedium in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die Extrakt-Stammlösungen wurden mit einer 1,0 ml Einmalspritze und einem 0,2 µm Membranfilter in ein 2,0 ml Reagiergefäß sterilfiltriert. Danach wurde das vorgelegte Nährmedium mit 115 µl Stammlösung der in DMSO-gelösten Extrakte beziehungsweise 400 µl Stammlösung des wasserlöslichen Ginseng-Extrakts versetzt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde der Pflanzenextrakt im Nährmedium verteilt und der verwendete Sterilfilter auf dessen Integrität überprüft (s. Material und Methoden, Kapitel 1.4, Glucose).

Die Zellen wurden wie in Kapitel 1.2 (Material und Methoden) beschrieben kultiviert und in Abhängigkeit der Inkubationsdauer ausgesät (s. Tabelle 11). Entsprechend der Stimulation mit Glucose wurde 24 h nach dem Aussäen die Inkubation durch den Wechsel des Mediums gestartet. Für die in 70% DMSO gelösten Pflanzenextrakte wurde in jedem Versuch eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Die Endkonzentration von DMSO betrug 0,2%.

## **Pflanzenkombination**

Basierend auf den Ergebnissen der Einzelnextrakte wurden zwei Pflanzenkombinationen untersucht. Das Vorgehen bei der Herstellung der Kombinationslösungen entsprach dem der Herstellung der Stammlösungen der Einzelnextrakte. Aufgrund des geringeren Pipettier Volumens wurde die Konzentration der Stammlösungen entsprechend angepasst (s. Tabelle 14). Unmittelbar vor dem Ansetzen des Nährmediums für die Stimulationsversuche wurden die verschiedenen Stammlösungen vereinigt.

**Tabelle 14: Zusammensetzung der Pflanzenkombinationen und die Konzentration der Extrakt-Stammlösungen.** Ginseng wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst, Ginkgo, Rosskastanie und Olive in 70% DMSO. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%.

		<b>Ginseng</b>	<b>Ginkgo</b>	<b>Rosskastanie</b>	<b>Olive</b>
<b>Kombination A</b>	Stammlösung [mg/ml]	7,00	70,00	10,50	-
	Pipettiertes Volumen [µl]	400,00	57,20	57,20	
<b>Kombination B</b>	Stammlösung [mg/ml]	7,00	105,00	15,75	105,00
	Pipettiertes Volumen [µl]	400,00	38,10	38,10	38,10

## **2. mRNA-Analytik**

### **2.1. RNA-Isolierung und Messung der Konzentration**

Die Isolation von Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNA) erfolgte unter RNase-freien Bedingungen unter Verwendung des *Trizol™ Plus RNA Purification Kits* nach den Angaben des Herstellers.

Nach Ablauf der Inkubationszeit und Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop wurden die Zellen mit 10 ml 4 °C kaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellschale gekratzt. Die abgelösten Zellen wurden in 1 ml 4 °C kaltes Trizol™ aufgenommen und in ein steriles 2 ml Reagiergefäß überführt. Trizol™ enthielt Guanidiniumthiocyanat und Phenol, wodurch Zellen lysiert und RNA gelöst wurde. Nach der Zelllyse wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die maximale Aufbewahrungszeit betrug zwei Monate.

Nach dem Auftauen der lysierten Proben auf Eis wurden darin enthaltene Nukleoproteinkomplexe durch eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur dissoziiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, eine kurze Durchmischung des Reaktionsansatzes durch Vortexen und eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Durch die anschließende Zentrifugation (12 000 x g, 15 min, 4 °C) wurden RNA, Proteine und Desoxyribonukleinsäuren (*desoxyribonucleic acid*, DNA) voneinander getrennt. In der unteren, organischen Phase befanden sich die in Chloroform gelösten Proteine, die Zwischenphase enthielt DNA und die wässrige, obere Phase die gewünschte RNA. Letztere wurde vorsichtig in ein neues Reagiergefäß transferiert und durch Zugabe des gleichen Volumens von 70%igen Ethanol gefällt. Anschließend wurde die RNA an eine Säulenmembran gebunden. Hierzu wurde die Probe in mehreren Teilschritten auf eine

Spin Cartridge Säule aufgetragen, zentrifugiert (12 000 x g, 15 s, RT) und der Durchfluss jeweils verworfen. Das maximale Probenvolumen pro Teilschritt betrug 700 µl.

Nach der Bindung der RNA an die Säulenmembran erfolgte der DNase-Verdau mit dem *PureLink™ DNase Kit* nach den Angaben des Herstellers. In einem ersten Waschschrift wurden 350 µl Waschpuffer I auf die Säule gegeben und anschließend zentrifugiert (12 000 x g, 15 s, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß eingesetzt. Der DNase-Reaktionsmix (s. Tabelle 28) wurde direkt auf die Membran der Säule aufgetragen und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurden 350 µl Waschpuffer I auf die Säule gegeben, zentrifugiert (12 000 x g, 15 s, RT) und der Durchfluss verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschriffe bei der jeweils 500 µl Waschpuffer II auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert (12 000 x g, 15 s, RT) und der Durchfluss verworfen wurde. Für alle Waschschriffe wurde das selbe Sammelgefäß verwendet.

Im letzten Schritt wurde die RNA eluiert. Hierzu wurde die Membran zuerst durch Zentrifugieren (12 000 x g, 60 s, RT) getrocknet. Danach wurden der Durchfluss und das Sammelgefäß verworfen und die Säule in ein frisches Reagiergefäß gesetzt. 50 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O wurden auf die Säule pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation (12 000 x g, 60 s, RT) wurde die RNA eluiert.

Die Konzentrationsmessung der isolierten RNA erfolgte mit dem IMPLEN Nanophotometer® N60. Über die Messung der Absorption einer Probe bei 260 nm wird basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz die RNA-Konzentration berechnet:

$$C = (A_{260} - A_{\text{BKG}}) \cdot \text{Factor}_{\text{nuc}} \cdot D$$

**[Formel 1]**

C	RNA-Konzentration der Probe [ng/µl]
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
A <sub>BKG</sub>	Absorption bei einer als Hintergrund festgelegten Wellenlänge
Factor <sub>nuc</sub>	Nukleinsäure-Faktor [(ng · cm)/µl]
D	Verdünnungsfaktor

Es wurden die Standardeinstellungen (A<sub>BKG</sub> = 320 nm, Factor<sub>nuc</sub> = 40 (ng · cm)/µl, D = 1) des Herstellers übernommen. Die Messung der Konzentration erfolgte in Doppelbestimmung. Der sich aus den Messungen ergebende Mittelwert diente als Wert der Gesamtkonzentration an RNA im Eluat. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

## 2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität der isolierten RNA wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurde ein 1%iges Agarose-Gel hergestellt und insgesamt 2 µg RNA pro Probe aufgetragen. Für die Detektion wurde jeder Probe 1 µl des Farbstoffs MIDORI<sup>Green</sup> Direct zugefügt. Nach Befüllen der Gelkammer mit 0,5x TBE-Laufpuffer und Beladen des Gels mit Größenmarker und Proben wurde die Gelelektrophorese bei 60 V gestartet und nach 2,5 h beendet. Am Ende der Laufzeit wurde das Gel aus der Kammer genommen und mit Hilfe des ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+ detektiert. Eine intakte RNA zeigte die charakteristischen 28S- und 18S-Bande der ribosomalen RNA. Waren diese Banden deutlich erkennbar, wurde die isolierte RNA im nächsten Schritt in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben.

## 2.3. Synthese der cDNA

Die reverse Transkription der isolierten RNA erfolgte unter RNase freien Bedingungen mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* nach den Angaben des Herstellers.

Während die Proben langsam auf Eis auftauten, wurde Nuklease-freies Wasser in RNase-freien PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Nach Zugabe der Proben und des vorbereiteten MasterMix (s. Tabelle 28) wurde der Reaktionsansatz vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Die cDNA wurde nach ihrer Synthese in einem Thermocycler (s. Tabelle 15) bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 15: Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Primer Annealing	25 °C	10 min
Reverse Transkription	37 °C	120 min
Enzymdeaktivierung	85 °C	5 min
Abkühlphase	4 °C	max. 1 min

## 2.4. Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

In der sich anschließenden quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde untersucht, inwiefern die Expression der *messenger RNA* (mRNA) ausgewählter Zielgene durch die Stimuli beeinflusst wurde. Dabei wurden *TaqMan*<sup>®</sup> Genexpressionsassays, welche fluorogene Sonden beinhalten, eingesetzt. Aufgrund der Proportionalität des entstehenden Fluoreszenzsignals und der Menge des Amplifikationsprodukts konnten Rückschlüsse auf die Expression eines Zielgens gezogen und die eigentliche Reaktion in Echtzeit verfolgt werden. Die Verwendung von *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffmarkierungen ermöglichte es zudem, die Expression mehrerer Gene zur selben Zeit in einer Reaktion zu untersuchen (s. Tabelle 33).

Die synthetisierte cDNA wurde auf Eis aufgetaut und mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Wurde die Expression eines einzelnen Zielgens untersucht, betrug die Gesamtmenge an eingesetzter cDNA 18 ng.

Aufgrund des gleichbleibenden Reaktionsvolumens von 10 µl wurden bei der Genexpressionsanalyse zweier Zielgene 16 ng cDNA eingesetzt. Für den Reaktionsansatz wurden pro Probe 5,0 µl 2x *TaqMan*<sup>®</sup> *Fast Advanced MasterMix* und 0,5 µl 20x *TaqMan*<sup>®</sup> Assay pro Zielgen in ein Reagiergefäß pipettiert und kurz durchmischt. Dieses wurde in einer 96-Well-PCR-Platte vorgelegt und mit 4,5 µl cDNA-Verdünnung vermischt. Jede Probe wurde als Triplikat aufgetragen und gemessen. Als Negativkontrolle diente das Nuklease-freie Wasser, welches zum Verdünnen der cDNA verwendet wurde. Nach dem Verschließen der Platte mit einer PCR-geeigneten Folie, wurde die Platte kurz abzentrifugiert und die Reaktion im Quantstudio<sup>™</sup> 5 gestartet (s. Tabelle 16). Durch die vorgeschaltete Inkubation mit der Uracil-DNA-Glykosidase (UNG), welche im *TaqMan*<sup>®</sup> *Fast Advanced Master Mix* enthalten war, wurde noch vorhandene genomische DNA entfernt und damit eine Verschleppung von Produkten aus früheren PCRs verhindert.

Tabelle 16: Programmeinstellungen der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
UNG-Inkubation	50 °C	2 min	1
Polymeraseaktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Annealing/ Extension	60 °C	1 min	

UNG: Uracil-DNA-Glykosidase

Die Art der Auswertung der qRT-PCRs richtete sich nach der Anzahl der untersuchten Zielgene. Um das unter den Versuchsbedingungen stabilste Referenzgen zu finden, wurden für die Singleplex-qRT-PCRs verschiedene Analysemethoden miteinander kombiniert. In Multiplex-qRT-PCRs wurde unter Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode analysiert, wie sich die mRNA-Expression eines Zielgens im Verhältnis zu diesem Referenzgen verhielt. Bei allen Analysen diente die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal der *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden deutlich vom Hintergrund abhob (*cycle threshold*,  $C_T$ ), als Richtgröße.

### **Singleplex-qRT-PCR: Bestimmung des Referenzgens**

Für die Analyse der Genexpression der mit den einzelnen Pflanzenextrakten stimulierten EA.hy926-Zellen wurde durch Singleplex-qRT-PCR das optimale Referenzgen ermittelt. Aufgrund der höheren Signalstärke waren alle eingesetzten *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) markiert. Insgesamt wurde die Expression von neun Referenzgenen untersucht: 18S ribosomal RNA (*18S*),  $\beta$ -Actin (*ACTB*),  $\beta_2$ -Mikroglobulin (*B2M*), Peptidylprolylisomerase A (*PPIA*), Pumilio RNA binding family member 1 (*PUM1*), Ribosomal Protein L13a (*RPL13A*), Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A (*SDHA*), TATA-Box-Bindeprotein (*TBP*) und Ubiquitin C (*UBC*). Für jedes Referenzgen wurden zunächst der  $C_T$ -Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (CV) berechnet. In einer weiteren Analyse wurden gemäß Silver et al. Referenzgen-Paare gebildet und die Differenz der  $C_T$ -Werte ( $\Delta C_T$ ) berechnet

[54]. Für jedes Referenzgen-Paar wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der  $\Delta c_T$  über alle biologischen Gruppen hinweg gebildet und die mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung für jedes einzelne Referenzgen berechnet. Je kleiner die mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung war, umso stabiler war das Referenzgen-Paar und ein Gen eher als Referenzgen geeignet. Als letztes wurde der Datensatz mit dem NormFinder-Algorithmus analysiert [55]. Für diese Analyse wurde die Differenz zwischen dem  $c_T$ -Wert einer Probe und dem minimalen  $c_T$ -Wert des Referenzgen-Kandidaten gebildet. Diese transformierten  $c_T$ -Werte wurden in den Algorithmus eingegeben und die Referenzgen-Kandidaten anhand der vom Algorithmus zugeordneten Stabilitätswerte sortiert. Je niedriger dieser war, umso stabiler war die Expression des Referenzgen-Kandidaten unter den Versuchsbedingungen.

Bei jeder Auswertemethode wurden die Referenzgen-Kandidaten nach ihrer Stabilität sortiert und einem Referenzgen eine entsprechende Rangfolge zugeordnet. Je niedriger dieser Rang war, umso stabiler war die Expression des Referenzgen-Kandidaten. Als Referenzgen wurde schließlich jenes Gen ausgewählt, welches unter Berücksichtigung aller Auswertemethoden den niedrigsten Wert annahm.

### **Multiplex-qRT-PCR: ARG1, ARG2 und NOS3 Genexpression nach Stimulation**

Bei dieser Methode wurden Veränderungen in der mRNA-Expression des Zielgens mit Hilfe des Referenzgens und einer Kontrollgruppe erfasst. Um geringe Änderungen besser detektieren zu können, wurde für die Sonde des Zielgens die signalintensivere FAM<sup>TM</sup>-Farbstoffmarkierung gewählt, während die Sonde für das Referenzgen mit 2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (VIC) gekoppelt war (s. Tabelle 33). Es wurde die Expression von ARG1, ARG2 und NOS3 untersucht. TBP wurde als Referenzgen verwendet.

Die Quantifizierung der Multiplex-qRT-PCR erfolgte mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta c_T}$ -Methode [56]. Für jede biologische Gruppe wurde zunächst der  $c_T$ -Mittelwert für das Ziel- und das Referenzgen berechnet. Die Bildung der Differenz zwischen dem Zielgen- $c_T$  und Referenzgen- $c_T$  ergab das  $\Delta c_T$ . Dieser Wert wurde sowohl für jede Probe als auch für die verschiedenen biologischen Gruppen berechnet.

$$\Delta c_T = c_T(\text{Zielgen}) - c_T(\text{Referenzgen})$$

[Formel 2]

Anschließend wurde auf die Kontrollgruppe normalisiert, indem von dem  $\Delta c_T$ -Wert einer Probe das  $\Delta c_T$  der  $c_T$ -Mittelwerte der Kontrollgruppe ( $\Delta \bar{c}_T$ ) abgezogen wurde:

$$\Delta\Delta c_T = \Delta c_T(\text{Probe}) - \Delta \bar{c}_T(\text{Kontrollgruppe})$$

[Formel 3]

Die Berechnung des  $2^{-\Delta\Delta c_T}$  ergab die relative Expression des Zielgens unter den Versuchsbedingungen relativ zur Kontrollgruppe. Als Kontrolle dienten EA.hy926-Zellen, die unter Normalbedingungen kultiviert wurden. Für die Stimulationsversuche mit Glucose dienten die unter Normal Glucose kultivierten EA.hy926-Zellen der jeweiligen Inkubationsdauer als Kontrollgruppe.

### 3. Protein-Analytik

#### 3.1. Probengewinnung

Die Zellen wurden mit 10 ml 4 °C kaltem DPBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale gekratzt. Die abgelösten Zellen wurden mit einer 100 µl Pipette in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß überführt und auf Eis gesetzt. Anschließend wurden sie in einer 4 °C kalten Zentrifuge für 5 min bei 1 000 rpm zentrifugiert, der Überstand unter der sterilen Werkbank abgenommen und das Zellpellet erneut auf Eis gesetzt.

Für die Messung der Arginase-Aktivität wurden die Zellen direkt im Anschluss lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Zellen, die in Western Blots untersucht wurden, und die Proben für die LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin wurden direkt nach der Gewinnung bei -80 °C eingefroren und dort für maximal zwei Monate gelagert.

#### 3.2. Zellyse und Messung der Proteinkonzentration

Der zweifach-konzentrierte Lysepuffer wurde auf Eis aufgetaut und vor der Verwendung 1:1 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt (s. Tabelle 29). Die Zellen wurden in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach der Zellyse in einem Thermoschüttler (800 rpm, 30 min, 4 °C) wurde das Lysat kurz auf Eis gesetzt und anschließend zentrifugiert (14 000 rpm, 10 min, 4 °C). Die im Überstand gelösten Proteine wurden in ein 1,5 ml Reagiergefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Analog zur Messung der RNA-Konzentration erfolgte die Messung der Proteinkonzentration mit dem IMPLEN Nanophotometer® N60. Über die Absorption einer Probe bei 280 nm wurde auf Grundlage des Lambert-Beer'schen-Gesetz die Konzentration der Proteine berechnet:

$$C = (A_{280} - A_{\text{BKG}}) \cdot \text{Factor}_{\text{prot}} \cdot D$$

**[Formel 4]**

C	Konzentration der Probe [mg/ml]
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
A <sub>BKG</sub>	Absorption bei einer als Hintergrund festgelegten Wellenlänge
Factor <sub>prot</sub>	Protein-Faktor [(g · cm)/l]
D	Verdünnungsfaktor

Es wurden die Standardeinstellungen (A<sub>BKG</sub> = 320 nm, BSA: Factor<sub>prot</sub> = 1,5 (g · cm)/l, D = 1) des Herstellers übernommen. Die Messung erfolgte in Mehrfachbestimmung. Da der Lysepuffer aufgrund der eigenen Absorption bei 280 nm nicht als Blank verwendet werden konnte, wurde stattdessen ddH<sub>2</sub>O als Blank eingesetzt. Die Proteinkonzentration des Lysepuffer wurde als separate Probe in Mehrfachbestimmung gemessen. Um letztendlich die Konzentration des Gesamtproteins einer Zellprobe

zu bestimmen, wurde die Differenz zwischen dem Mittelwert des Zellysats und dem des Lysepuffers gebildet:

$$\text{Gesamtprotein [mg/ml]} = \text{Mittelwert (Probe)} - \text{Mittelwert (Lysepuffer)}$$

**[Formel 5]**

### 3.3. Western Blot

#### Gelvorbereitung

Die Polyacrylamidgele wurden am Tag vor der Gelelektrophorese gegossen. In Abhängigkeit von der Probenanzahl wurden entweder Mini- oder Midigele vorbereitet (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Eigenschaften der verwendeten Mini- und Midigele.

	Minigel		Midigel	
<b>Stimulus</b>	Glucose		Pflanzen Pflanzen + Glucose	
<b>Breite x Länge</b>	8,30 x 7,30 cm		13,30 x 8,70 cm	
<b>Dicke</b>	0,75 mm	1,00 mm	1,00 mm	
<b>Anzahl der Taschen</b>	10	15	18	26
<b>Gesamtvolumen/ Tasche</b>	20 µl	12 µl	20 µl	15 µl

Während für Midigele leere Gekassetten verwendet wurden, erfolgte die Herstellung der Minigele unter der Nutzung einzelner Glasplatten. Eine kleine und eine große Glasplatte wurden mit Isopropanol gereinigt und zusammen mit der Halterung in die Gießvorrichtung eingespannt. Anschließend wurde die Dichtheit mit Isopropanol überprüft und mit der Vorbereitung des Trenngels begonnen. Hier richtete sich die Konzentration der Trenngele nach dem Zielprotein (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Zusammensetzung des Trenngels in Abhängigkeit vom Zielprotein. Die Mischung wurde mindestens 15 min entgast, bevor die entsprechenden Mengen an Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) hinzugefügt wurden.

Zielprotein	Arg2	eNOS
Konzentration des Trenngels	10%	8%
ddH <sub>2</sub> O, Glycerol (1:1)	5,0 ml	5,5 ml
40% Acrylamid	2,5 ml	2,0 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
10% APS	40,0 µl	40,0 µl
TEMED	10,0 µl	10,0 µl

Die entsprechenden Mengen der ddH<sub>2</sub>O-Glycerol-Mischung, Acrylamid und des Trenngelpuffers wurden in ein Becherglas pipettiert und mindestens 15 min auf einem Magnetrührer gemischt. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde die Polymerisation gestartet, sodass die Mischung nach Zugabe der beiden Substanzen zügig zwischen die Glasplatten beziehungsweise in die leere Gekassette pipettiert und zur Glättung der Oberfläche mit

Isopropanol beschichtet wurde. Die Polymerisationszeit des Trenngels betrug 30 bis 45 min. In der Zwischenzeit wurde mit der Vorbereitung des Sammelgels begonnen. Die Konzentration des Sammelgels betrug für beide Zielproteine 4% (s. Tabelle 19).

**Tabelle 19: Zusammensetzung des Sammelgels.** Die Mischung wurde mindestens 15 min entgast, bevor die entsprechenden Mengen an Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) hinzugefügt wurden.

Substanz	Volumen
ddH <sub>2</sub> O	1950 µl
40% Acrylamid	300 µl
4x Sammelgelpuffer	750 µl
1% Bromphenolblau	10 µl
10% APS	15 µl
TEMED	5 µl

ddH<sub>2</sub>O, Acrylamid, Sammelgelpuffer und Bromphenolblau wurden in ein Becherglas pipettiert und die Mischung mindestens 15 min auf einem Magnetrührer gerührt. Die Isopropanolschicht wurde nach vollständiger Polymerisation des Trenngels vorsichtig abgegossen. APS und TEMED wurden unter Rühren in den Sammelgelansatz hinzugegeben und nach kurzem Durchmischen zwischen die Glasplatten auf das ausgehärtete Trenngel pipettiert. Anschließend wurde der mit Isopropanol gereinigte Gelkamm vorsichtig eingesetzt und das Sammelgel polymerisierte aus. Nach einer Polymerisationszeit von 45 bis 60 min wurde das fertige Gel aus der Gießvorrichtung entnommen, in feuchte Papiertücher eingewickelt und, in Frischhaltefolie verpackt, über Nacht bei 4 °C gelagert.

### **SDS-Page-Gelelektrophorese**

Der Transferpuffer wurde vollständig angesetzt und bei 4 °C gelagert (s. Tabelle 29). Für den Laufpuffer wurde 10x Tris-Glycin-Puffer mit ddH<sub>2</sub>O 1:10 verdünnt und ebenfalls bei 4 °C aufbewahrt. Die bei -80 °C gelagerten Zellysate wurden auf Eis aufgetaut und der Probenmix vorbereitet. Das Gesamtvolumen richtete sich dabei nach den gegossenen Gelen und der Größe der jeweiligen Taschen (s. Tabelle 17). Unter dem Abzug wurde der 6x Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol gemischt und 3 µl des fertigen Probenpuffers in 1,5 ml Reagiergefäßen vorgelegt. Insgesamt wurde für jede Probe 30 µg Gesamtprotein eingesetzt, sodass die individuellen Volumina von ddH<sub>2</sub>O und Zellysat zu dem vorgelegten Probenpuffer pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchgemischt wurden. Der fertige Probenansatz wurde danach auf Eis gesetzt. Es folgte die Denaturierung der Proteine bei 95 °C für 5 min. Nach der Zentrifugation bei 12 000 rpm für 10 min und 4 °C wurden die Probenansätze erneut auf Eis gesetzt und mit dem Aufbau der Gelelektrophorese-Kammer begonnen. Die am Vortag vorbereiteten Gele wurden vorsichtig ausgepackt und in der Halterung in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Der Laufpufferansatz wurde mit der Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Lösung versetzt, kurz durchgemischt und bis zur Markierung in die Elektrophorese-Kammer gegossen. Danach wurde der

Gelkamm vorsichtig entfernt, die Taschen mit Laufpuffer gespült und das Gel mit 5  $\mu\text{l}$  Größenmarker und Probenansatz beladen. In leere Taschen wurden 10  $\mu\text{l}$  6x Probenpuffer/ ddH<sub>2</sub>O (1:1) pipettiert. Nach dem Beladen des Gels wurde die Elektrophorese-Kammer vorsichtig mit Laufpuffer befüllt und die Elektrophorese bei 75 V gestartet. Nach 10 bis 15 min wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Die Gesamtlaufzeit richtete sich nach dem Zielprotein und betrug für Arg2 4,5 bis 5,0 h und für eNOS 2,75 bis 3,0 h (s. Tabelle 20).

### **Proteintransfer**

Pro Gel wurden sechs Lagen Whatmann-3MM-Papier und eine Nitrocellulosemembran in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und etwas Transferpuffer in einer größeren Wanne und in mehreren kleineren Boxen vorgelegt. Die Elektrophorese wurde beendet und die Glasplatten aus der Elektrophorese-Kammer genommen. Mit Hilfe eines Spatels wurden die Glasplatten vorsichtig geöffnet und das Sammelgel mit einem Gelschaber entfernt. Zum Öffnen der vorgefertigten Gelkassetten wurden diese am Deckel der Elektrophorese-Kammer eingeklemmt und mit etwas Druck aufgebrochen. Anschließend wurde die Gelkassette mit einem Spatel vollständig geöffnet und das Sammelgel mit einem Gelschaber vom Trenngel entfernt. Das Trenngel, die Whatmann-3MM-Papiere, die Nitrocellulosemembran und die Schwämme der Blotting-Apparatur wurden 15 bis 20 min im vorgelegten Transferpuffer equilibriert. Danach wurde das equilibrierte Trenngel vorsichtig im Transferpuffer auf drei Lagen Whatmann-3MM-Papier geschoben, mit der Nitrocellulosemembran bedeckt und die anderen drei Whatmann-3MM-Papierzuschnitte daraufgelegt. Nun wurde je ein Schwamm auf und unter das äußerste Whatmann-3MM-Papier gelegt. Die Transfer-Kassette wurde geöffnet und das Transfer-Sandwich so hineingelegt, dass das Trenngel zur schwarzen Seite und die Membran zur roten Seite der Kassette zeigte (s. Abbildung 13). Mit Hilfe eines Rollers wurden Luftblasen entfernt und die Transfer-Kassette geschlossen.

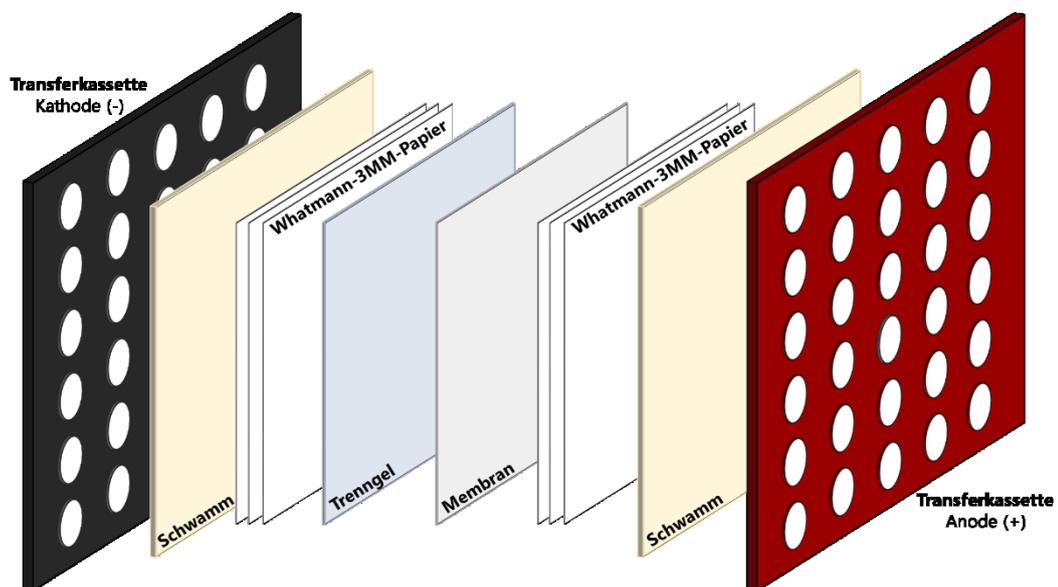


Abbildung 13: Aufbau des Transfersandwichs für den Proteintransfer.

Die leere Blotkammer wurde in eine mit Eis gefüllte Styroporbox gesetzt und etwa bis zur Hälfte mit 4 °C kaltem Transferpuffer befüllt. Das Transfer-Sandwich wurde so in die Kammer eingesetzt, dass die schwarze Seite der Transfer-Kassette zur schwarzen Seite der Transfer-Apparatur zeigte. Ein Kühlakku wurde in die Kammer eingesetzt und diese anschließend bis zur Markierung mit 4 °C kaltem Transferpuffer aufgefüllt. Der Deckel wurde auf die Kammer gesetzt, mit Eis bedeckt und der Proteintransfer bei 300 mA gestartet. Die Dauer richtete sich nach dem Zielprotein und betrug für Arg2 55 min und für eNOS 60 min (s. Tabelle 20). Am Ende des Proteintransfers wurde das Transfer-Sandwich geöffnet und die Membran 5 min in ddH<sub>2</sub>O equilibriert. Nach der zehnmütigen Färbung in Ponceau S wurde die Membran mehrmals kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und nach Entfernen der Hintergrundfarbe der Proteintransfer kontrolliert. Um die Membran mit unterschiedlichen Primärantikörpern behandeln zu können, wurde diese vor der Immundetektion geschnitten. Für die Trennung zwischen Zielprotein und Ladekontrolle diente der verwendete Größenmarker (s. Tabelle 20) als Orientierung. Für Arg2 wurde die Membran zwischen der 40 und 55 kDa-Bande geschnitten, während der Schnitt für eNOS zwischen der 70 und 100 kDa-Bande erfolgte. Da vor den Western Blots der Pflanzenstimulationen bereits gezeigt werden konnte, dass die Arginase-Aktivität unter dem Granatapfel stark anstieg, wurde dieser Membranteil zusätzlich abgetrennt. Nach dem Schneiden wurden die Membranteile 10 min in mit Tween-20 versetzter Tris-gepufferte Salzlösung (*Tris-buffered saline with Tween-20*, TBST) entfärbt.

### **Immundetektion**

Entsprechend der Angaben der Antikörper-Hersteller wurde eine 5%ige Lösung von Milchpulver (*Non-fat dry milk*, NFDM) in TBST als Blockierlösung gewählt. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte bei Raumtemperatur nach dem Entfärben der Membranen und dauerte 60 min. Nach dem Blockieren wurden die Membranen zweimal für jeweils 5 min in TBST gewaschen und danach über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Antikörperverdünnungen wurden nach den Angaben der Hersteller angesetzt (s. Tabelle 20). Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 min in TBST gewaschen und danach bei Raumtemperatur für 60 min im Sekundärantikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen zuerst dreimal für jeweils 10 min in TBST und anschließend 10 min in TBS gewaschen. Das Detektionssystem ChemiDoc™ XRS+ wurde vorbereitet und das Detektionsreagenz angesetzt. Hierzu wurden die zwei Lösungen des Detektionskits in einem braunen 1,5 ml Reagiergefäß zu gleichen Teilen miteinander vermischt und bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die zugehörigen Membranteile mit einer Pinzette auf der Glasplatte des Detektionssystems zusammengesetzt und mit Hilfe der Kamera die optimale Position der Membran gesucht. Anschließend wurde das Detektionsreagenz gleichmäßig auf die Membran pipettiert und nach einer kurzen Inkubationszeit mit der Aufnahme der Bilder begonnen. Aufgrund der kurzen Detektionszeit wurde das Bild von  $\beta$ -Tubulin zuerst aufgenommen. Mit einer Serienaufnahme wurde zunächst das Zeitfenster der optimalen Belichtungszeit gesucht und anschließend durch manuelle Eingabe die Belichtungszeit mit

dem maximalen Signal der Banden gefunden. Um das Signal des Zielproteins nicht zu überstrahlen, wurde das Membranstück der Ladekontrolle nach der Aufnahme mit einer Pinzette vorsichtig an den Rand der Glasplatte geschoben und mit der Detektion des Zielproteins fortgefahren. Im Falle der Arg2-Western Blots wurde zunächst ein Bild mit beiden Membranteilen des Zielproteins gemacht. Diese Aufnahme diente für die spätere Quantifizierung der Proteinexpression der mit dem Granatapfelextrakt-stimulierten Proben. Nachdem auch dieses Membranstück vorsichtig an den Rand der Glasplatte geschoben wurde, wurden ein weiteres Bild aufgenommen. Dieses diente zur Quantifizierung der übrigen Proben. Nach der Detektion aller Membranen wurden diese 10 min in TBS gewaschen und in Filterpapier eingewickelt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Versuchsbedingungen der Gelelektrophorese, des Proteintransfers und der Immundetektion.

	Zielprotein	Arg2	eNOS	
	<b>Größe</b>	40 kDa	133 kDa	
<b>Elektrophorese</b>	<b>Konzentration des Trenngels</b>	10%	8%	
	<b>Konzentration des Sammelgels</b>	4%	4%	
	<b>Größenmarker</b>	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	
	<b>Laufbedingungen</b>	Start: 75 V; nach 10 bis 15 min: 100 V		
	<b>Gesamtlaufzeit</b>	4,50 bis 5,00 h	2,75 bis 3,00 h	
	<b>Proteintransfer</b>	<b>Blotkonditionen</b>	300 mA	
<b>Dauer des Blots</b>		55 min	60 min	
<b>Immundetektion</b>	<b>Schneiden der Membran</b>	zwischen 40 - 55 kDa	zwischen 70 - 100 kDa	
	<b>Blockierlösung</b>	5% NFDM (in TBST)		
	<b>Blockieren</b>	60 min, Raumtemperatur		
	<b>Primärantikörper</b>	1 : 5 000	1 : 500	
		4 °C, über Nacht		
	<b>Sekundärantikörper</b>	1 : 10 000	1 : 5 000	
		60 min, RT		
	<b>Ladekontrolle</b>	<b>β-Tubulin</b>		
	<b>Größe</b>	55 kDa		
	<b>Primärantikörper</b>	1 : 5 000		
4 °C, über Nacht				
<b>Sekundärantikörper</b>	1 : 10 000			
	60 min, RT			

NFDM: Non-fat dry milk, TBST: Tris-buffered saline with Tween-20

## **Quantifizierung**

Die Intensitäten der detektierten Banden wurden quantifiziert, um Aussagen über die Proteinexpressionen treffen zu können. Hierzu wurden die Aufnahmen des Zielproteins und der Ladekontrolle in der Software ImageLab™ geöffnet und unter dem Normalization-Tool das Bild der Arg2- beziehungsweise eNOS-Membran als Target und die Aufnahme von  $\beta$ -Tubulin als *Housekeeping protein* ausgewählt. Über das *Lane and Bands*-Tool wurde zunächst für das Zielprotein die Anzahl der detektierten Banden eingegeben und das von der Software erzeugte Gitter so angepasst, dass sich alle Banden innerhalb einer einzelnen Spur befanden. Dieses Gitter wurde kopiert, in das Bild der Ladekontrolle eingefügt und überprüft, ob die Banden der Ladekontrollen innerhalb der kopierten Spur lagen. Die Anpassung des Gitters wurde so lange wiederholt, bis die Spur einer Probe sowohl die Banden der Ladekontrolle als auch die des Zielproteins erfasste. Anschließend wurden die Banden über die Software ausgewählt und fälschlicherweise erzeugte Banden gelöscht. Für alle Banden wurden die Bandenprofile überprüft und der Detektionsbereich bei Bedarf entsprechend angepasst. Die von ImageLab™ berechneten Bandenintensitäten wurden in eine Excel-Datei exportiert und für jede Probe das Verhältnis der Bandenintensität von Zielprotein und Ladekontrolle gebildet. Dieses Verhältnis wurde auf das Verhältnis der Kontrollgruppe normalisiert.

## **4. Messung der Arginase-Aktivität**

Die Messung der Arginase-Aktivität erfolgte nach einem im Jahre 1994 veröffentlichten Verfahren [57]. Diese Methode beruht auf der Reaktion von Harnstoff, welcher bei der durch die Arginase katalysierten Hydrolyse von L-Arginin entsteht, und der Substanz  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon (ISPF) (s. Abbildung 14).

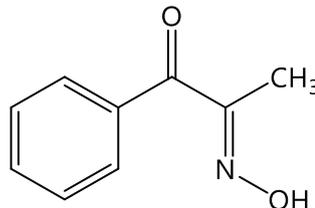
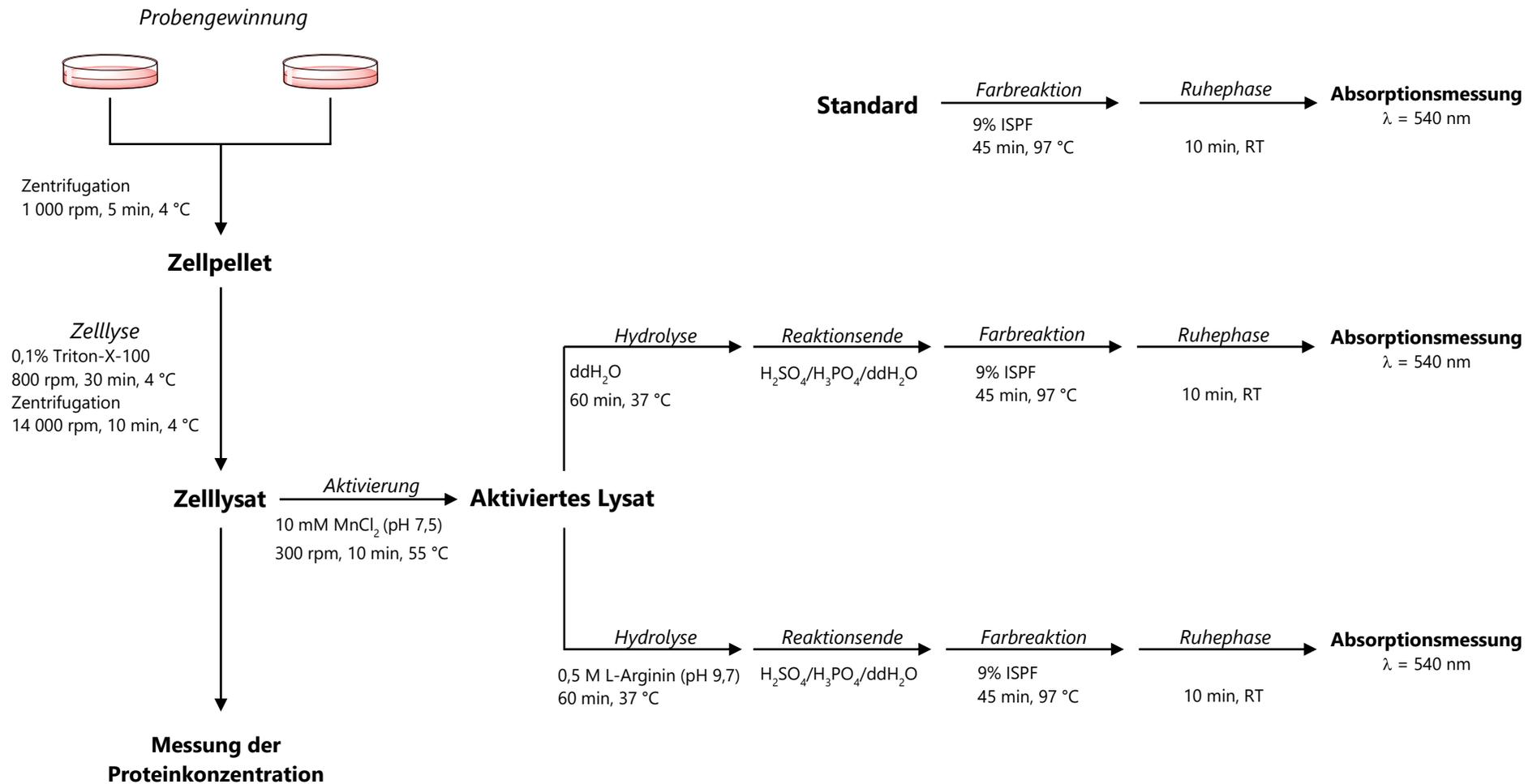


Abbildung 14: Strukturformel von  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon (ISPF).

Aufgrund der substanzspezifischen Absorption des Reaktionsprodukts bei 540 nm kann die in einem festgelegten Zeitraum gebildete Harnstoffmenge ermittelt und infolgedessen die Arginase-Aktivität einer Probe bestimmt werden. Vorversuche zeigten, dass die Aktivität in aufgetauten EA.hy926-Zellen etwa halb so groß ist als die Aktivität in Zellen, die zuvor nicht eingefroren wurden. Aus diesem Grund erfolgte die Messung der Arginase-Aktivität direkt im Anschluss an die jeweilige Stimulation. Die Proben wurden wie in Kapitel 3.1 (Material und Methoden) beschrieben gewonnen und die Proteinkonzentration bestimmt (s. Material und Methoden, Kapitel 3.2). Um die eingesetzte Proteinmenge im Assay zu erhöhen, wurden die Zellen gepoolt. Der Ablauf des Versuchs ist schematisch in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Schematischer Ablauf der Messung der Arginase-Aktivität.** Nach der Probengewinnung und Lyse der Zellen wurde die Arginase mit einer 10 mM MnCl<sub>2</sub>-Lösung (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) bei 55 °C für 10 min aktiviert. Ein Teil des aktivierten Lysats wurde 1:1 mit einer wässrigen 0,5 M L-Arginin-Lösung (pH 9,7) verdünnt und 60 min bei 37 °C inkubiert, während in einem weiteren Ansatz die gleichen Mengen an Lysat und ddH<sub>2</sub>O unter denselben Bedingungen miteinander reagierten. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Säuremischung beendet. Nach der Inkubation mit einer 9%igen  $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon (ISPF)-Lösung (in 100% Ethanol) bei 97 °C für 45 min wurde nach einer 10-minütigen Ruhephase bei Raumtemperatur (RT) die Absorption in Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und die Menge des in einer Stunde gebildeten Harnstoffs mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die im Zelllysate enthaltene Arginase unter Verwendung einer 10 mM MnCl<sub>2</sub>-Lösung (s. Tabelle 30) aktiviert. Hierzu wurden 30 µl Zelllysate mit 30 µl 10 mM MnCl<sub>2</sub>-Lösung (pH 7,50) versetzt und der Reaktionsansatz bei 55 °C für 10 min in einem Thermoschüttler bei 300 rpm inkubiert. Nach der Enzymaktivierung wurden die Proben auf Eis gesetzt. Für die nachfolgende L-Arginin-Hydrolyse wurde das aktivierte Zelllysate kurz mit einer 100 µl Pipette durchmischt und danach aufgeteilt. In einem ersten Reaktionsansatz wurden 25 µl aktiviertes Lysat zu 25 µl einer wässrigen 0,5 M L-Arginin-Lösung (pH 9,70) pipettiert und für 60 min bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert, während in einem zweiten Reaktionsansatz weitere 25 µl aktiviertes Lysat unter den gleichen Bedingungen mit 25 µl ddH<sub>2</sub>O inkubiert wurden. Nach der 60-minütigen Inkubation wurde die Hydrolyse durch Zugabe von 400 µl Säuremischung beendet und die Proben erneut auf Eis gesetzt. Es folgte die Herstellung der Harnstoff-Konzentrationsreihe ausgehend von einer 100 µg/µl-konzentrierten Harnstoff-MnCl<sub>2</sub>-Stammlösung. Die absoluten Harnstoffmengen, die zur Erstellung der Standardkurve verwendet wurden, betragen 0 µg, 1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg und 12 µg in 100 µl Endvolumen. Zu 100 µl Standardlösung wurden 400 µl Säuremischung pipettiert und die Reaktionsansätze zu den Proben auf Eis gesetzt. Um den gebildeten Harnstoff nachweisen zu können, wurde zu jedem Reaktionsansatz 25 µl einer ethanolischen 9%igen ISPF-Lösung hinzugegeben und der Ansatz abgedunkelt bei 97 °C für 45 min inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Proben 10 min abgedeckt auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss an die Ruhephase wurde jeder Reaktionsansatz einer Probe in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und die Absorption bei 540 nm gemessen.

Die Erstellung der Harnstoff-Regressionsgeraden, die Bestimmung der absoluten Harnstoffmengen [µg] pro Well und die Berechnung der Mittelwerte erfolgte mit Hilfe der systemeigenen SkanIt™-Software. Die manuell berechnete Differenz zwischen der Harnstoffmenge im Reaktionsansatz mit L-Arginin und der Harnstoffmenge im Reaktionsansatz mit ddH<sub>2</sub>O einer Probe lieferte die in einer Stunde gebildete Harnstoffmenge [µg/h]. Diese wurde auf die Gesamtproteinmenge bezogen und ergab die Arginase-Aktivität der Probe [µg Harnstoff/h/mg Protein].

$$\text{Aktivität [µg Harnstoff/h/mg Protein]} = \frac{\text{Aktivität [µg Harnstoff/h]}}{0,5 \cdot \text{Gesamtprotein [mg/ml]} \cdot 0,025 \text{ ml}}$$

**[Formel 6]**

Aufgrund der Empfindlichkeit der Methode und der daraus resultierenden starken Schwankungen der absoluten Aktivitäten wurde für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse die Aktivität auf die jeweilige Kontrolle bezogen und als relative Arginase-Aktivität [%] angegeben.

## 5. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin mittels LC-MS/MS

Mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurden folgende Metaboliten des L-Arginin-Metabolismus quantifiziert: L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin. Der Ablauf dieser Methode ist in Abbildung 16 veranschaulicht.

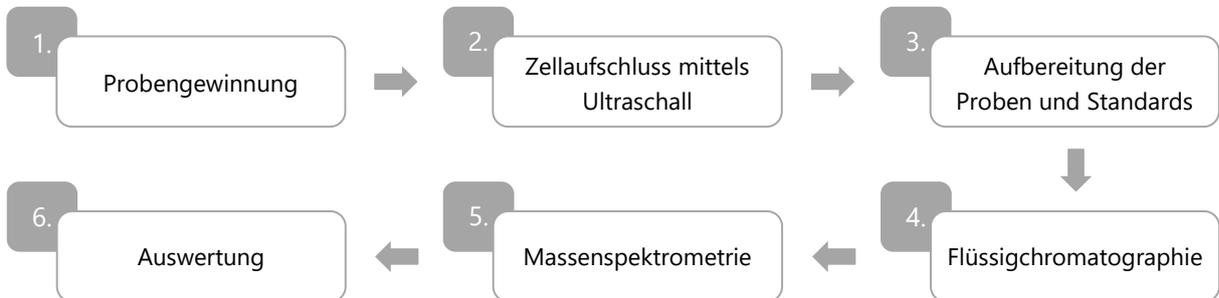


Abbildung 16: Schematischer Ablauf der LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin.

Um einen möglichen Substanzverlust während der Probenaufarbeitung auszugleichen, wurde jeder Probe zu Beginn der Aufarbeitung eine Lösung mit isotopenmarkierten Metaboliten als interne Standards zugefügt (s. Tabelle 31). Die Berechnung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin in einer Probe erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve, welche mit unterschiedlich konzentrierten Standardlösungen (s. Tabelle 21) unter Berücksichtigung des Substanzverlusts erstellt wurde. Um die Reproduzierbarkeit der Methode und die Stabilität der Messung über mehrere Platten hinweg zu beobachten, wurden zwei Kontrolllösungen verwendet. Als erste Kontrolle wurde Humanplasma eingesetzt. Das selbe Plasma wurde mit 120  $\mu\text{M}$  L-Arginin, 60  $\mu\text{M}$  L-Citrullin und 60  $\mu\text{M}$  L-Ornithin versetzt und als zweite Kontrolllösung vermessen.

### 5.1. Probengewinnung

Die Gewinnung der Proben für die massenspektrometrische Messung der L-Arginin-, L-Citrullin- und L-Ornithin-Konzentration erfolgte entsprechend der Probengewinnung für die Western Blots (s. Material und Methoden, Kapitel 3.1). Für die Messungen im Zellüberstand wurde vor dem Waschen mit DPBS aus jeder Zellschale 1 ml Nährmedium abgenommen, in ein steriles 2 ml Reagiergefäß pipettiert und dieses auf Eis gesetzt. Der Überstand wurde zusammen mit den Zellpellets bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für maximal zwei Monate gelagert.

### 5.2. Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die eingefrorenen Zellpellets wurden auf Eis gesetzt, in 75  $\mu\text{l}$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltes DPBS aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgelegten Stickstoffschockgefroren und langsam auf Eis aufgetaut. Dieser Vorgang wurde weitere zwei Male wiederholt, sodass die Zellen durch insgesamt drei „Einfrieren-Auftauen“-Zyklen lysiert wurden. Nach einer 5-minütigen Behandlung im Ultraschallbad wurde die Zellsuspension 15 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (15 000  $\times$  g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand enthielt die cytosolischen Proteine.

Mit einer 100 µl Pipette wurde dieser in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und im Anschluss die Proteinkonzentration (s. Material und Methoden, Kapitel 3.2) bestimmt. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte entweder direkt im Anschluss oder am Folgetag. Wurden Proben erst am darauffolgenden Tag für die Messung vorbereitet, wurden sie über Nacht bei -80 °C gelagert.

### 5.3. Vorbereiten der Proben und Standards

Insgesamt wurden drei Standardlösungen hergestellt, die unterschiedliche Konzentrationen der Analyten enthielten (s. Tabelle 21). Diese dienten zur Erstellung einer Regressionsgeraden, mit der die Konzentration der Metabolite berechnet werden konnte. Als Lösungsmittel diente dialysiertes Plasma.

**Tabelle 21: Standardlösungen der LC-MS/MS-Messung der L-Arginin-, L-Citrullin- und L-Ornithin-Konzentration.** Zur Herstellung der Lösungen wurde dialysiertes Plasma verwendet.

Analyt	Stammlösung	Standard 1	Standard 2	Standard 3
L-Arginin	25 mM	60 µM	120 µM	250 µM
L-Citrullin	10 mM	30 µM	60 µM	120 µM
L-Ornithin	20 mM	60 µM	120 µM	250 µM

Die Zellsate und die Überstände wurden langsam auf Eis aufgetaut. Eine 96-Well-Filterplatte (0,22 µm) wurde auf eine 96-Well-Polypropylenplatte gesetzt und 100 µl einer methanolischen Internen-Standard-Lösung (s. Tabelle 31) in jedes Well der Filterplatte pipettiert. 25 µl Probe, Standard- oder Kontrolllösung wurden zu der Internen-Standard-Lösung pipettiert und beide 96-Well-Platten 15 min bei Raumtemperatur auf einem Orbital-Schüttler bei 400 bis 500 rpm geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert (3 000 rpm, 10 min, 4 °C) und optisch kontrolliert, ob die methanolische Phase vollständig in die untere Polypropylenplatte eluiert war. Die Proben wurden auf einem 75 °C Heizblock eingedampft und die Platte nach vollständiger Verdampfung des Lösungsmittels auf Raumtemperatur abgekühlt. Je 100 µl einer 1 N butanolischen Salzsäure wurde zu jedem Well der Platte pipettiert, diese anschließend mit einer Abdeckmatte verschlossen und 30 min auf einem Heizblock auf 65 °C erwärmt. Die Platte wurde erneut auf Raumtemperatur abgekühlt, 1 min bei 2 000 rpm zentrifugiert und die Abdeckmatte entfernt. Unter dem Abzug wurde die butanolische Salzsäure bei 75 °C für etwa 60 min auf einem Heizblock vollständig verdampft. Nach Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur wurde diese mit einer Abdeckmatte verschlossen und für einen Tag bei -20 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Platte für etwa 15 bis 30 min auf Raumtemperatur erwärmt. Die Proben wurden in 110 µl Probenpuffer (s. Tabelle 31) aufgenommen, die Platte mit einer Abdeckmatte verschlossen und anschließend auf einem Orbital-Schüttler bei Raumtemperatur für 60 min bei 400 bis 500 rpm geschüttelt. Eine 96-Well-Filterplatte (0,45 µm) wurde auf eine 96-Well-Polypropylenplatte gesetzt und mit je 100 µl Probe beladen. Durch Zentrifugieren (3 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Proben in die Polypropylenplatte eluiert, diese mit einer Abdeckmatte verschlossen und die LC-MS/MS-Messung gestartet.

## 5.4. Flüssigchromatographie

10 µl der aufbereiteten Proben wurden bei 10 °C über einen Autosampler in das Gerät injiziert. Für die chromatographische Auftrennung der Metaboliten wurde eine ACQUITY UPLC BEH C18-Säule (s. Tabelle 22) verwendet. Diese wurde auf 40 °C erwärmt.

**Tabelle 22: Eigenschaften der in der LC-MS/MS-Messung verwendeten Säule.** Zur Auftrennung der Proben wurde die ACQUITY UPLC BEH C18-Säule von Waters Corporation (Milford, US) verwendet.

<b>Chemie</b>	C18
<b>Art der Trennung</b>	Umkehrphase
<b>Partikeltechnologie</b>	Ethylen Bridged Hybrid
<b>Partikelgröße</b>	1,7 µm
<b>Porendurchmesser</b>	130 Å
<b>Säulengröße</b>	2,1 mm x 50,0 mm

Das für die Probenauftrennung verwendete Fließmittel setzte sich aus 0,1% Ameisensäure in LC-MS-H<sub>2</sub>O (Fließmittel A) und 0,1% Ameisensäure in LC-MS-Acetonitril (Fließmittel B) zusammen. Das Mischverhältnis der beiden Fließmittel änderte sich zeitabhängig im Laufe einer Messung. Die Einstellungen des Fließmittelgradienten sind in Tabelle 23 aufgeführt. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Eine Messung dauerte 2,80 min.

**Tabelle 23: Einstellung des Fließmittelgradienten der LC-MS/MS-Messung der Konzentrationen von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin.**

Für die Messung wurden zwei Fließmittel kombiniert. Fließmittel A enthielt 0,1% Ameisensäure in LC-MS-H<sub>2</sub>O, Fließmittel B 0,1% Ameisensäure in Acetonitril. Die prozentuale Zusammensetzung änderte sich zeitabhängig im Laufe einer Messung. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Eine Messung dauerte 2,80 min.

<b>Stufe</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Fließmittel A [%]</b>	<b>Fließmittel B [%]</b>
1	0,0	95,0	5,0
2	0,3	95,0	5,0
3	0,6	30,0	70,0
4	1,1	30,0	70,0
5	1,4	95,0	5,0
6	2,8	95,0	5,0

## 5.5. Massenspektrometrie

Nach der Auftrennung wurde der Flüssigkeitsstrom in das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer geleitet und die Analyten in der Ionenquelle durch positive Elektronenspray-Ionisation ionisiert. Als Trägergas wurde Stickstoff (500 °C, 650 l/h) eingesetzt. Anhand ihres unterschiedlichen Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) wurden die Analyten im Massenanalysator getrennt. Durch die Kollision mit Argon wurde jeder Analyt in ein Tochter-Ion mit einem spezifischen  $m/z$ -Verhältnis fragmentiert (s. Tabelle 24). Dieses wurde in einem weiteren Massenanalysator separiert und schließlich im Detektor detektiert.

Tabelle 24: Massenübergänge ( $m/z$ ) der detektierten Analyten.

Analyt	Massenübergang $m/z$ Mutter-Ion → $m/z$ Tochter-Ion
$^2\text{H}_7$ -Arginin	238,15 → 77,10
L-Arginin	231,20 → 70,20
	231,20 → 172,15
$^{13}\text{C}^2\text{H}_4$ -Citrullin	237,15 → 75,20
L-Citrullin	232,15 → 70,20
$^2\text{H}_6$ -Ornithin	195,10 → 76,20
L-Ornithin	189,10 → 70,22

## 5.6. Auswertung

Die Berechnung der Peakflächen (*area under the curve*, AUC) erfolgte mit der Software MassLynx™. Diese wurde für jede Probe (einschließlich der Standardlösungen) mit der AUC des zugehörigen internen Standards ins Verhältnis gesetzt. Die Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin wurde im Anschluss über die Standardkurve berechnet. Diese wurde für das Zelllysate und den Überstand jeweils auf die Gesamtproteinmenge bezogen und ergab die Analyt-Konzentration in  $\mu\text{mol/g}$  Protein.

## 6. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism Version 8.4.3 für das Windows-Betriebssystem verwendet.

Da aufgrund der geringen Probenzahl nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte, wurde der Mann-Whitney U-Test für die statistische Auswertung verwendet. Dieser zweiseitige, nichtparametrische t-Test vergleicht die Rangsummen zweier Gruppen miteinander. Ergab sich hierbei ein p-Wert kleiner als 0,05, wurde der Unterschied zwischen zwei Gruppen als statistisch signifikant anerkannt.

## 7. Material

### 7.1. Antikörper

In Tabelle 25 sind die Primär- und Sekundärantikörper gelistet, welche in den Western Blots verwendet wurden. Die Antikörperverdünnungen wurden nach den Angaben der Hersteller in 5%iger Milchlösung in TBST angesetzt.

**Tabelle 25: Primär- und Sekundärantikörper, welche in den Western Blots verwendet wurden.** Alle Verdünnungen wurden mit 5%iger Milchlösung (in TBST) angesetzt.

Antigen	Biologische Quelle	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
anti-mouse	Ziege	1 : 5 000	115-035-146	Dianova GmbH (Hamburg, D)
anti-rabbit	Ziege	1 : 10 000	A0545	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Arg2	Kaninchen	1 : 5 000	ab137069	Abcam plc. (Cambridge, UK)
β-Tubulin	Kaninchen	1 : 5 000	ab6046	Abcam plc. (Cambridge, UK)
eNOS	Maus	1 : 500	ab76198	Abcam plc. (Cambridge, UK)

*Arg2: Arginase 2, eNOS: endotheliale NO-Synthase*

### 7.2. Kits

In Tabelle 26 sind die verwendeten Kits aufgeführt.

**Tabelle 26: Aufstellung des verwendeten Kits.**

Name	Katalognummer	Hersteller	Verwendung
Amersham™ ECL™ Prime Western-Blot-Detektionsreagenz	RPN2232	Cytiva (Malborough, US)	Immundetektion
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Applied Biosystems™/ ThermoFisher Scientific (Waltham, US)	cDNA-Synthese
Mycoplasma PCR Detection Kit	ab289834	Abcam plc. (Cambridge, UK)	Test auf Mykoplasmen
PureLink™ DNase Set	12185010	Invitrogen™/ ThermoFisher Scientific (Waltham, US)	RNA-Isolation
PureLink™ RNA Mini Kit	12183018A	Invitrogen™/ ThermoFisher Scientific (Waltham, US)	RNA-Isolation
Trizol™ Plus RNA Purification Kit	A33254	Invitrogen™/ ThermoFisher Scientific (Waltham, US)	RNA-Isolation

### 7.3. Nährmedien, Lösungen, Puffer

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Tabellen beinhalten die Zusammensetzungen der verwendeten Nährmedien, Lösungen und Puffer.

Tabelle 27: Zusammensetzung der Nährmedien, die zur Kultivierung und Stimulierung der EA.hy926-Zellen verwendet wurden.

Nährmedium	Zusammensetzung
High Glucose-Nährmedium (25,0 mM Glucose)	500 ml DMEM (1 g/l Glucose) 55,5 ml FBS 50 000 U Penicillin 50 mg Streptomycin 2,28 g Glucose-Monohydrat
Normal Glucose-Nährmedium (5,5 mM Glucose)	500 ml DMEM (1 g/l Glucose) 55,5 ml FBS 50 000 U Penicillin 50 mg Streptomycin

Tabelle 28: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Analyse der mRNA eingesetzt wurden.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
1% Agarose-Gel	0,7 g Agarose Standard, RNase-frei 63,0 ml ddH <sub>2</sub> O 7,0 ml 5x TBE -Puffer, RNase-frei
DNase-Reaktionsmix (Zusammensetzung pro Reaktion)	8 µl 10x DNase I Reaction Buffer 10 µl Gelöste PureLink™ DNase (3 U/µl) 62 µl RNase-freies H <sub>2</sub> O
2x MasterMix (Volumen pro Reaktion)	2,0 µl 10x RT Buffer 0,8 µl 25x dNTP Mix 2,0 µl 10x RT Random Primer 4,2 µl Nuklease-freies H <sub>2</sub> O 1,0 µl MultiScribe Reverse Transcriptase
5x TBE RNA-Puffer pH 8,00	54,0 g Tris-Base 27,5 g Borsäure 20,0 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 29: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Analyse der Proteine (Western Blot) verwendet wurden.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
10% APS	50 mg Ammoniumpersulfat ad 500 µl mit ddH <sub>2</sub> O
5% Blockierlösung	5 g Milchpulver 20 ml TBST
ddH <sub>2</sub> O/ Glycerol (1:1)	50 ml ddH <sub>2</sub> O 50 ml Glycerol
1x Laufpuffer	100 ml 10x Tris-Glycin-Puffer ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O  + 5 ml 20% SDS
2x Lysepuffer	10 µl Triton-X-100 1 Tablette cOmplete™ ULTRA 5 ml ddH <sub>2</sub> O  Vor jeder Verwendung wurde der 2x Lysepuffer 1:1 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnt.

Tabelle 29 (Fortsetzung): Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Analyse der Proteine (Western Blot) verwendet wurden.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Ponceau-S	0,1 g Ponceau S 5,0 ml Essigsäure ad 100,0 ml mit ddH <sub>2</sub> O
6x Probenpuffer	187,50 mM Tris-HCl (pH 6,80) 60,00% Glycerol 6,00% SDS 0,01% Bromphenolblau 15,00% β-Mercaptoethanol  Vor der Verwendung wurde die benötigte Menge mit 15% β-Mercaptoethanol versetzt (Ansatz: n+1).
4x Sammelgelpuffer („Upper Tris“) pH 6,80-6,87	6,06 g Tris-Base 2 ml 20% SDS ad 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O  Der pH wurde mit 4 N HCl eingestellt.
20% SDS	20 g Natriumdodecylsulfat ad 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O
10x TBS pH 7,50	48,4 g Tris-Base 163,6 g NaCl 1500 ml ddH <sub>2</sub> O pH 7,5 mit 4 N HCl einstellen  ad 2000 ml mit ddH <sub>2</sub> O
1x TBST	50 ml 10x TBS 0,5 ml Tween-20 ad 500 ml mit ddH <sub>2</sub> O
1x Transferpuffer	100 ml 10x Tris-Glycin-Puffer 200 ml Methanol ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O
4x Trenngelpuffer („Lower Tris“) pH 8,80	18,17 g Tris-Base 2 ml 20% SDS ad 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O  Der pH wurde mit 4 N HCl eingestellt.
10x Tris-Glycin-Puffer pH 8,30	30,3 g Tris-Base 144,1 g Glycin ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 30: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Messung der Arginase-Aktivität verwendet wurden.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
0,5 M L-Arginin-Lösung pH 9,70	871 mg L-Arginin 10 ml ddH <sub>2</sub> O  Der pH wurde bei Raumtemperatur mit 2 N NaOH und 4 N HCl eingestellt.
100 µg/µl Harnstoff-Stammlösung	100 mg Harnstoff 1 ml 10 mM MnCl <sub>2</sub> -Lösung
9% ISPF	2,25 g ISPF 25 g Ethanol, 100%
10 mM MnCl <sub>2</sub> -Lösung pH 7,50	39,58 mg MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O 20 ml 50 mM Tris-HCl-Lösung  Der pH wurde am Versuchstag bei Raumtemperatur mit 2 N NaOH eingestellt.

Tabelle 30 (Fortsetzung): Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Messung der Arginase-Aktivität verwendet wurden.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Säuremischung	25 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 96% 75 ml H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 85% 175 ml ddH <sub>2</sub> O
50 mM Tris-HCl-Lösung	1576 mg Tris-HCl 200 ml ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 31: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, welche bei der Messung der LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin eingesetzt wurden.

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Butanolische Salzsäure	900 ml Butanol 100 ml Acetylchlorid
Interner Standard	20,0 µM <sup>2</sup> H <sub>7</sub> -Arginin 7,5 µM <sup>13</sup> C <sup>2</sup> H <sub>4</sub> -Citrullin 12,5 µM <sup>2</sup> H <sub>6</sub> -Ornithin  Alle Substanzen wurden in 99,95% LC-MS-Methanol gelöst.
Probenpuffer pH 5,00	75,0% LC-MS-ddH <sub>2</sub> O 25,0% LC-MS-Methanol 0,1% LC-MS-Ameisensäure  Der pH wurde bei Raumtemperatur mit 25% Ammoniakwasser eingestellt.

## 7.4. Software

In Tabelle 32 sind die verwendeten Computerprogramme aufgeführt.

Tabelle 32: Aufstellung der verwendeten Software.

Programm	Hersteller	Anwendung
ChemDraw 21.0.0	PerkinElmer Informatics, Inc. (Waltham, US)	Erstellung von Abbildungen
GraphPad Prism 8.4.3	GraphPad Software, Inc. (San Diego, US)	Graphische Darstellung der Daten und statistische Auswertung
ImageLab™ 5.2.1	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Detektion der Agarosegele, Detektion und Quantifizierung der Western Blots
MassLynx™ 4.2	Waters Corporation (Milford, US)	LC-MS/MS-Messung und Auswertung
Microsoft 365	Microsoft Corporation (Redmond, US)	Manuelle Auswertung der Versuche und Erstellung von Abbildungen
Microsoft Office Professional Plus 2013	Microsoft Corporation (Redmond, US)	Manuelle Auswertung der Versuche und Erstellung von Abbildungen
QuantStudio™ Design & Analysis 1.4.3	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, US)	Quantitative Real-Time Polymerase- Kettenreaktion
Skantl RE 6.0.2.3	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, US)	Messung der Arginase-Aktivität

## 7.5. TaqMan®-Genexpressionsassays

In Tabelle 33 sind die verwendeten TaqMan®-Genexpressionsassays gelistet. Diese wurden von ThermoFisher Scientific, Inc. (Waltham, US) bezogen.

**Tabelle 33: TaqMan®-Genexpressionsassays, welche bei der Analyse der Genexpression verwendet wurden.** Die mit dem Farbstoff VIC™ markierte Sonde wurde für das Referenzgen in der Multiplex-qRT-PCR verwendet.

Zielgen		Assay	Farbstoffmarkierung
18S ribosomal RNA	<i>18S</i>	Hs03003631_g1	FAM™
β-Actin	<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1	FAM™
Arginase 1	<i>ARG1</i>	Hs00968979_m1	FAM™
Arginase 2	<i>ARG2</i>	Hs00982833_m1	FAM™
β <sub>2</sub> -Mikroglobulin	<i>B2M</i>	Hs00187842_m1	FAM™
Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	<i>NOS3</i>	Hs01574665_m1	FAM™
Peptidylprolylisomerase A	<i>PPIA</i>	Hs04194521_s1	FAM™
Pumilio RNA binding family member 1	<i>PUM1</i>	Hs00472881_m1	FAM™
Ribosomal Protein L13a	<i>RPL13A</i>	Hs04194366_g1	FAM™
Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A	<i>SDHA</i>	Hs00188166_m1	FAM™
TATA-Box-Bindeprotein	<i>TBP</i>	Hs00427620_m1	FAM™
			VIC™
Ubiquitin C	<i>UBC</i>	Hs05002522_g1	FAM™

FAM™: 6-Carboxyfluorescein, VIC™: 2'-Chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein

## Ergebnisse

### 1. Glucose-Stimulation von EA.hy926-Zellen

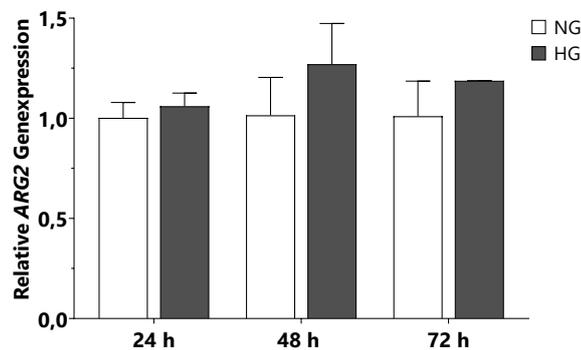
#### 1.1. ARG1, ARG2 und NOS3 Genexpression

##### ARG1

Das ARG1-Gen war in EA.hy926-Zellen nicht exprimiert. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Experimente zu Arginase 1 durchgeführt.

##### ARG2

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der Genexpressionsanalyse von ARG2 in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose unter Normal (NG) und High Glucose (HG).

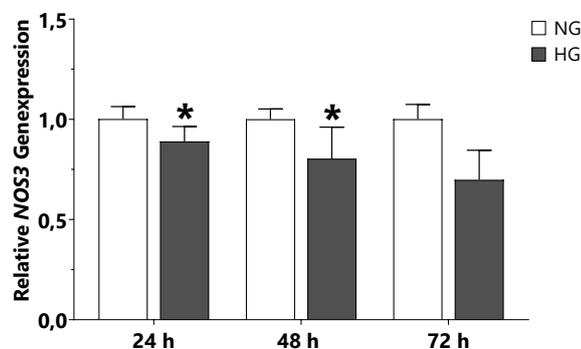


**Abbildung 17: Relative ARG2 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression von Arginase 2 (ARG2) untersucht und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) wurde als Referenzgen verwendet. Angabe der Mittelwerte der relativen mRNA-Expression  $\pm$  SD (n = 6; Ausnahme 72 h NG: n = 3, 72 h HG: n = 2). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (p < 0,05). ARG2: Arginase 2, HG: High Glucose, NG: Normal Glucose, TBP: TATA-Box-Bindeprotein

Unabhängig von der Dauer der Stimulation wurde die ARG2 Genexpression im Vergleich zur jeweiligen NG-Kontrolle nicht signifikant verändert (24 h:  $1,06 \pm 0,07$ ; 48 h:  $1,27 \pm 0,20$ ; 72 h:  $1,19 \pm 0,00$ ).

##### NOS3

Das Ergebnis der Analyse der NOS3 Genexpression nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Glucose ist in Abbildung 18 dargestellt.



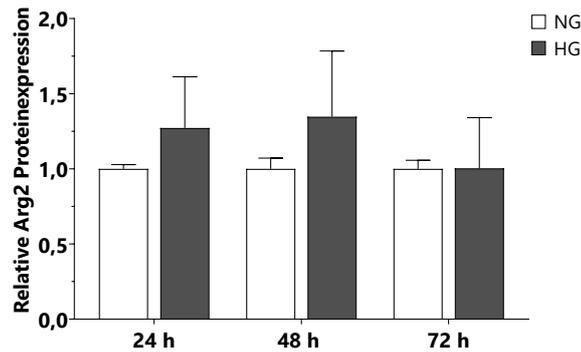
**Abbildung 18: Relative NOS3 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression der endothelialen NO-Synthase (NOS3) untersucht und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) wurde als Referenzgen verwendet. Angabe der Mittelwerte der relativen Expression  $\pm$  SD (n = 6; Ausnahme 72 h NG: n = 3, 72 h HG: n = 2). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (\* p < 0,05). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose, NOS3: endotheliale NO-Synthase, TBP: TATA-Box-Bindeprotein

Im Vergleich zur jeweiligen NG-Kontrolle wurde *NOS3* nach 24 h ( $0,89 \pm 0,07$ ;  $p = 0,0411$ ) und nach 48 h ( $0,80 \pm 0,16$ ;  $p = 0,0260$ ) signifikant reduziert exprimiert. Nach 72 h war die *NOS3* Genexpression nicht signifikant verändert ( $0,70 \pm 0,15$ ).

## 1.2. Arg2 und eNOS Proteinexpression

### Arg2

In Abbildung 19 ist das Ergebnis der Western Blots von Arg2 nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Glucose dargestellt.

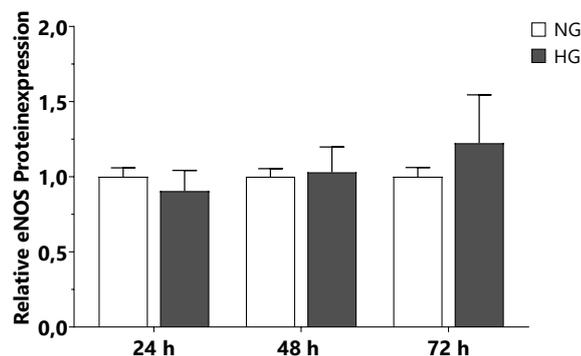


**Abbildung 19: Relative Arg2 Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die Proteinexpression der Arginase 2 (Arg2) wurde mittels Western Blot mit  $\beta$ -Tubulin als Ladekontrolle untersucht und das Verhältnis der Bandenintensitäten auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Proteinexpression  $\pm$  SD ( $n = 6$ ; Ausnahme 48 h NG:  $n = 5$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test ( $p < 0,05$ ). Arg2: Arginase 2, HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Unabhängig von der Stimulationsdauer wurde die Arg2 Proteinexpression im Vergleich zur jeweiligen NG-Kontrolle nicht signifikant verändert (24 h:  $1,27 \pm 0,34$ ; 48 h:  $1,35 \pm 0,44$ ; 72 h:  $1,00 \pm 0,34$ ).

### eNOS

Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der Western Blots von eNOS in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.

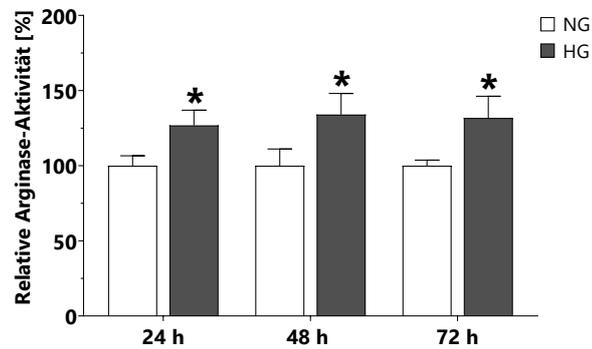


**Abbildung 20: Relative eNOS Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) wurde mittels Western Blot mit  $\beta$ -Tubulin als Ladekontrolle untersucht und das Verhältnis der Bandenintensitäten auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Proteinexpression  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test ( $p < 0,05$ ). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose, eNOS: endotheliale NO-Synthase

Unabhängig von der Stimulationsdauer wurde die eNOS Proteinexpression im Vergleich zur jeweiligen NG-Kontrolle nicht signifikant verändert (24 h:  $0,91 \pm 0,14$ ; 48 h:  $1,03 \pm 0,17$ ; 72 h:  $1,22 \pm 0,32$ ).

### 1.3. Arginase-Aktivität

Das Ergebnis der Messung der Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose ist in Abbildung 21 dargestellt.



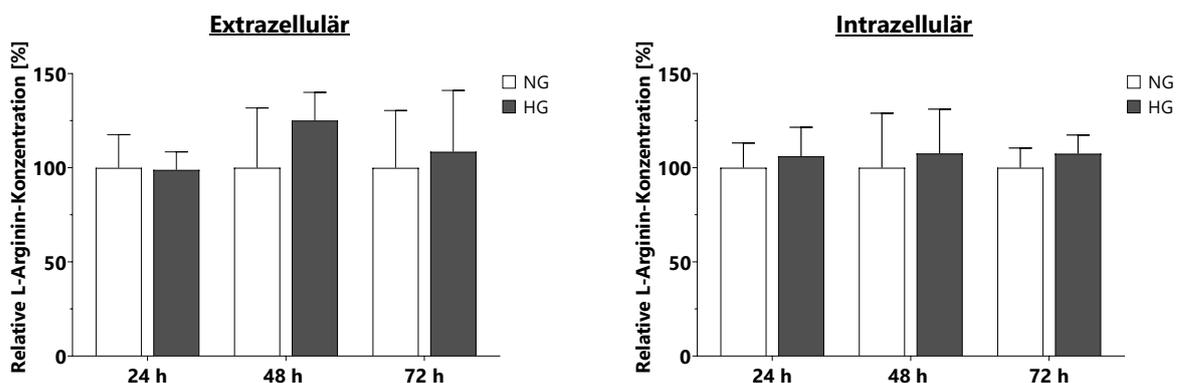
**Abbildung 21: Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die Arginase-Aktivität wurde spektrophotometrisch gemessen und die absoluten Aktivitäten auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Aktivität [%] ± SD (n = 8). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (\* p < 0,05). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Unabhängig von der Dauer der Stimulation nahm die relative Arginase-Aktivität im Vergleich zur jeweiligen NG-Kontrolle signifikant zu. Nach 24 h stieg diese auf  $126,8 \pm 10,1\%$  ( $p = 0,0006$ ), nach 48 h auf  $134,0 \pm 14,0\%$  ( $p = 0,0019$ ) und nach 72 h auf  $131,8 \pm 14,4\%$  ( $p = 0,0002$ ).

### 1.4. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin

#### L-Arginin

Abbildung 22 zeigt die extra- und intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Glucose.

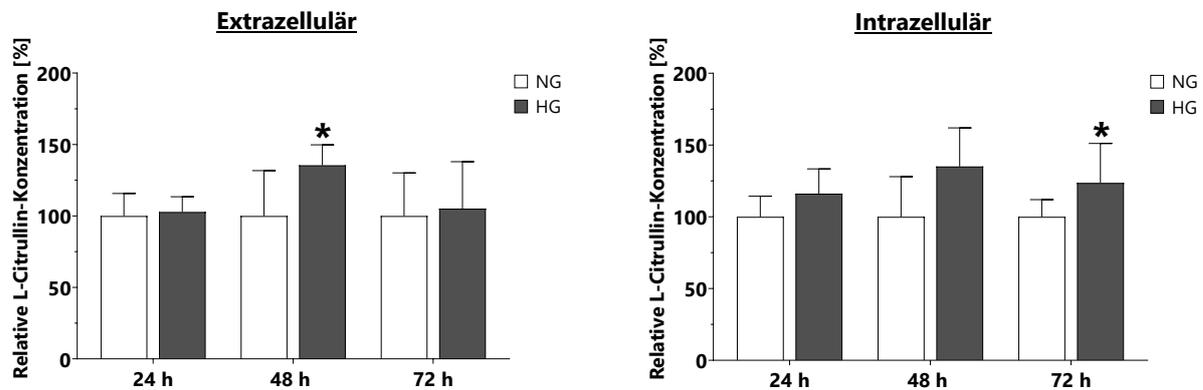


**Abbildung 22: Extra- und intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Arginin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen L-Arginin-Konzentration [%] ± SD (n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (p < 0,05). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Unabhängig von der Dauer der Glucose-Stimulation wurden weder die extra- noch die intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration signifikant verändert.

### **L-Citrullin**

Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der L-Citrullin-Konzentration nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Glucose.

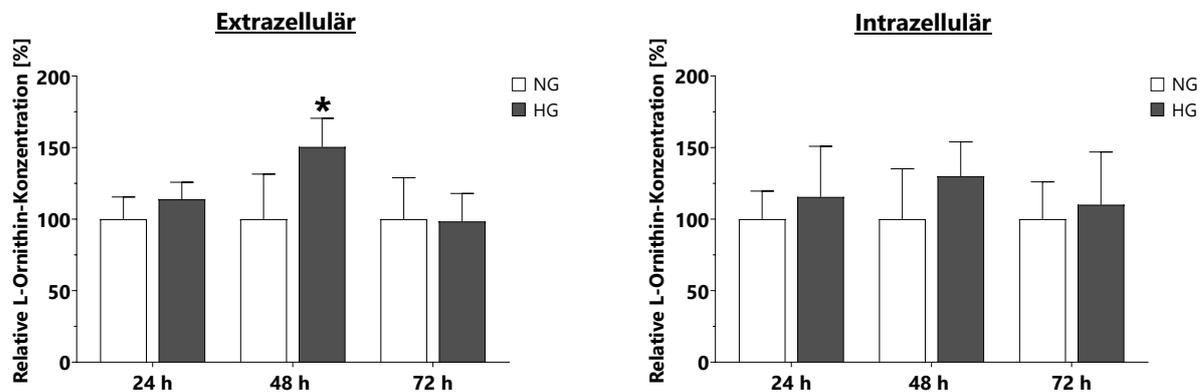


**Abbildung 23: Extra- und intrazelluläre relative L-Citrullin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen L-Citrullin-Konzentration [%] ± SD (n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (\* p < 0,05). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Im Vergleich zur jeweiligen NG-Kontrolle stieg die L-Citrullin-Konzentration extrazellulär nach 48 h signifikant auf 135,5 ± 14,3% (p = 0,0411) und intrazellulär nach 72 h auf 123,6 ± 27,5% (p = 0,0411).

### **L-Ornithin**

Abbildung 24 zeigt das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der L-Ornithin-Konzentration nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Glucose.



**Abbildung 24: Extra- und intrazelluläre relative L-Ornithin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen L-Ornithin-Konzentration [%] ± SD (n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (\* p < 0,05). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Im Vergleich zur jeweiligen NG-Kontrolle stieg die L-Ornithin-Konzentration extrazellulär nach 48 h signifikant auf 150,5 ± 19,9% (p = 0,0043). Intrazellulär änderte sich die Konzentration von L-Ornithin infolge der Glucose-Stimulation nicht signifikant.

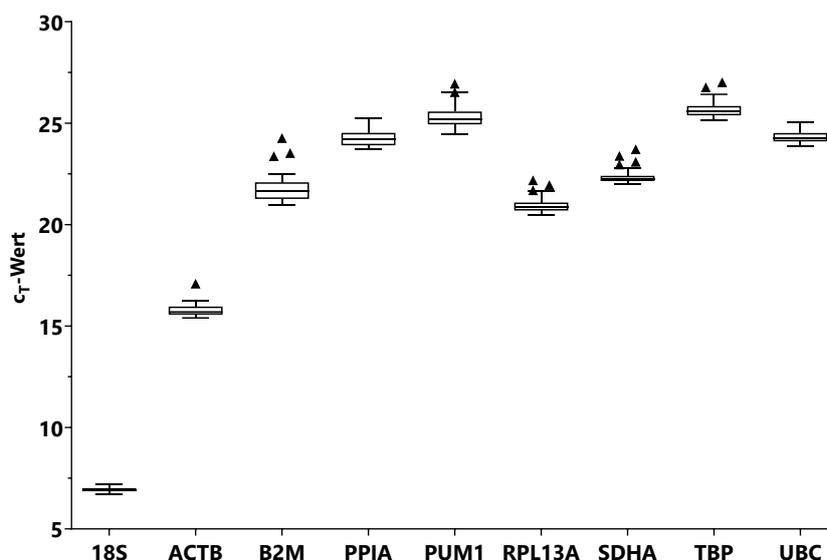
## 2. Stimulation von EA.hy926-Zellen mit einzelnen Pflanzenextrakten

Unter Berücksichtigung der bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse wurde ein Zeitrahmen von 48 h als Inkubationsdauer für die nachfolgenden Versuche ausgewählt, da die beobachteten Glucose-Effekte in EA.hy926-Zellen zu diesem Zeitpunkt am stärksten ausgeprägt waren. Das *ARG1*-Gen war auch der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal Glucose nicht in EA.hy926-Zellen exprimiert. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Experimente zu Arginase 1 durchgeführt.

### 2.1. Bestimmung des Referenzgens

#### $c_T$ -Mittelwert und Variationskoeffizient

Zu Beginn der Analyse wurde die Verteilung der  $c_T$ -Werte der Referenzgen-Kandidaten betrachtet. Diese ist in Form eines Box-Plots in Abbildung 25 dargestellt. Die sogenannte „Box“ repräsentiert dabei den Abstand zwischen dem 0,25-Quartil und dem 0,75-Quartil, sodass 50% der Werte innerhalb dieser Box liegen. Die T-förmigen Whisker begrenzen den oberen und unteren Bereich bis zum 1,5-fachen des Interquartilsabstands (Darstellung nach Tukey).  $c_T$ -Werte, die außerhalb dieses Bereichs liegen, sind als Ausreißer entsprechend gekennzeichnet.



**Abbildung 25:**  $c_T$ -Werte der Referenzgen-qRT-PCR nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten. EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70  $\mu\text{g/ml}$  Ginseng (gelöst in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginkgo, 150  $\mu\text{g/ml}$  Granatapfel, 50  $\mu\text{g/ml}$  Mariendistel, 100  $\mu\text{g/ml}$  Olive und 15  $\mu\text{g/ml}$  Roskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und ohne Pflanzenextrakte unter 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression von neun Referenzgen-Kandidaten untersucht ( $n = 31$ ). Box-Plot-Darstellung der  $c_T$ -Werte nach Tukey ( $\blacktriangle$ : Ausreißer). 18S: 18S ribosomal RNA, ACTB:  $\beta$ -Actin, B2M:  $\beta_2$ -Mikrotubulin,  $c_T$ : cycle threshold, PPIA: Peptidylprolylisomerase A, PUM1: Pumilio RNA binding family member 1, RPL13A: Ribosomal Protein L13a, SDHA: Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A, TBP: TATA-Box-Bindeprotein, UBC: Ubiquitin C

Mit Ausnahme von 18S und ACTB, lagen die  $c_T$ -Werte der Referenzgen-Kandidaten zwischen 20 und 26. Die  $c_T$ -Werte von 18S befanden sich in einem Bereich um 7, die von ACTB zwischen 15 und 16. Die Streuung der  $c_T$ -Werte war für 18S am geringsten und für B2M am größten. Die Datensätze einiger Referenzgen-Kandidaten enthielten Werte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands lagen. Bei ACTB war ein Ausreißer vorhanden, für PUM1 und TBP waren es zwei. B2M und RPL13A zeigten drei und SDHA mit einer Anzahl von vier die meisten Ausreißer. Auffällig war hierbei, dass mit Ausnahme von

*ACTB* alle Ausreißer Proben waren, die mit dem Ginkgo-Extrakt stimuliert wurden. Die Datensätze von *ACTB*, *RPL13A* und *SDHA* beinhalteten jeweils einen Ausreißer aus der Kontrollgruppe (NG).

Ziel- und Referenzgen sollten idealerweise ähnlich stark exprimiert sein, damit die in der qRT-PCR vorliegende Transkriptmenge und die Kinetik der Reaktion für beide Gene ungefähr gleich sind [58]. *18S* schied aus diesem Grund bereits zu Beginn der Analyse als Referenzgen aus. Auch *ACTB* war verglichen mit *ARG2* zu stark in EA.hy926-Zellen exprimiert, als dass es als Referenzgen verwendet werden konnte. *PPIA*, *PUM1*, *TBP* und *UBC* wurden im Vergleich zu *ARG2* und *NOS3* ähnlich stark exprimiert.

Nach diesem ersten Überblick über die allgemeine Verteilung der  $c_T$ -Werte wurden anschließend Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet und die Referenzgen-Kandidaten nach der Größe ihres Variationskoeffizienten geordnet [59]. Der Variationskoeffizient wird auch als „relative Variabilität“ bezeichnet und gibt den prozentualen Anteil der Standardabweichung vom Mittelwert an [60]. Bezogen auf die Stabilität der Genexpression bedeutet das, dass der Variationskoeffizient umso größer ist, je instabiler ein Gen exprimiert wird. In Tabelle 34 sind die berechneten Werte zusammengefasst.

**Tabelle 34:  $c_T$ -Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Referenzgen-Kandidaten.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und ohne Pflanzenextrakte unter 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression von neun Referenzgen-Kandidaten untersucht. Für jedes Referenzgen wurden Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (CV%) der Zykluszahl berechnet, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt (*cycle threshold*,  $c_T$ ) (n = 31).

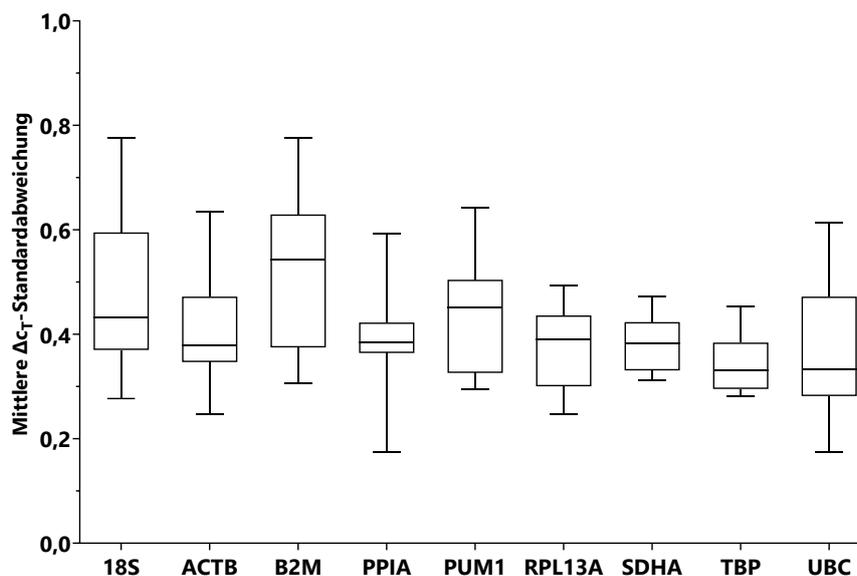
Referenzgen	$c_T$ -Mittelwert	SD	CV%	Rang
<b>UBC</b>	24,33	0,29	1,20	<b>1</b>
<b>PPIA</b>	24,23	0,39	1,61	<b>2</b>
<b>TBP</b>	25,69	0,43	1,67	<b>3</b>
<b>18S</b>	6,94	0,12	1,74	<b>4</b>
<b>SDHA</b>	22,38	0,39	1,76	<b>5</b>
<b>RPL13A</b>	20,98	0,42	1,98	<b>6</b>
<b>ACTB</b>	15,78	0,34	2,17	<b>7</b>
<b>PUM1</b>	25,30	0,61	2,41	<b>8</b>
<b>B2M</b>	21,83	0,75	3,45	<b>9</b>

*18S*: 18S ribosomal RNA, *ACTB*:  $\beta$ -Actin, *B2M*:  $\beta_2$ -Mikrotubulin,  $c_T$ : cycle threshold, CV%: Variationskoeffizient, *PPIA*: Peptidylprolylisomerase A, *PUM1*: Pumilio RNA binding family member 1, *RPL13A*: Ribosomal Protein L13a, *SD*: Standardabweichung, *SDHA*: Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A, *TBP*: TATA-Box-Bindeprotein, *UBC*: Ubiquitin C

Mit einem  $c_T$ -Mittelwert von 24,33 und einer Standardabweichung von 0,29 hatte *UBC* den kleinsten Variationskoeffizienten. Dieser betrug 1,20%. Die Variationskoeffizienten von *PPIA*, *TBP*, *18S* und *SDHA* lagen mit 1,61%, 1,67%, 1,74% und 1,76% sehr nahe beieinander. Darauf folgten mit Variationskoeffizienten von 1,98%, 2,17% und 2,41% die Referenzgen-Kandidaten *RPL13A*, *ACTB* und *PUM1*. Der Variationskoeffizient von *B2M* war mit 3,45% von allen Referenzgen-Kandidaten am größten.

### Pairwise- $\Delta c_T$

In einer weiteren Analyse wurden gemäß Silver et al. aus den verschiedenen Referenzgen-Kandidaten Paare gebildet und die Differenz ihrer  $c_T$ -Werte ( $\Delta c_T$ ) berechnet [54]. Ausgehend von dem  $\Delta c_T$ -Mittelwert der Referenzgen-Paare wurde für jeden Referenzgen-Kandidaten die mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung berechnet. In Abbildung 26 sind die mittleren  $\Delta c_T$ -Standardabweichungen der Referenzgen-Kandidaten in Form eines Box-Plots dargestellt. Dabei repräsentiert die Box 50% eines Datensatzes. Die T-förmigen Whisker stellen den Bereich von der minimalen bis zur maximalen  $\Delta c_T$ -Standardabweichung dar („Min-to-Max“-Darstellung). Eine detaillierte Datentabelle mit den berechneten Werten befindet sich im Anhang dieser Arbeit (s. Tabelle 38).



**Abbildung 26: Mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung der Referenzgen-Kandidaten.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70  $\mu\text{g/ml}$  Ginseng (gelöst in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginkgo, 150  $\mu\text{g/ml}$  Granatapfel, 50  $\mu\text{g/ml}$  Mariendistel, 100  $\mu\text{g/ml}$  Olive und 15  $\mu\text{g/ml}$  Roskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und ohne Pflanzenextrakte unter 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Nach der qRT-PCR wurde für jedes Referenzgen-Paar die Differenz der  $c_T$ -Werte ( $\Delta c_T$ ) und für jeden Referenzgen-Kandidaten die mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung berechnet ( $n = 31$ ). Box-Plot-Darstellung der mittleren  $\Delta c_T$ -Standardabweichung (Min zu Max). 18S: 18S ribosomal RNA, ACTB:  $\beta$ -Actin, B2M:  $\beta_2$ -Mikrotubulin,  $c_T$ : cycle threshold, PPIA: Peptidylprolylisomerase A, PUM1: Pumilio RNA binding family member 1, RPL13A: Ribosomal Protein L13a, SDHA: Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A, TBP: TATA-Box-Bindeprotein, UBC: Ubiquitin C

Insgesamt waren alle mittleren  $\Delta c_T$ -Standardabweichungen kleiner 0,80 und die verschiedenen Referenzgen-Kandidaten lagen nahe beieinander. Mit einer mittleren  $\Delta c_T$ -Standardabweichung von  $0,47 \pm 0,16$  und  $0,52 \pm 0,16$  wiesen 18S und B2M die größte Streuung auf. Die mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung von PPIA betrug  $0,39 \pm 0,11$  und befand sich so eher im Mittelfeld. Für PPIA lagen 50% der Werte sehr nahe beieinander, die minimale und maximale  $\Delta c_T$ -Standardabweichung wichen jedoch stark von den restlichen Werten ab. Die mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung von UBC war mit 0,36 im Vergleich zu den anderen Referenzgen-Kandidaten zwar niedriger, jedoch war die Streuung der Werte (0,14) größer. TBP zeigte von allen Referenzgenen die kleinste mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung. Diese betrug  $0,34 \pm 0,06$ .

Bei dieser Auswertemethode wurden die Referenzgen-Kandidaten unabhängig von der Streuung nach der Größe ihrer mittleren  $\Delta C_T$ -Standardabweichung geordnet. Je kleiner diese war, umso mehr eignete sich das untersuchte Gen als Referenzgen. Bei der Sortierung vom kleinsten zum größten Wert ergab sich dabei folgende Reihenfolge:

$$TBP < UBC < RPL13A < SDHA < PPIA < ACTB < PUM1 < 18S < B2M.$$

### **NormFinder**

In einer letzten Analyse wurde der NormFinder-Algorithmus [55] angewendet. Dieser weist unter Berücksichtigung der Variabilität innerhalb einer Gruppe und der gruppenübergreifenden Variabilität jedem Referenzgen-Kandidaten einen Stabilitätswert zu. Je höher dieser ist, umso instabiler ist die mRNA-Expression unter den Versuchsbedingungen und das getestete Gen weniger als Referenzgen geeignet. In Tabelle 35 sind die Referenzgen-Kandidaten nach der Größe ihres Stabilitätswerts geordnet.

**Tabelle 35: Stabilitätswerte der Referenzgen-Kandidaten nach der NormFinder-Analyse.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70  $\mu\text{g/ml}$  Ginseng (gelöst in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginkgo, 150  $\mu\text{g/ml}$  Granatapfel, 50  $\mu\text{g/ml}$  Mariendistel, 100  $\mu\text{g/ml}$  Olive und 15  $\mu\text{g/ml}$  Roskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und ohne Pflanzenextrakte unter 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Expression von neun Referenzgen-Kandidaten untersucht und mit dem NormFinder-Algorithmus analysiert (n = 31).

Referenzgen	RPL13A	TBP	SDHA	PPIA	ACTB	UBC	18S	PUM1	B2M
Stabilitätswert	0,094	0,103	0,134	0,155	0,163	0,167	0,211	0,218	0,252
<b>Rang</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>

18S: 18S ribosomal RNA, ACTB:  $\beta$ -Actin, B2M:  $\beta_2$ -Mikrotubulin, PPIA: Peptidylprolylisomerase A, PUM1: Pumilio RNA binding family member 1, RPL13A: Ribosomal Protein L13a, SD: Standardabweichung, SDHA: Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A, TBP: TATA-Box-Bindeprotein, UBC: Ubiquitin C

*RPL13A* wies mit 0,094 den niedrigsten Stabilitätswert auf. Mit 0,103 war der Stabilitätswert von *TBP* nur etwas größer als der von *RPL13A*. Auch die Referenzgen-Kandidaten *SDHA*, *PPIA*, *ACTB* und *UBC* lagen mit Stabilitätswerten von 0,134, 0,155, 0,163 und 0,167 nahe beieinander. *18S*, *PUM1* und *B2M* wiesen Stabilitätswerte größer 0,200 auf, wobei *B2M* mit 0,252 den von allen untersuchten Referenzgen-Kandidaten am größten Stabilitätswert aufwies.

### Zusammenfassung

Bei allen Analysen wurde den Referenzgen-Kandidaten entsprechend dem jeweiligen Ergebnis ein Rang zugeordnet. Diese Rangziffern wurden in einer abschließenden Analyse addiert und das Gen mit der niedrigsten Rangsumme als Referenzgen für die nachfolgenden Versuche ausgewählt. Eine Zusammenfassung aller Analysen und deren Ergebnisse ist in Tabelle 36 aufgeführt.

**Tabelle 36: Zusammenfassung der Referenzgen-qRT-PCRs.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und ohne Pflanzenextrakte unter 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression von neun Referenzgen-Kandidaten untersucht und unterschiedliche Analysemethoden für die Auswertung herangezogen. Nach jeder Analyse wurden die Referenzgen-Kandidaten nach ihrer Stabilität geordnet und nach Addition der zugewiesenen Ränge das Referenzgen mit der niedrigsten Rangsumme ausgewählt (n = 31).

Referenzgen	c <sub>T</sub> -CV%	Pairwise-Δc <sub>T</sub>	NormFinder	Summe	Rang
<b>TBP</b>	3	1	2	6	<b>1</b>
<b>UBC</b>	1	2	6	9	<b>2</b>
<b>RPL13A</b>	6	3	1	10	<b>3</b>
<b>PPIA</b>	2	5	4	11	<b>4</b>
<b>SDHA</b>	5	4	3	12	<b>5</b>
<b>ACTB</b>	7	6	5	18	<b>6</b>
<b>18S</b>	4	8	7	19	<b>7</b>
<b>PUM1</b>	8	7	8	23	<b>8</b>
<b>B2M</b>	9	9	9	27	<b>9</b>

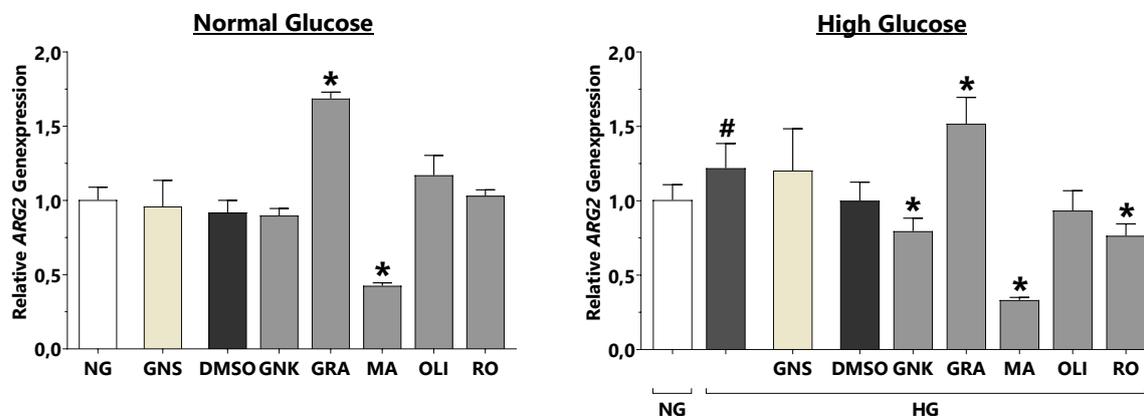
18S: 18S ribosomal RNA, ACTB: β-Actin, B2M: β2-Mikrotubulin, c<sub>T</sub>: cycle treshold, CV%: Variationskoeffizient, PPIA: Peptidylprolylisomerase A, PUM1: Pumilio RNA binding family member 1, RPL13A: Ribosomal Protein L13a, SDHA: Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A, TBP: TATA-Box-Bindeprotein, UBC: Ubiquitin C.

*TBP* wies unter Berücksichtigung aller Analysen die geringste Rangsumme auf und wurde demnach als Referenzgen für die nachfolgenden Multiplex-qRT-PCRs ausgewählt.

## 2.2. ARG2 und NOS3 Genexpression

### ARG2

In Abbildung 27 ist das Ergebnis der Genexpressionsanalyse von ARG2 nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose dargestellt.



**Abbildung 27: Relative ARG2 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression von Arginase 2 (ARG2) untersucht und auf die Kontrolle (NG) bezogen. Das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) wurde als Referenzgen verwendet. Angabe der relativen mRNA-Expression ± SD (n = 4; Ausnahme NG: n = 8). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; \* p < 0,05 vs. DMSO). ARG2: Arginase 2, GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie, TBP: TATA-Box-Bindeprotein

#### Normal Glucose

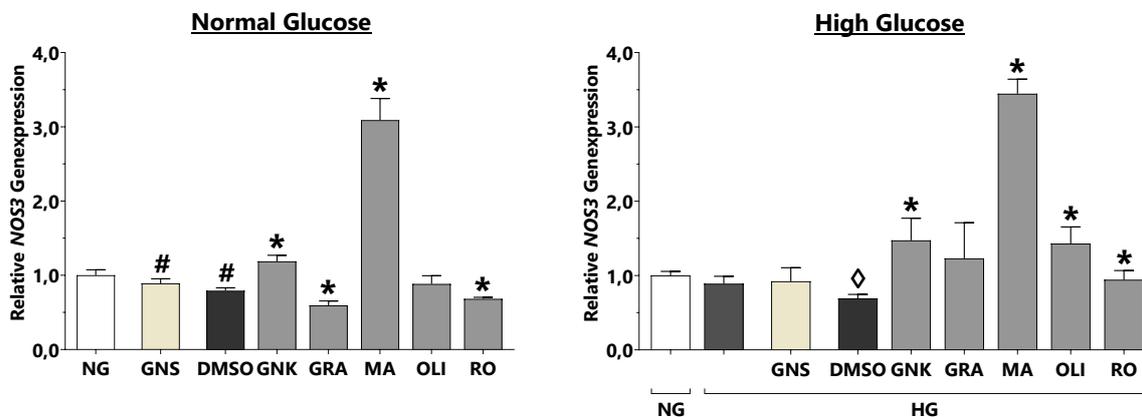
Durch Ginseng wurde die ARG2 Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (NG) nicht signifikant verändert ( $0,96 \pm 0,18$ ). Auch DMSO beeinflusste die mRNA-Expression nicht ( $0,92 \pm 0,08$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle veränderten nur Granatapfel und Mariendistel die ARG2 Genexpression. Diese stieg unter Granatapfel signifikant an ( $1,69 \pm 0,04$ ;  $p = 0,0286$ ), durch Mariendistel wurde sie reduziert ( $0,43 \pm 0,02$ ;  $p = 0,0286$ ). Ginkgo, Olive und Rosskastanie veränderten die Expression des ARG2-Gens nicht signifikant ( $0,90 \pm 0,05$ ;  $1,17 \pm 0,13$ ;  $1,03 \pm 0,04$ ).

#### High Glucose

Im Vergleich zur Kontrolle (NG) wurde ARG2 unter High Glucose stärker exprimiert ( $1,22 \pm 0,17$ ;  $p = 0,0283$ ). Ginseng beeinflusste auch unter High Glucose die ARG2 Genexpression nicht signifikant ( $1,20 \pm 0,28$ ). Ebenso hatte DMSO keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von ARG2 ( $1,00 \pm 0,12$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle war Olive der einzige Pflanzenextrakt, der die ARG2 Genexpression nicht signifikant änderte ( $0,93 \pm 0,13$ ). Unter Ginkgo ( $0,80 \pm 0,09$ ), Mariendistel ( $0,33 \pm 0,02$ ) und Rosskastanie ( $0,76 \pm 0,08$ ) wurde ARG2 reduziert exprimiert ( $p = 0,0286$ ). Granatapfel verstärkte die Expression des ARG2-Gens signifikant ( $1,52 \pm 0,18$ ;  $p = 0,0286$ ).

## NOS3

Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der Genexpressionsanalyse von *NOS3* nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.



**Abbildung 28: Relative *NOS3* Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70  $\mu\text{g/ml}$  Ginseng (gelöst in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginkgo, 150  $\mu\text{g/ml}$  Granatapfel, 50  $\mu\text{g/ml}$  Mariendistel, 100  $\mu\text{g/ml}$  Olive und 15  $\mu\text{g/ml}$  Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression der endothelialen NO-Synthase (*NOS3*) untersucht und auf die Kontrolle (NG) bezogen. Das TATA-Box-Bindeprotein (*TBP*) wurde als Referenzgen verwendet. Angabe der relativen mRNA-Expression  $\pm$  SD ( $n = 4$ ; Ausnahme NG:  $n = 8$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (#  $p < 0,05$  vs. NG,  $\diamond p < 0,05$  vs. HG, \*  $p < 0,05$  vs. DMSO). GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, *NOS3*: endotheliale NO-Synthase, OLI: Olive, RO: Rosskastanie, *TBP*: TATA-Box-Bindeprotein

### Normal Glucose

Unter Normal Glucose wurde die *NOS3* Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (NG) durch Ginseng ( $0,89 \pm 0,06$ ;  $p = 0,0485$ ) und DMSO ( $0,79 \pm 0,04$ ;  $p = 0,0040$ ) signifikant reduziert. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle senkten Granatapfel ( $0,59 \pm 0,06$ ) und Rosskastanie ( $0,68 \pm 0,02$ ) die Genexpression von *NOS3* ( $p = 0,0286$ ), während sie durch Ginkgo ( $1,19 \pm 0,08$ ) und Mariendistel ( $3,09 \pm 0,29$ ) verstärkt wurde ( $p = 0,0286$ ). Durch Olive wurde die Expression des *NOS3*-Gens nicht signifikant beeinflusst ( $0,88 \pm 0,11$ ).

### High Glucose

Unter High Glucose war die *NOS3* Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (NG) nicht signifikant verändert ( $0,89 \pm 0,10$ ). Ginseng hatte unter High Glucose keinen Einfluss auf die *NOS3* Genexpression ( $0,92 \pm 0,18$ ). Durch DMSO wurde sie signifikant reduziert ( $0,69 \pm 0,05$ ;  $p = 0,0286$ ). Granatapfel war der einzige Extrakt, der die Expression des *NOS3*-Gens im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nicht signifikant änderte ( $1,23 \pm 0,48$ ). Unter Ginkgo ( $1,47 \pm 0,30$ ), Mariendistel ( $3,45 \pm 0,19$ ), Olive ( $1,43 \pm 0,22$ ) und Rosskastanie ( $0,94 \pm 0,12$ ) wurde *NOS3* verstärkt exprimiert ( $p = 0,0286$ ).

### Zusammenfassung

In Abbildung 29 ist zusammengefasst, inwiefern die *ARG2* und *NOS3* Genexpression in EA.hy926-Zellen durch die Einzelextrakte bei den unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen des Mediums beeinflusst wurden.

		GNS	GNK	GRA	MA	OLI	RO
<b>ARG2</b>	<b>NG</b>	↔	↔	↑	↓	↔	↔
	<b>HG</b>	↔	↓	↑	↓	↔	↓
		GNS	GNK	GRA	MA	OLI	RO
<b>NOS3</b>	<b>NG</b>	↓	↑	↓	↑	↔	↓
	<b>HG</b>	↔	↑	↔	↑	↑	↑

**Abbildung 29: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der einzelnen Pflanzenextrakte auf die Genexpression von *ARG2* und *NOS3* in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression von Arginase 2 (*ARG2*) und der endothelialen NO-Synthase (*NOS3*) untersucht. Diese wurde für Ginseng auf die jeweilige Kontrolle (NG, HG) und für die in DMSO gelösten Extrakte auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle bezogen. *ARG2*: Arginase 2, *GNK*: Ginkgo, *GNS*: Ginseng, *GRA*: Granatapfel, *HG*: High Glucose, *MA*: Mariendistel, *NG*: Normal Glucose, *NOS3*: endotheliale NO-Synthase, *OLI*: Olive, *RO*: Rosskastanie

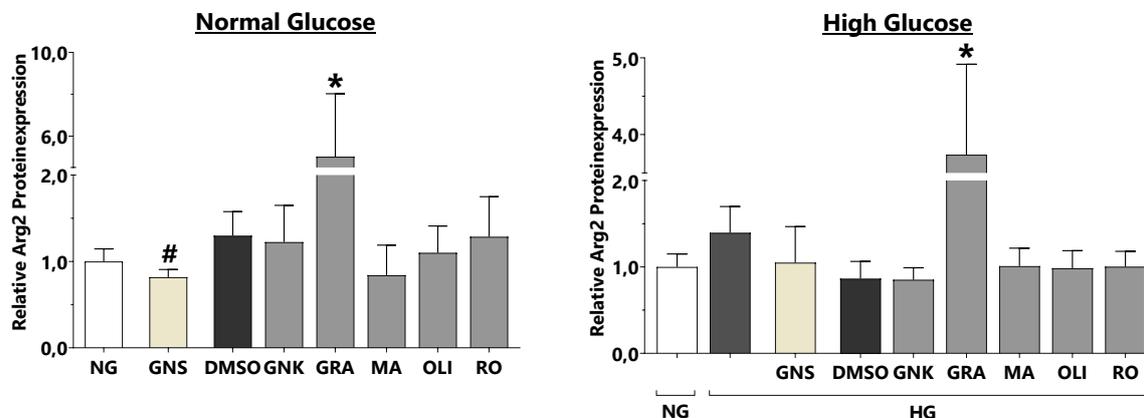
Die *ARG2* Genexpression wurde unabhängig von der Glucose-Konzentration durch Granatapfel verstärkt und durch Mariendistel gesenkt. Ginkgo und Rosskastanie reduzierten die Expression des *ARG2*-Gens nur unter High Glucose. Ginseng und Olive beeinflussten Glucose-unabhängig die Genexpression nicht signifikant.

Ginkgo und Mariendistel erhöhten unabhängig vom Glucose-Gehalt die *NOS3* Genexpression. Durch Ginseng und Granatapfel wurde diese nur unter Normal Glucose reduziert. Auch der Effekt von Olive und Rosskastanie auf die *NOS3* Genexpression war abhängig von der Glucose-Konzentration. Während *NOS3* unter Olive nur unter High Glucose verstärkt exprimiert wurde, senkte Rosskastanie die Expression des *NOS3*-Gens unter Normal und erhöhte sie unter High Glucose.

## 2.3. Arg2 und eNOS Proteinexpression

### Arg2

In Abbildung 30 ist das Ergebnis der Western Blots von Arg2 nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose dargestellt.



**Abbildung 30: Relative Arg2 Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von Arginase 2 (Arg2) mit β-Tubulin als Ladekontrolle untersucht und das Verhältnis der Bandenintensitäten auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Proteinexpression ± SD (Blot Normal Glucose: n = 6; Blot High Glucose: n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; \* p < 0,05 vs. DMSO). Arg2: Arginase 2, GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie

#### Normal Glucose

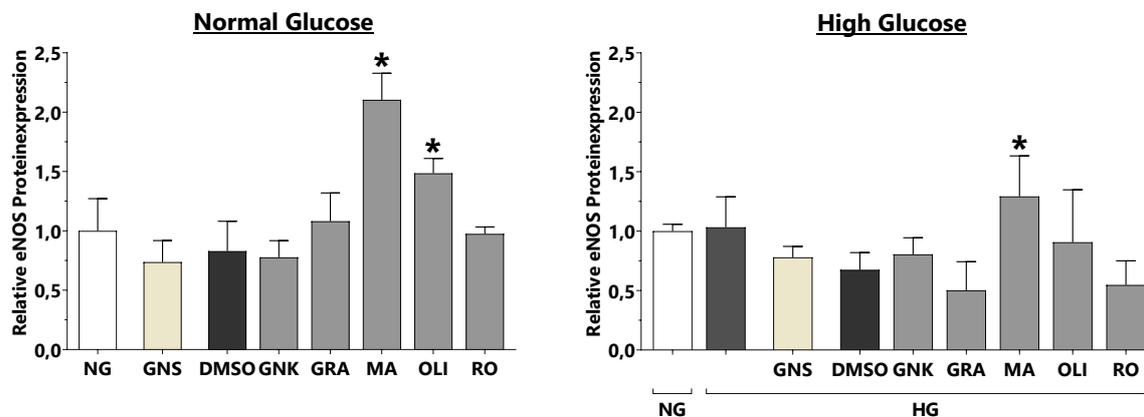
Im Vergleich zur Kontrolle (NG) wurde die relative Arg2 Proteinexpression durch Ginseng signifikant reduziert ( $0,82 \pm 0,09$ ;  $p = 0,0411$ ). Durch DMSO wurde sie nicht signifikant verändert ( $1,30 \pm 0,28$ ). Granatapfel war der einzige Pflanzenextrakt, der die relative Arg2 Proteinexpression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle beeinflusste. Diese stieg unter dem Einzelextrakt signifikant an ( $5,02 \pm 3,01$ ;  $p = 0,0022$ ). Ginkgo, Mariendistel, Olive und Rosskastanie änderten die relative Arg2 Proteinexpression nicht signifikant ( $1,23 \pm 0,42$ ;  $0,84 \pm 0,35$ ;  $1,10 \pm 0,31$ ;  $1,29 \pm 0,46$ ).

#### High Glucose

Durch die Stimulation mit Glucose wurde die relative Arg2 Proteinexpression nicht signifikant verändert ( $1,40 \pm 0,30$ ). Auch Ginseng und DMSO veränderten die relative Arg2 Proteinexpression unter High Glucose nicht signifikant ( $1,05 \pm 0,42$ ;  $0,87 \pm 0,20$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle veränderte nur Granatapfel die Expression des Arg2-Proteins unter High Glucose. Diese stieg unter dem Pflanzenextrakt signifikant an ( $3,74 \pm 1,18$ ;  $p = 0,0286$ ). Ginkgo, Mariendistel, Olive und Rosskastanie beeinflussten die relative Arg2 Proteinexpression nicht signifikant ( $0,85 \pm 0,14$ ;  $1,01 \pm 0,21$ ;  $0,99 \pm 0,20$ ;  $1,00 \pm 0,18$ ).

## eNOS

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der Western Blots von eNOS nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit den einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.



**Abbildung 31: Relative eNOS Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Roskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) mit β-Tubulin als Ladekontrolle untersucht und das Verhältnis der Bandenintensitäten auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Proteinexpression ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (\* p < 0,05 vs. DMSO). eNOS: endotheliale NO-Synthase, GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Roskastanie

### Normal Glucose

Weder durch Ginseng noch durch DMSO wurde die relative eNOS Proteinexpression signifikant verändert ( $0,74 \pm 0,18$ ;  $0,83 \pm 0,25$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle verstärkten Mariendistel ( $2,11 \pm 0,22$ ) und Olive ( $1,49 \pm 0,13$ ) die Expression des eNOS-Proteins ( $p = 0,0286$ ). Ginkgo, Granatapfel und Roskastanie änderten die relative Proteinexpression nicht signifikant ( $0,78 \pm 0,14$ ;  $1,08 \pm 0,24$ ;  $0,98 \pm 0,06$ ).

### High Glucose

Die Stimulation mit Glucose veränderte die relative Proteinexpression von eNOS im Vergleich zur Kontrolle (NG) nicht signifikant ( $1,03 \pm 0,26$ ). Auch unter High Glucose änderten Ginseng und DMSO die Expression des eNOS-Proteins nicht signifikant ( $0,78 \pm 0,09$ ;  $0,68 \pm 0,14$ ). Mariendistel beeinflusste als einziger Einzelextrakt die relative eNOS Proteinexpression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ( $1,29 \pm 0,34$ ;  $p = 0,0286$ ). Ginkgo, Granatapfel, Olive und Roskastanie hatten keinen signifikanten Effekt auf die Expression des eNOS-Proteins ( $0,81 \pm 0,14$ ;  $0,50 \pm 0,24$ ;  $0,91 \pm 0,44$ ;  $0,55 \pm 0,20$ ).

### Zusammenfassung

Abbildung 32 stellt zusammenfassend dar wie die relative Proteinexpression von Arg2 und eNOS durch die Einzelextrakte in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration des Mediums verändert wurde.

		GNS	GNK	GRA	MA	OLI	RO
<b>Arg2</b>	<b>NG</b>	↓	↔	↑	↔	↔	↔
	<b>HG</b>	↔	↔	↑	↔	↔	↔
		GNS	GNK	GRA	MA	OLI	RO
<b>eNOS</b>	<b>NG</b>	↔	↔	↔	↑	↑	↔
	<b>HG</b>	↔	↔	↔	↑	↔	↔

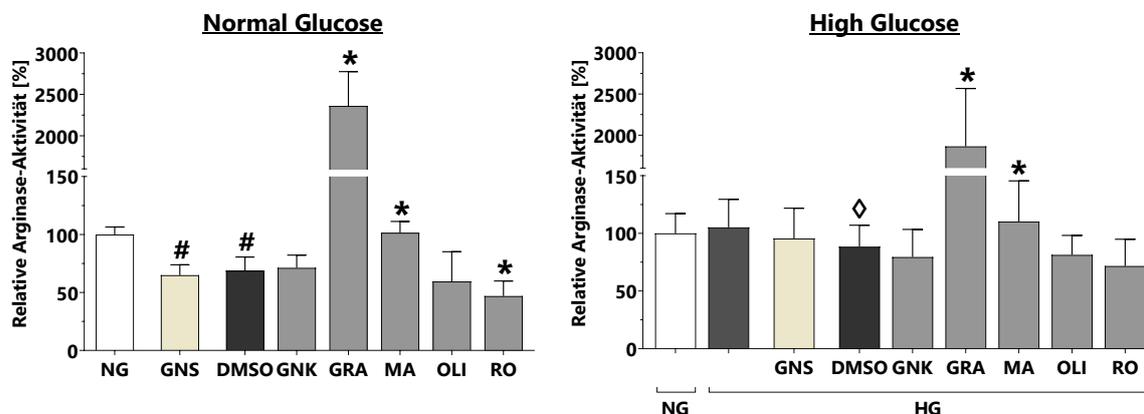
**Abbildung 32: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der einzelnen Pflanzenextrakte auf die Arg2 und eNOS Proteinexpression in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von Arginase 2 (Arg2) und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) untersucht. Diese wurde für Ginseng auf die jeweilige Kontrolle (NG, HG) und für die in DMSO gelösten Extrakte auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle bezogen. Arg2: Arginase 2, eNOS: endotheliale NO-Synthase, GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie

Insgesamt beeinflussten nur wenige Extrakte die Proteinexpression. Unabhängig von der Glucose-Konzentration nahm die Arg2 Proteinexpression unter dem Granatapfel zu. Ginseng reduzierte diese nur unter Normal Glucose. Ginkgo, Mariendistel, Olive und Rosskastanie veränderten die relative Arg2 Proteinexpression unabhängig von der Glucose-Konzentration nicht.

Die relative eNOS Proteinexpression wurde nur durch Mariendistel und Olive erhöht. Dabei war der Effekt der Mariendistel unabhängig von der Glucose-Konzentration. Olive verstärkte die Expression des eNOS-Proteins nur unter Normal Glucose. Ginseng, Ginkgo, Granatapfel und Rosskastanie veränderten die relative eNOS Proteinexpression nicht signifikant.

## 2.4. Arginase-Aktivität

Das Ergebnis der Aktivitätsmessung in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal Glucose ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die Arginase-Aktivität wurde spektrophotometrisch gemessen und die absoluten Aktivitäten auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Aktivität [%] ± SD (n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; ◇ p < 0,05 vs. HG; \* p < 0,05 vs. DMSO). GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie

### Normal Glucose

Im Vergleich zur Kontrolle (NG) wurde die relative Arginase-Aktivität durch Ginseng (65,0 ± 9,0%) und DMSO (68,9 ± 11,8%) signifikant gesenkt (p = 0,0022). Ginkgo und Olive änderten verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle die relative Arginase-Aktivität nicht signifikant (71,3 ± 11,0%; 59,5 ± 25,7%). Unter Granatapfel (2360,0 ± 414,8%; p = 0,0022) und Mariendistel (101,5 ± 9,7%; p = 0,0087) stieg sie signifikant an. Durch Rosskastanie wurde sie signifikant gesenkt (45,0 ± 13,0%; p = 0,0411).

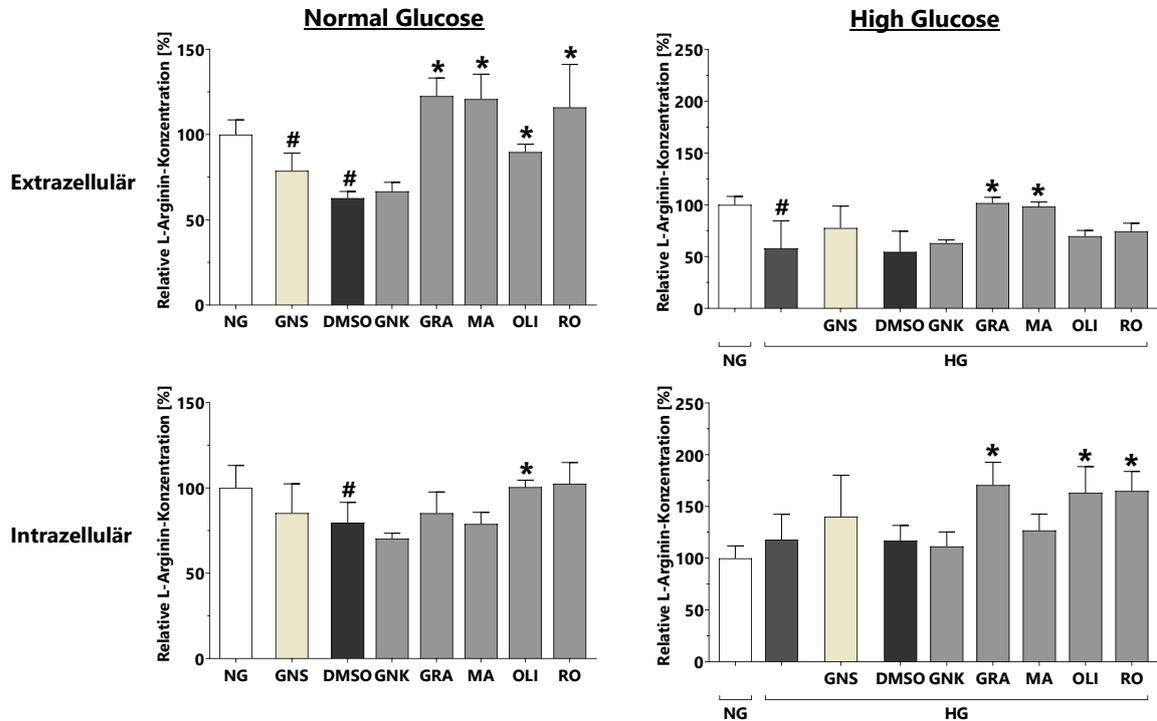
### High Glucose

Die Stimulation mit Glucose änderte die relative Arginase-Aktivität nicht signifikant (105,2 ± 24,3%). Ginseng veränderte die relative Arginase-Aktivität unter High Glucose nicht (95,5 ± 26,3%). Durch DMSO wurde sie signifikant gesenkt (88,5 ± 18,6%; p = 0,0275). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die relative Arginase-Aktivität unter Granatapfel (1864,0 ± 702,8%; p < 0,0001) und Mariendistel (110,3 ± 35,2%; p = 0,0171) signifikant zu. Ginkgo, Olive und Rosskastanie veränderten die relative Arginase-Aktivität nicht signifikant (95,5 ± 26,3%; 81,3 ± 16,8%; 71,6 ± 23,3%).

## 2.5. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin

### L-Arginin

Das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Arginin nach der Stimulation der EA.hy926-Zellen mit den Einzelextrakten unter Normal und High Glucose ist in Abbildung 34 dargestellt.



**Abbildung 34:** Extra- und intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose. EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Arginin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen L-Arginin-Konzentration [%] ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; \* p < 0,05 vs. DMSO). GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie

### Normal Glucose

Im Vergleich zur Kontrolle (NG) reduzierte Ginseng nur die extrazelluläre L-Arginin-Konzentration ( $78,7 \pm 10,4\%$ ;  $p = 0,0283$ ). Intrazellulär wurde sie durch den Einzelextrakt nicht signifikant verändert ( $85,3 \pm 17,2\%$ ). DMSO reduzierte die L-Arginin-Konzentration extra- ( $62,7 \pm 3,9\%$ ;  $p = 0,0040$ ) und intrazellulär ( $79,7 \pm 11,9\%$ ;  $p = 0,0162$ ). Unter Granatapfel ( $122,5 \pm 10,6\%$ ), Mariendistel ( $120,8 \pm 14,6\%$ ) und Rosskastanie ( $116,0 \pm 25,2\%$ ) stieg die extrazelluläre L-Arginin-Konzentration im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant an ( $p = 0,0286$ ). Intrazellulär hatten die Einzelextrakte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration von L-Arginin (Granatapfel:  $85,2 \pm 12,4\%$ ; Mariendistel:  $78,9 \pm 6,8\%$ ; Rosskastanie:  $102,5 \pm 12,4\%$ ). Olive erhöhte die L-Arginin-Konzentration sowohl extra- ( $89,7 \pm 4,6\%$ ;  $p = 0,0286$ ) als auch intrazellulär ( $100,5 \pm 4,1\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Ginkgo beeinflusste die L-Arginin-Konzentration weder extra- noch intrazellulär ( $66,7 \pm 5,3\%$ ;  $70,3 \pm 3,2\%$ ).

## High Glucose

Unter High Glucose nahm die L-Arginin-Konzentration extrazellulär ab ( $58,1 \pm 26,5\%$ ;  $p = 0,0040$ ). Intrazellulär wurde sie im Vergleich zur Kontrolle (NG) nicht signifikant verändert ( $118,0 \pm 24,4\%$ ). Ginseng und DMSO beeinflussten die L-Arginin-Konzentration unter High Glucose weder extra- ( $77,7 \pm 21,2\%$ ;  $54,5 \pm 20,1\%$ ) noch intrazellulär ( $140,2 \pm 39,9\%$ ;  $117,0 \pm 14,7\%$ ) signifikant. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die L-Arginin-Konzentration durch Granatapfel extra- ( $101,7 \pm 5,5\%$ ) und intrazellulär ( $170,7 \pm 22,0\%$ ) erhöht ( $p = 0,0286$ ). Mariendistel erhöhte die L-Arginin-Konzentration nur extrazellulär ( $98,3 \pm 4,4\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Intrazellulär wurde sie durch den Einzelextrakt nicht signifikant verändert ( $126,9 \pm 15,7\%$ ). Olive ( $163,2 \pm 25,3\%$ ) und Rosskastanie ( $165,0 \pm 18,9\%$ ) erhöhten jeweils nur die intrazelluläre L-Arginin-Konzentration signifikant ( $p = 0,0286$ ). Extrazellulär hatten beide Extrakte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration von L-Arginin (Olive:  $69,7 \pm 5,6\%$ ; Rosskastanie:  $74,4 \pm 7,7\%$ ). Ginkgo beeinflusste die L-Arginin-Konzentration weder extra- noch intrazellulär signifikant ( $63,0 \pm 3,1\%$ ;  $111,5 \pm 13,9\%$ ).

## Zusammenfassung

In Abbildung 35 sind die Effekte der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Arginin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration dargestellt.

		GNS	GNK	GRA	MA	OLI	RO
Extrazellulär	NG	↓	↔	↑	↑	↑	↑
	HG	↔	↔	↑	↑	↔	↔
Intrazellulär	NG	↔	↔	↔	↔	↑	↔
	HG	↔	↔	↑	↔	↑	↑

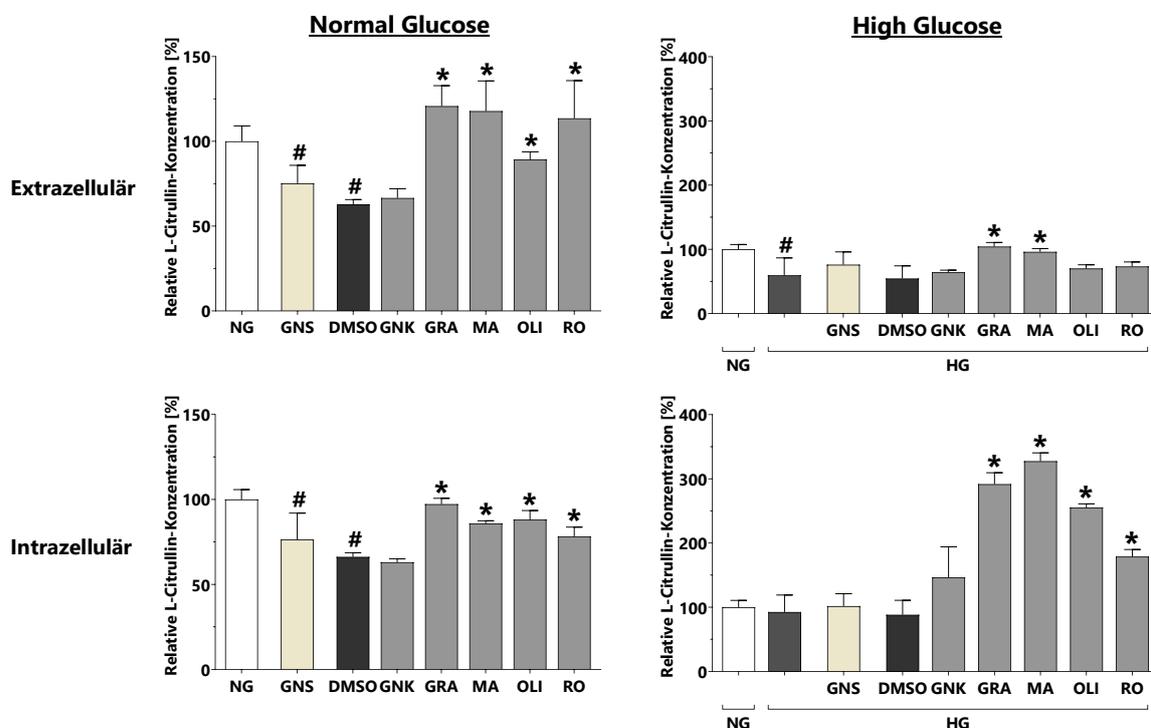
**Abbildung 35: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre relative Konzentration von L-Arginin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Arginin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und für Ginseng auf die jeweilige Kontrolle (NG, HG), für die in DMSO gelösten Extrakte auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle bezogen. GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie.

Ginkgo veränderte unabhängig von der Glucose-Konzentration weder die extra- noch die intrazelluläre Konzentration von L-Arginin. Ginseng senkte nur die extrazelluläre L-Arginin-Konzentration unter

Normal Glucose. Unter High Glucose hatte der Einzelextrakt keinen Einfluss auf die extra- und intrazelluläre Konzentration. Granatapfel erhöhte die extrazelluläre L-Arginin-Konzentration unabhängig von der Glucose-Konzentration. Intrazellulär wurde sie durch den Einzelextrakt nur unter High Glucose erhöht. Mariendistel erhöhte sowohl unter Normal als auch unter High Glucose die extrazelluläre Konzentration von L-Arginin. Die intrazelluläre L-Arginin-Konzentration wurde durch den Einzelextrakt nicht verändert. Olive senkte nur die extrazelluläre L-Arginin-Konzentration unter Normal Glucose. Intrazellulär erhöhte der Einzelextrakt die Konzentration von L-Arginin Glucose-unabhängig. Rosskastanie erhöhte die extrazelluläre Konzentration von L-Arginin nur unter Normal Glucose und die intrazelluläre Konzentration nur unter High Glucose.

### L-Citrullin

In Abbildung 36 ist das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Citrullin nach der Stimulation der EA.hy926-Zellen mit den Einzelextrakten unter Normal und High Glucose dargestellt.



**Abbildung 36: Extra- und intrazelluläre relative L-Citrullin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen L-Citrullin-Konzentration [%] ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; \* p < 0,05 vs. DMSO). GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie.

### Normal Glucose

Unter Ginseng nahm die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin signifikant ab (75,2 ± 10,7%; p = 0,0081; 76,4 ± 15,6%; p = 0,0283). Auch durch DMSO wurde die Konzentration von L-Citrullin im Vergleich zur Kontrolle (NG) extra- und intrazellulär reduziert (62,9 ± 2,8%; p = 0,0040; 66,2 ± 2,4%; p = 0,0040). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle war Ginkgo der einzige Extrakt, der

die L-Citrullin-Konzentration weder extra- noch intrazellulär signifikant änderte ( $66,6 \pm 5,4\%$ ;  $63,1 \pm 2,0\%$ ). Extrazellulär erhöhten Granatapfel ( $120,8 \pm 12,0\%$ ), Mariendistel ( $117,8 \pm 17,8\%$ ), Olive ( $89,3 \pm 4,5\%$ ) und Rosskastanie ( $113,6 \pm 22,2\%$ ) die L-Citrullin-Konzentration ( $p = 0,0286$ ). Auch die intrazelluläre L-Citrullin-Konzentration wurde durch diese Extrakte erhöht ( $97,3 \pm 3,4\%$ ;  $85,9 \pm 1,6\%$ ;  $88,1 \pm 5,4\%$ ;  $78,2 \pm 5,5\%$ ;  $p = 0,0286$ ).

### High Glucose

Unter High Glucose nahm die Konzentration von L-Citrullin extrazellulär signifikant ab ( $59,6 \pm 27,0\%$ ;  $p = 0,0040$ ). Intrazellulär wurde sie im Vergleich zur Kontrolle (NG) nicht signifikant verändert ( $92,6 \pm 26,4\%$ ). Ginseng und DMSO beeinflussten die L-Citrullin-Konzentration unter High Glucose weder extra- ( $76,2 \pm 19,7\%$ ;  $54,5 \pm 19,8\%$ ) noch intrazellulär ( $101,8 \pm 19,2\%$ ;  $88,3 \pm 22,5\%$ ) signifikant. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die Konzentration von L-Citrullin durch Granatapfel und Mariendistel extra- ( $104,3 \pm 6,4\%$ ;  $96,2 \pm 5,0\%$ ) und intrazellulär ( $291,8 \pm 17,6\%$ ;  $327,6 \pm 12,8\%$ ) signifikant erhöht ( $p = 0,0286$ ). Olive und Rosskastanie erhöhten die L-Citrullin-Konzentration nur intrazellulär ( $255,1 \pm 5,8\%$ ;  $178,9 \pm 10,9\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Extrazellulär hatten die beiden Extrakte keinen signifikanten Einfluss ( $70,2 \pm 5,7\%$ ;  $73,3 \pm 7,0\%$ ). Ginkgo veränderte die Konzentration von L-Citrullin weder extra- noch intrazellulär ( $64,2 \pm 3,4\%$ ;  $146,6 \pm 47,5\%$ ).

### Zusammenfassung

Abbildung 37 fasst die Effekte der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration zusammen.

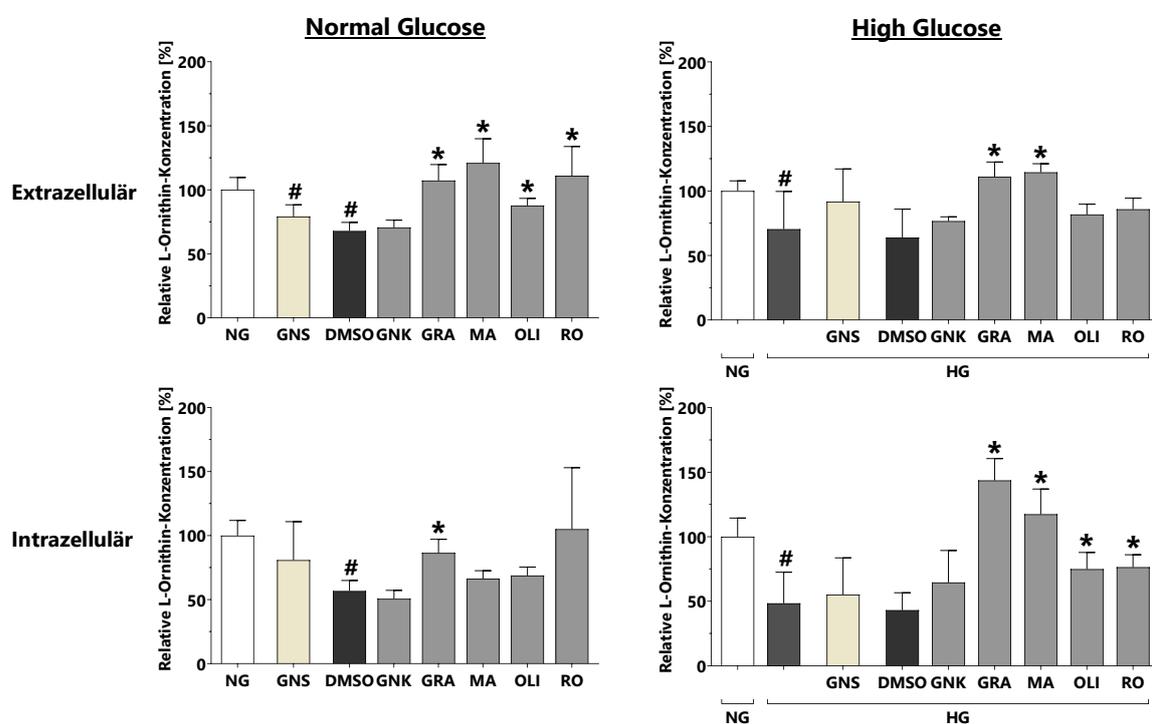
		GNS	GNK	GRA	MA	OLI	RO
Extrazellulär	NG	↓	↔	↑	↑	↑	↑
	HG	↔	↔	↑	↑	↔	↔
Intrazellulär	NG	↓	↔	↑	↑	↑	↑
	HG	↔	↔	↑	↑	↑	↑

**Abbildung 37: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre relative Konzentration von L-Citrullin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und für Ginseng auf die jeweilige Kontrolle (NG, HG), für die in DMSO gelösten Extrakte auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle bezogen. GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Rosskastanie.

Ginkgo hatte unabhängig von der Glucose-Konzentration keinen Effekt auf die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin. Durch Granatapfel und Mariendistel wurden diese jeweils Glucose-unabhängig erhöht. Ginseng senkte nur unter Normal Glucose die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin. Unter High Glucose hatte der Einzelextrakt keinen Effekt. Olive und Roskastanie erhöhten die extrazelluläre L-Citrullin-Konzentration nur unter Normal Glucose. Intrazellulär wurde die Konzentration von L-Citrullin durch beide Extrakte unabhängig von der Glucose-Konzentration erhöht.

### L-Ornithin

Abbildung 38 zeigt das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Ornithin nach der Stimulation der EA.hy926-Zellen mit den Einzelextrakten unter Normal und High Glucose.



**Abbildung 38: Extra- und intrazelluläre relative L-Ornithin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Roskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die jeweilige NG-Kontrolle bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen L-Ornithin-Konzentration [%] ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; \* p < 0,05 vs. DMSO). GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Roskastanie

### **Normal Glucose**

Im Vergleich zur Kontrolle (NG) reduzierte Ginseng die L-Ornithin-Konzentration nur extrazellulär ( $79,2 \pm 9,2\%$ ;  $p = 0,0081$ ). Intrazellulär wurde sie durch Ginseng nicht signifikant verändert ( $80,9 \pm 30,0\%$ ). DMSO reduzierte die Konzentration von L-Ornithin sowohl extra- ( $67,9 \pm 6,6\%$ ;  $p = 0,0040$ ) als auch intrazellulär ( $56,8 \pm 8,2\%$ ;  $p = 0,0040$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöhte Granatapfel die extra- ( $107,3 \pm 12,4\%$ ;  $p = 0,0286$ ) und intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin ( $86,5 \pm 10,6\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Mariendistel ( $121,0 \pm 18,9\%$ ), Olive ( $87,7 \pm 5,6\%$ ) und

Roskastanie ( $111,1 \pm 22,7\%$ ) erhöht die L-Ornithin-Konzentration nur extrazellulär ( $p = 0,0286$ ). Intrazellulär hatten die Extrakte keinen signifikanten Einfluss ( $66,4 \pm 6,1\%$ ;  $68,8 \pm 6,6\%$ ;  $105,1 \pm 47,9\%$ ).

### High Glucose

Unter High Glucose nahm die Konzentration von L-Ornithin im Vergleich zur Kontrolle (NG) extra- ( $70,4 \pm 29,2\%$ ;  $p = 0,0485$ ) und intrazellulär signifikant ab ( $48,4 \pm 24,1\%$ ;  $p = 0,0040$ ). Ginseng und DMSO beeinflussten die L-Ornithin-Konzentration unter High Glucose weder extra- ( $91,8 \pm 25,3\%$ ;  $63,9 \pm 22,0\%$ ) noch intrazellulär ( $55,2 \pm 28,4\%$ ;  $43,1 \pm 13,5\%$ ) signifikant. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die Konzentration von L-Ornithin durch Granatapfel und Mariendistel sowohl extra- ( $111,2 \pm 11,3\%$ ;  $114,4 \pm 6,6\%$ ) als auch intrazellulär ( $143,7 \pm 16,9\%$ ;  $117,4 \pm 19,5\%$ ) signifikant erhöht ( $p = 0,0286$ ). Olive und Roskastanie erhöhten die L-Ornithin-Konzentration nur intrazellulär ( $74,9 \pm 12,9\%$ ;  $76,4 \pm 9,6\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Extrazellulär hatten beide Extrakte keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration von L-Ornithin ( $81,8 \pm 8,0\%$ ;  $85,9 \pm 8,6\%$ ). Ginkgo beeinflusste die L-Ornithin-Konzentration weder extra- noch intrazellulär signifikant ( $64,2 \pm 3,4\%$ ;  $146,6 \pm 47,5\%$ ).

### Zusammenfassung

In Abbildung 39 ist dargestellt, wie die extra- und intrazelluläre L-Ornithin-Konzentration durch die Einzelextrakte in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration beeinflusst wurden.

		GNS	GNK	GRA	MA	OLI	RO
Extrazellulär	NG	↓	↔	↑	↑	↑	↑
	HG	↔	↔	↑	↑	↔	↔
Intrazellulär	NG	↔	↔	↑	↔	↔	↔
	HG	↔	↔	↑	↑	↑	↑

**Abbildung 39: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre relative Konzentration von L-Ornithin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 150 µg/ml Granatapfel, 50 µg/ml Mariendistel, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Roskastanie (gelöst in 70% DMSO) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin wurde mittels LC-MS/MS gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und für Ginseng auf die jeweilige Kontrolle (NG, HG), für die in DMSO gelösten Extrakte auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle bezogen. GNK: Ginkgo, GNS: Ginseng, GRA: Granatapfel, HG: High Glucose, MA: Mariendistel, NG: Normal Glucose, OLI: Olive, RO: Roskastanie

Ginkgo hatte unabhängig von der Glucose-Konzentration keinen Effekt auf die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin. Granatapfel erhöhte sie Glucose-unabhängig sowohl extra- als auch

intrazellulär. Ginseng senkte unter Normal Glucose nur die extrazelluläre L-Ornithin-Konzentration. Unter High Glucose hatte der Einzelextrakt keinen signifikanten Effekt. Mariendistel erhöhte unter Normal Glucose nur die extrazelluläre L-Ornithin-Konzentration. Unter High Glucose erhöhte der Einzelextrakt sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin. Olive und Rosskastanie erhöhten die extrazelluläre L-Ornithin-Konzentration nur unter Normal Glucose. Intrazellulär wurde sie durch beide Extrakte nur unter High Glucose erhöht.

### 3. Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombinationen

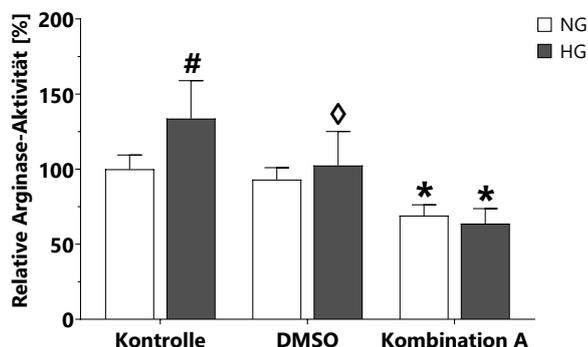
Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Pflanzenextrakten die Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen zu senken. Nachdem im vorherigen Abschnitt die Einzelextrakte mit enzymhemmenden Eigenschaften identifiziert werden konnten, wurde nun untersucht, ob durch Kombination dieser Einzelextrakte die Reduktion der Arginase-Aktivität verstärkt werden konnte. Ausgehend von den Ergebnissen der Aktivitätsmessung der Einzelextrakte wurden in der Kombination jene Extrakte berücksichtigt, die eine signifikante oder zumindest vom Trend her deutliche, wenn auch statistisch nicht signifikante, Veränderung in die therapeutisch erwünschte Richtung bewirkt hatten. So enthielt die erste Pflanzenkombination Ginseng, Ginkgo und Rosskastanie (Pflanzenkombination A). Da der Effekt der Olive auf die Arginase-Aktivität nicht eindeutig war, wurde dieser Extrakt einer zweiten Kombination hinzugefügt (Pflanzenkombination B). Aufgrund ihrer eindeutig aktivitätsfördernden Wirkung waren Granatapfel und Mariendistel nicht Bestandteil der Pflanzenkombinationen.

EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter Normal und High Glucose mit beiden Kombinationen stimuliert und die Arginase-Aktivität gemessen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine der beiden Pflanzenkombinationen ausgewählt und in abschließenden Experimenten der Effekt der Kombination auf die Gen- und Proteinexpression und die intra- und extrazelluläre Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin weiter untersucht. Basierend auf den Ergebnissen der qRT-PCRs der Einzelextrakte unter Normal Glucose wurde *TBP* als Referenzgen für die Multiplex-qRT-PCRs verwendet (s. Ergebnisse, Kapitel 2.1).

#### 3.1. Arginase-Aktivität

##### Kombination A

In Abbildung 40 ist das Ergebnis der Messung der Arginase-Aktivität nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose dargestellt.

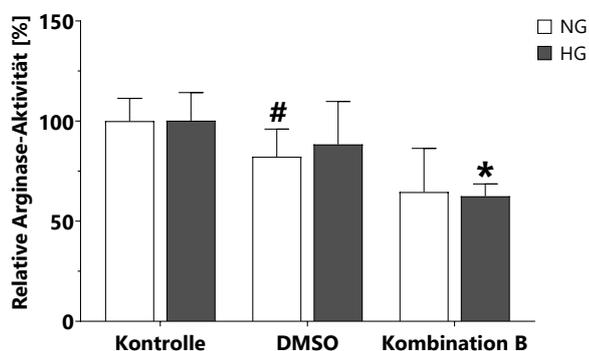


**Abbildung 40: Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die Arginase-Aktivität wurde spektrophotometrisch gemessen und die absoluten Aktivitäten auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Aktivität [%] ± SD (n = 9). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; ◇ p < 0,05 vs. HG; \* p < 0,05 vs. DMSO). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Im Vergleich zur Kontrolle (NG) stieg die relative Arginase-Aktivität unter Glucose signifikant an ( $133,7 \pm 25,2\%$ ;  $p = 0,0056$ ). DMSO reduzierte die relative Arginase-Aktivität nur unter High Glucose signifikant ( $102,5 \pm 22,5\%$ ;  $p = 0,0056$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die relative Arginase-Aktivität sowohl unter Normal als auch unter High Glucose durch Pflanzenkombination A signifikant reduziert. Unter Normal Glucose sank diese auf  $69,1 \pm 7,2\%$  ( $p < 0,0001$ ) und unter High Glucose auf  $63,7 \pm 10,0\%$  ( $p = 0,0012$ ). Die Reduktion der relativen Arginase-Aktivität durch Pflanzenkombination A war dabei unabhängig von der Glucose-Konzentration ( $p = 0,2224$ ).

### **Kombination B**

Das Ergebnis der Messung der Arginase-Aktivität nach der Stimulation der EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombination B unter Normal und High Glucose ist in Abbildung 41 dargestellt.



**Abbildung 41: Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination B unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination B kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo, 100 µg/ml Olive und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Die Arginase-Aktivität wurde spektrophotometrisch gemessen und die absoluten Aktivitäten auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Aktivität [%] ± SD (n = 9; Ausnahme NG+DMSO: n = 8). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; \* p < 0,05 vs. DMSO). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

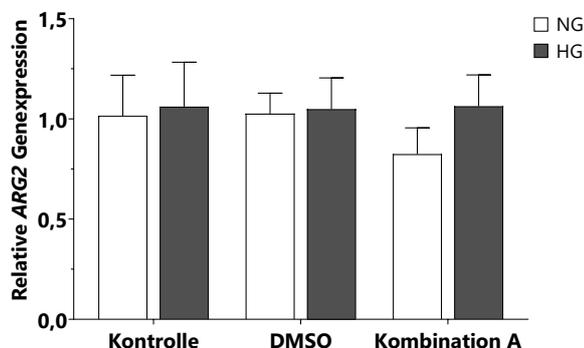
Im Vergleich zur Kontrolle (NG) wurde die relative Arginase-Aktivität durch die Stimulation mit Glucose nicht signifikant verändert ( $100,3 \pm 14,0\%$ ). DMSO reduzierte die relative Arginase-Aktivität nur unter Normal Glucose signifikant ( $82,2 \pm 13,8\%$ ;  $p = 0,0111$ ). Auch der Effekt der Pflanzenkombination B war abhängig von der Glucose-Konzentration. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die relative Arginase-Aktivität durch Pflanzenkombination B nur unter High Glucose signifikant reduziert ( $62,5 \pm 6,1\%$ ;  $p = 0,0028$ ).

Wie zu Beginn dieses Unterkapitels beschrieben, wurde an dieser Stelle untersucht, ob der hemmende Einfluss der Einzelnextrakte auf die Arginase-Aktivität durch eine Kombination dieser Pflanzenextrakte weiter verstärkt werden konnte. Da sich die relativen Arginase-Aktivitäten unter Pflanzenkombination A und Pflanzenkombination B unabhängig von der Glucose-Konzentration nicht signifikant voneinander unterschieden (NG:  $p = 0,7926$ ; HG:  $p > 0,9999$ ), konnte daraus geschlossen werden, dass der Zusatz der Olive zur Pflanzenkombination A keinen Zusatznutzen mit sich zog. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Experimenten der Effekt der Pflanzenkombination A weiter untersucht.

### 3.2. ARG2 und NOS3 Genexpression

#### ARG2

Abbildung 42 zeigt das Ergebnis der Genexpressionsanalyse von ARG2 nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombination A.

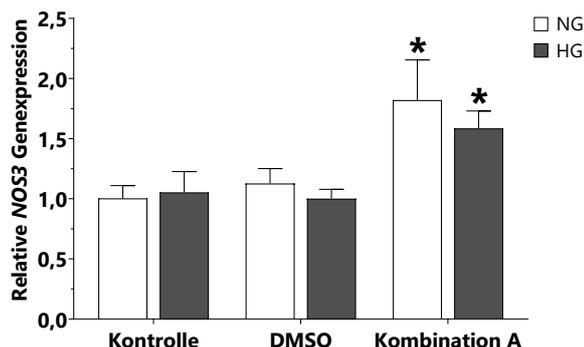


**Abbildung 42: Relative ARG2 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Roskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression von Arginase 2 (ARG2) untersucht und auf die Kontrolle (NG) bezogen. Als Referenzgen wurde das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) verwendet. Angabe der Mittelwerte der relativen Expression ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (p < 0,05). ARG2: Arginase 2, HG: High Glucose, NG: Normal Glucose, TBP: TATA-Box-Bindeprotein

Die ARG2 Genexpression wurde unabhängig von der Glucose-Konzentration weder durch das Lösungsmittel (NG: 1,03 ± 0,10; HG: 1,05 ± 0,16) noch durch die Pflanzenkombination A (NG: 0,82 ± 0,13; HG: 1,06 ± 0,16) signifikant verändert.

#### NOS3

Das Ergebnis der NOS3 Genexpressionsanalyse nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit der Pflanzenkombination A ist in Abbildung 43 dargestellt.



**Abbildung 43: Relative NOS3 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Roskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch qRT-PCR wurde die Genexpression der endothelialen NO-Synthase (NOS3) untersucht und auf die Kontrolle (NG) bezogen. Als Referenzgen wurde das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) verwendet. Angabe der Mittelwerte der relativen Expression ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (\* p < 0,05 vs. DMSO). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose, NOS3: endotheliale NO-Synthase, TBP: TATA-Box-Bindeprotein

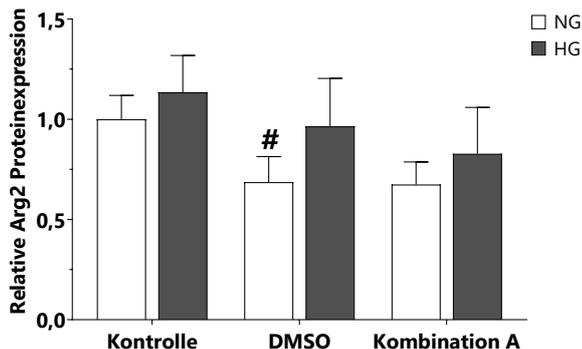
DMSO hatte weder unter Normal noch unter High Glucose einen signifikanten Einfluss auf die Expression des NOS3-Gens (1,13 ± 0,12; 1,00 ± 0,08). Im Gegensatz zu ARG2 wurde die NOS3 Genexpression durch Pflanzenkombination A signifikant verändert. Sowohl unter Normal (1,82 ± 0,33) als auch unter High

Glucose ( $1,59 \pm 0,14$ ) wurde *NOS3* im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant höher exprimiert ( $p = 0,0286$ ). Der Effekt der Pflanzenkombination auf die *NOS3* Genexpression war dabei unabhängig von der Glucose-Konzentration ( $p = 0,4857$ ).

### 3.3. Arg2 und eNOS Proteinexpression

#### Arg2

Das Ergebnis der Western Blots von Arg2 nach der Stimulation der EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombination A ist in Abbildung 44 dargestellt.

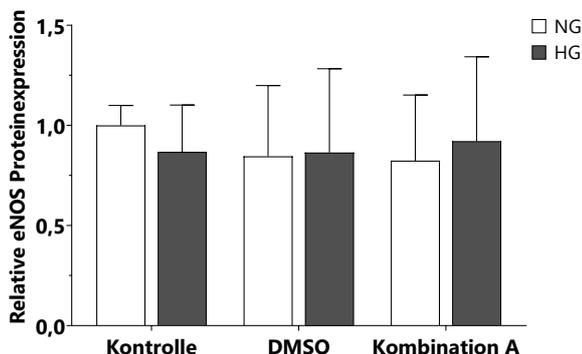


**Abbildung 44: Relative Arg2 Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Roskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von Arginase 2 (Arg2) mit β-Tubulin als Ladekontrolle untersucht und das Verhältnis der Bandenintensitäten auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Proteinexpression ± SD (n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (#  $p < 0,05$  vs. NG). Arg2: Arginase 2, HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Die relative Arg2 Proteinexpression wurde durch DMSO nur unter Normal Glucose signifikant reduziert ( $0,69 \pm 0,13$ ;  $p = 0,0043$ ). Unter High Glucose hatte das Lösungsmittel keinen signifikanten Effekt ( $0,97 \pm 0,24$ ). Im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle veränderte die Pflanzenkombination A die relative Arg2 Proteinexpression weder unter Normal noch unter High Glucose signifikant ( $0,68 \pm 0,11$ ;  $0,83 \pm 0,23$ ).

## eNOS

Abbildung 45 zeigt das Ergebnis der Western Blots von eNOS nach der Stimulation der EA.hy926-Zellen mit der Pflanzenkombination A.



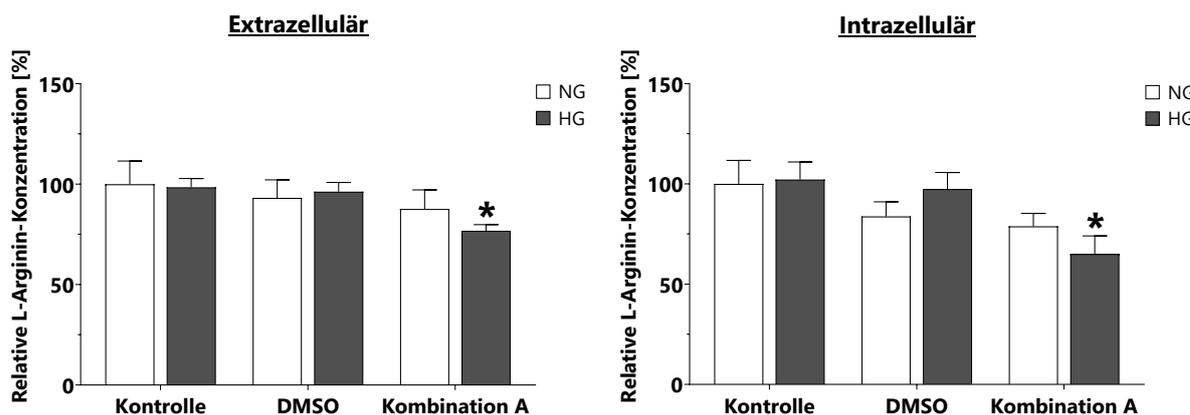
**Abbildung 45: Relative eNOS Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) mit β-Tubulin als Ladekontrolle untersucht und das Verhältnis der Bandenintensitäten auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der Mittelwerte der relativen Proteinexpression ± SD (n = 6; Ausnahme HG, NG+DMSO, NG+Kombination A: n = 5). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (p < 0,05). eNOS: endotheliale NO-Synthase, HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

Die relative eNOS Proteinexpression wurde unabhängig von der Glucose-Konzentration weder durch das Lösungsmittel DMSO (NG: 0,85 ± 0,35; HG: 0,87 ± 0,42) noch durch die Pflanzenkombination A (NG: 0,82 ± 0,33; HG: 0,92 ± 0,42) signifikant verändert.

### 3.4. Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin

#### L-Arginin

Abbildung 46 zeigt das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der extra- und intrazellulären Konzentration von L-Arginin nach der Stimulation der EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombination A.



**Abbildung 46: Extra- und intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch LC-MS/MS wurde die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Arginin gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der mittleren relativen Konzentration von L-Arginin [%] ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (\* p < 0,05 vs. DMSO). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

DMSO hatte unabhängig von der Glucose-Konzentration keinen signifikanten Effekt auf die extra- (NG: 93,2 ± 9,0%; HG: 96,3 ± 4,6%) und intrazelluläre (NG: 83,8 ± 7,3%; HG: 97,5 ± 8,2%) Konzentration

von L-Arginin. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurden sowohl die extra- ( $76,8 \pm 3,0\%$ ) als auch die intrazelluläre ( $65,1 \pm 9,0\%$ ) L-Arginin-Konzentration unter High Glucose signifikant durch Pflanzenkombination A gesenkt ( $p = 0,0286$ ). Unter Normal Glucose hatte die Pflanzenkombination keinen signifikanten Effekt (extrazellulär:  $87,7 \pm 9,5\%$ ; intrazellulär:  $78,9 \pm 6,4\%$ ).

### L-Citrullin

In Abbildung 47 ist das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der L-Citrullin-Konzentration nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombination A dargestellt.

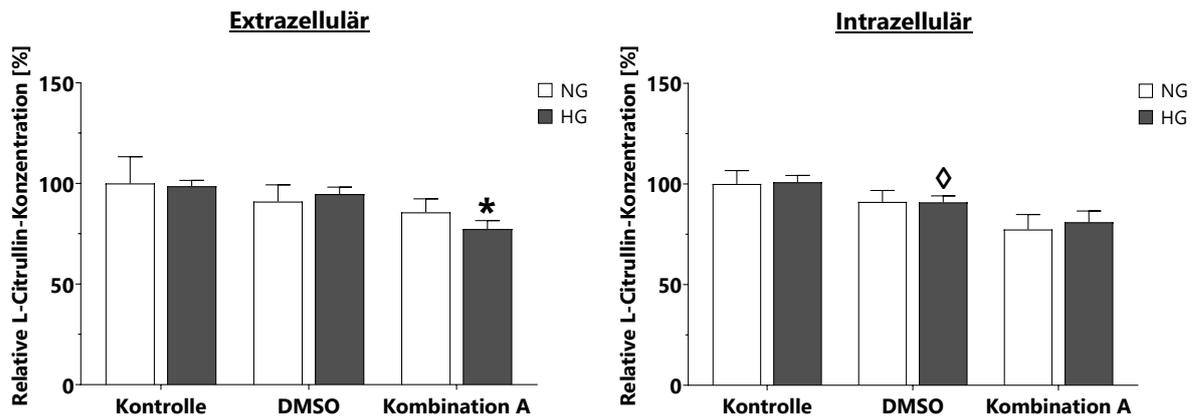


Abbildung 47: Extra- und intrazelluläre relative L-Citrullin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose. EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch LC-MS/MS wurde die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der mittleren relativen Konzentration von L-Citrullin [%] ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (◇  $p < 0,05$  vs. HG; \*  $p < 0,05$  vs. DMSO). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

DMSO senkte nur unter High Glucose die intrazelluläre Konzentration von L-Citrullin ( $90,9 \pm 3,2\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Die extrazelluläre L-Citrullin-Konzentration wurde durch DMSO unabhängig von der Glucose-Konzentration nicht signifikant beeinflusst (NG:  $91,0 \pm 8,3\%$ ; HG:  $94,7 \pm 3,5\%$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle senkte Pflanzenkombination A nur die extrazelluläre Konzentration von L-Citrullin-Konzentration unter High Glucose ( $77,4 \pm 4,2\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Unter Normal Glucose hatte die Pflanzenkombination A keinen signifikanten Einfluss auf die extrazelluläre Konzentration ( $85,7 \pm 6,7\%$ ). Unabhängig von der Glucose-Konzentration wurde die intrazelluläre L-Citrullin-Konzentration durch die Pflanzenkombination A nicht signifikant verändert (NG:  $77,4 \pm 7,4\%$ ; HG:  $81,0 \pm 5,5\%$ ).

## L-Ornithin

Abbildung 48 zeigt das Ergebnis der LC-MS/MS-Messung der L-Ornithin-Konzentration nach der Stimulation von EA.hy926-Zellen mit Pflanzenkombination A.

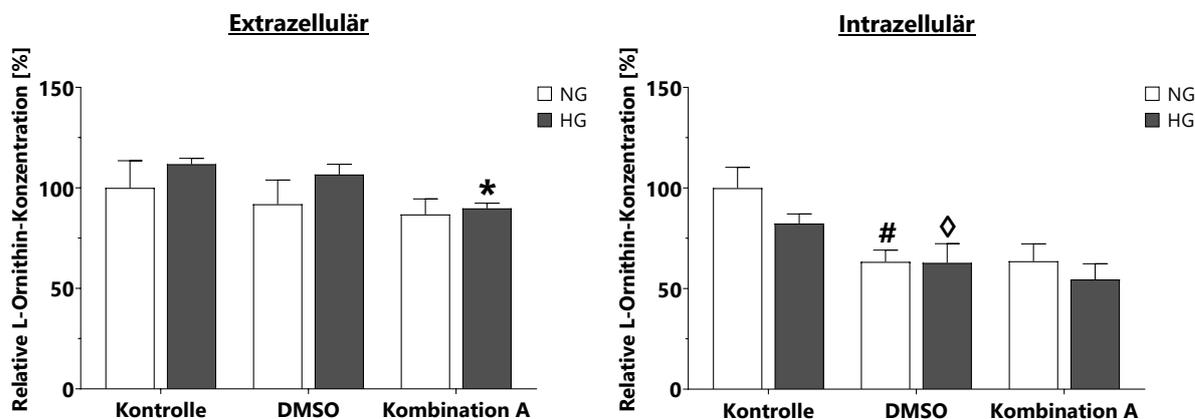


Abbildung 48: Extra- und intrazelluläre relative L-Ornithin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose. EA.hy926-Zellen wurden 48 h unter 5,5 mM Glucose (NG) und 25,0 mM Glucose (HG) mit Pflanzenkombination A kultiviert. Diese enthielt 70 µg/ml Ginseng (gelöst in ddH<sub>2</sub>O), 100 µg/ml Ginkgo und 15 µg/ml Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO). Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Durch LC-MS/MS wurde die extra- und intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin gemessen, auf die Proteinkonzentration normalisiert und auf die Kontrolle (NG) bezogen. Angabe der mittleren relativen Konzentration von L-Ornithin [%] ± SD (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (# p < 0,05 vs. NG; ◇ p < 0,05 vs. HG; \* p < 0,05 vs. DMSO). HG: High Glucose, NG: Normal Glucose

DMSO senkte die intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin unter Normal ( $63,3 \pm 5,8\%$ ;  $p = 0,0286$ ) und unter High Glucose ( $62,8 \pm 9,5\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Extrazellulär wurde die L-Ornithin-Konzentration durch das Lösungsmittel Glucose-unabhängig nicht signifikant beeinflusst ( $91,9 \pm 12,0\%$ ;  $106,7 \pm 5,1\%$ ). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde nur die extrazelluläre L-Ornithin-Konzentration durch die Pflanzenkombination A signifikant beeinflusst. Diese wurde unter High Glucose gesenkt ( $89,9 \pm 2,6\%$ ;  $p = 0,0286$ ). Unabhängig von der Glucose-Konzentration wurde die intrazelluläre Konzentration von L-Ornithin durch Pflanzenkombination A nicht signifikant verändert (NG:  $63,6 \pm 8,6\%$ ; HG:  $54,5 \pm 7,8\%$ ).

## **Diskussion**

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Arginase unter hyperglykämischen Bedingungen in EA.hy926-Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Arginase 2 unabhängig von der Glucose-Konzentration des Mediums die prädominante Arginase-Isoform in EA.hy926-Zellen ist. Die Regulation der unter High Glucose erhöhten Arginase-Aktivität fand in diesen Zellen auf der Transkriptionsebene statt.

Einzelne Pflanzenextrakte beeinflussten die Arginase-Expression und / oder Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen sowohl unter Normal als auch unter High Glucose. Ginkgo senkte die Arginase 2 Genexpression unter High Glucose, die Enzymaktivität wurde Glucose-unabhängig nicht beeinflusst. Ginseng senkte die Arginase 2 Proteinexpression und die Arginase-Aktivität nur unter Normal Glucose. Granatapfel hatte von allen untersuchten Pflanzenextrakten den größten Effekt auf die Arginase. Der Einzalextrakt erhöhte unabhängig von der Glucose-Konzentration sowohl die Arginase 2 Gen- und Proteinexpression als auch die Enzymaktivität. Mariendistel reduzierte Glucose-unabhängig die Genexpression von Arginase 2, während die Arginase-Aktivität gleichzeitig anstieg. Rosskastanie senkte die Arginase-Aktivität unter Normal Glucose und die Arginase 2 Genexpression unter High Glucose. Olive hatte unabhängig von der Glucose-Konzentration keinen Effekt auf die Arginase-Expression und Arginase-Aktivität.

Durch die Kombination aus Ginseng, Ginkgo und Rosskastanie konnte der inhibitorische Effekt der Einzalextrakte auf die Arginase-Aktivität unter High Glucose verstärkt werden. Die Gen- und Proteinexpression der Arginase 2 wurde durch die Kombination nicht verändert. Der Zusatz von Olive zu der Pflanzenkombination verstärkte die Aktivitätshemmung nicht weiter.

### **1. Arginase-Regulation in EA.hy926 unter High Glucose**

Die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion wird durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt, so unter anderem durch die bei Diabetes mellitus vorhandene Hyperglykämie [14]. Die Veränderung und der Verlust der Endothelfunktion wird für die mit einer Diabetes-Erkrankung assoziierten Schädigung der Blutgefäße in Verbindung gebracht [7]. Das Enzym Arginase katalysiert die Hydrolyse von L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin [22] und steht im Zusammenhang mit dem Funktionsverlust des Endothels, da es mit der NO-Synthase um das Substrat L-Arginin konkurriert [33]. Es existieren zwei Isoformen, Arginase 1 und Arginase 2, die im Körpergewebe unterschiedlich stark exprimiert werden. Während Arginase 1 vorwiegend in der Leber vorkommt und dort die finale Reaktion des Harnstoffzyklus katalysiert, ist Arginase 2 ubiquitär exprimiert und dient der Synthese von L-Ornithin. Dieses ist für die Bildung der Polyamine, L-Prolin und L-Glutamat bedeutend [25]. Eine Hochregulation der Arginase-Aktivität wurde bei diversen kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet, wobei die beiden Isoformen auf unterschiedliche Weise an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. In einem Tiermodell für systemischen Bluthochdruck war die Arginase-Aktivität in den Mesenterialarterien, welche für die

Blutversorgung des Darms verantwortlich sind, von spontan hypertensiven Ratten erhöht. Die Untersuchungen der Proteinexpression zeigten eine erhöhte Expression des Arginase 1-Proteins, während das Arginase 2-Protein unverändert exprimiert wurde. Durch die Behandlung mit dem Arginase-Inhibitor  $N_{\omega}$ -Hydroxy-Nor-L-Arginin (nor-NOHA) konnte der Blutdruck der hypertensiven Ratten signifikant gesenkt werden [61]. In Endothelzellen aus Lungen von Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) wurde eine Erhöhung der Arginase-Aktivität und eine verstärkte Expression des Arginase 2-Proteins nachgewiesen. Zudem produzierten die Zellen weniger NO [62]. In einem Zellmodell für Atherosklerose zeigte die Stimulation von *Human Aortic Endothelial Cells* (HAEC) mit oxidiertem LDL eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der Arginase-Aktivität, welche mit einer reduzierten Bildung der NO-Metabolite Nitrit und Nitrat einherging. In den HAEC-Zellen konnte eine verstärkte Expression des Arginase 2-Gens nachgewiesen werden [63]. Die erektile Dysfunktion gilt als früher Marker von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [64]. Im Plasma von Patienten mit erektiler Dysfunktion wurde eine erhöhte Konzentration des Arginase 2-Proteins gemessen, ohne Veränderung der Arginase-Aktivität. Die Studie zeigte zudem, dass Polymorphismen des Arginase 1-Gens den Schweregrad der Erkrankung beeinflussten [65]. Eine andere klinische Studie untersuchte die Expression der Arginase und die Enzymaktivität im diabetischen Schwellkörper. Es wurden keine Veränderungen der Gen- und Proteinexpression von Arginase 1 festgestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren im diabetischen Gewebe jedoch die Gen- und Proteinexpression von Arginase 2 und die Arginase-Aktivität erhöht. Durch die Behandlung mit dem Arginase-Inhibitor 2(S)-Amino-6-boronoheptansäure (ABH) konnte die erhöhte Enzymaktivität gehemmt werden [66].

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen in der hier vorliegenden Arbeit zeigten, dass das Arginase 1-Gen unabhängig von der Glucose-Konzentration des Mediums nicht in EA.hy926-Zellen exprimiert wurde. Das dabei verwendete Verfahren, die qRT-PCR, ist eine Standardmethode zur Vervielfältigung von Nucleinsäuren. Unter Verwendung der Zykluszahl, bei der die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals erstmals über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (*cycle threshold*,  $c_T$ ), können Rückschlüsse auf die Expression eines Gens geschlossen werden [67]. Der  $c_T$ -Wert ist umso kleiner, je stärker ein Gen exprimiert wird. Auch wenn in der Literatur kein direkter Grenzwert angegeben wird, ab welchem  $c_T$ -Wert ein Gen als „nicht exprimiert“ gilt, zeigen die Ergebnisse doch, dass das Arginase 1-Gen mit  $c_T$ -Werten zwischen 34 und 36 verglichen mit den Genen der Arginase 2 (25 - 27) und der endothelialen NO-Synthase (20 - 24) nicht exprimiert wurde. Zwar könnte durch eine Erhöhung der eingesetzten Template-Menge eine Erniedrigung des  $c_T$ -Werts erreicht werden, es wären aber mindestens acht PCR-Zyklen nötig, um den  $c_T$ -Wert von Arginase 1 in einen Größenbereich zu verschieben, der mit den anderen Zielgenen vergleichbar ist. Unter der Annahme, dass sich die Anzahl der PCR-Produkte pro Zyklus verdoppelt [67], müsste dazu die 256-fache Menge an cDNA eingesetzt werden. Daher kann aus den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse geschlossen werden, dass

Arginase 2 die prädominante Arginase-Isoform in EA.hy926-Zellen war und dies durch die Stimulation mit Glucose nicht beeinflusst wurde.

Hinsichtlich der Enzymregulation weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die unter High Glucose erhöhte Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen auf der Transkriptionsebene reguliert war. Zwar war in den qRT-PCRs der zeitabhängigen Stimulationsversuche nur ein Trend zu einer erhöhten Arginase 2 Genexpression vorhanden (s. Abbildung 17), nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten war das Arginase 2-Gen unter High Glucose im Vergleich zur Kontrolle jedoch signifikant stärker exprimiert (s. Abbildung 27). Infolge der gesteigerten Genexpression erhöhte sich die Menge an mRNA in der Zelle, sodass mehr Protein synthetisiert werden könnte. Durch die Stimulation mit Glucose wurde die Proteinexpression der Arginase 2 nicht signifikant beeinflusst, es waren jedoch Trends zu einer erhöhten Proteinexpression unter High Glucose in den zeitabhängigen Versuchen vorhanden (s. Abbildung 19), sodass die Steigerung der Arginase 2 Genexpression unter High Glucose eine Erklärung für eine erhöhte Expression des Arginase 2-Proteins und die daraus resultierende Enzymaktivität wäre. Die Protein-Quantifizierung in dieser Arbeit erfolgte mittels Western Blot. Hierbei handelt es sich um eine semiquantitative Methode, da Proteinkonzentrationen nur relativ miteinander verglichen werden und technische Unterschiede (z.B. Beladung der einzelnen Taschen, Transferrate) die Quantifizierung stark beeinflussen können [68]. Durch die Verwendung einer weiteren Methode (z.B. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) könnte die Beeinflussung der Proteinexpression durch Glucose unterstützend untersucht werden.

In der Literatur wurde mehrfach eine Hochregulation der Gen- und Proteinexpression der Arginase unter Hyperglykämie beobachtet. Allerdings ist Arginase 1 die Isoform, für die diese Hochregulation beschrieben wird. Shatanawi et al. untersuchten die Regulation der Arginase unter High Glucose (25,0 mM; 72 h) in Endothelzellen der Rinder-Aorta (*Bovine Aortic Endothelial Cells*, BAEC) und zeigten eine erhöhte Arginase 1 Genexpression unter High Glucose [69]. Die Aussagen dieser Studie beschränken sich nur auf Arginase 1, sodass unklar ist, ob Arginase 2 durch die Stimulation nicht beeinflusst wurde oder ob die Versuche für Arginase 2 nicht durchgeführt wurden. Des Weiteren wurde als Versuchsmodell der Studie eine Rinder-Zelllinie ausgewählt. Auch wenn sich die Enzyme aus unterschiedlichen Organismen zwar ähneln, können Ergebnisse aus Tiermodellen nicht vollständig auf den Menschen übertragen werden und eignen sich daher eher für eine erste Einordnung [70]. Mazrouei et al. untersuchten die Regulation der Arginase unter hyperglykämischen Bedingungen (15 mM, 25 mM; 24 h, 48 h) in einer Zelllinie aus der menschlichen Nabelschnurvene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) [71]. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Expression des Arginase 1-Proteins unter High Glucose über die Zeit anstieg, während die Arginase 2 Proteinexpression nicht beeinflusst wurde. Es wurden keine weiteren Angaben zur Durchführung einer Genexpressionsanalyse gemacht, sodass auch in dieser Studie nicht geklärt wird, ob eine veränderte Genexpression die Ursache der erhöhten Proteinexpression ist oder nicht. Mazrouei et al. verwendeten HUVEC-Zellen als Zellmodell, die Versuche

der vorliegenden Arbeit wurden in EA.hy926-Zellen durchgeführt. EA.hy926-Zellen sind durch die Fusion von HUVEC-Zellen und der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 entstanden [72]. Auch wenn die Zelllinien miteinander verwandt sind, können sich die Eigenschaften der Zellen dennoch unterscheiden. So konnten Uruski et al. in ihrer Studie zeigen, dass EA.hy926-Zellen verglichen mit HUVEC-Zellen eine höhere Stresstoleranz gegenüber Glucose (30,0 mM; 72 h) aufweisen [73]. Lu et al. fanden heraus, dass sich die zellproliferierenden Eigenschaften von EA.hy926-Zellen und A549-Zellen zwar ähneln, EA.hy926-Zellen jedoch eine im Vergleich erhöhte Fähigkeit zur Adhäsion und Migration besitzen [74]. Die Unterschiede im biologischen Verhalten zwischen den Zelllinien könnten in der unterschiedlich stark ausgeprägten Expression von Proteinen in den Zellen begründet sein. Beleznai et al. fanden in ihrer klinischen Studie mit Typ-1 und Typ-2 Diabetikern eine erhöhte Arginase 1 Proteinexpression in den Koronararteriolen der Patienten [75]. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen der Literatur und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der hochregulierten Arginase-Isoform, könnte im experimentellen Ansatz und im untersuchten biologischen Material liegen. Die in dieser Arbeit verwendeten EA.hy926-Zellen sind ein makrovaskuläres Zellmodell und stellen als solches das Endothel großer Blutgefäße (Arterien, Venen) dar [76]. Der Vergleich zu Studienergebnissen, die auf Versuchen an Gewebe basieren, ist nur begrenzt möglich, da Gewebe im Vergleich zu einer Zelllinie komplexer aufgebaut ist. So setzen sich beispielsweise Blutgefäße aus diversen Zelltypen (Endothelzellen, Muskelzellen, Fibroblasten, Immunzellen) und weiterem extrazellulären Material (Proteoglykane, elastische Fasern, Kollagen, Proteine) zusammen [9], in denen die Arginase-Isoformen unterschiedlich stark exprimiert sein können. Wei et al. zeigten beispielsweise in ihrer Studie an glatten Muskelzellen aus der Ratte (*Rat Aortic Smooth Muscle Cells*, RASMC) dass das Gen und Protein der Arginase 1 in diesen Zellen konstitutiv exprimiert wird, nicht aber Arginase 2 [77]. Arteriolen, wie sie in der klinischen Studie von Beleznai et al. untersucht wurden, gehören zur Endstrombahn und damit in den Bereich der Mikrozirkulation [9]. Dies könnte auch den Unterschied zur Studie von Mazrouei et al. erklären, die in ihrer Studie HUVEC-Zellen verwendeten. Diese sind, im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten EA.hy926-Zellen, ein mikrovaskuläres Zellmodell und repräsentieren als solches das Endothel von Arteriolen, Kapillaren und kleinsten Blutgefäßen [76]. Pernow et al. zeigten in einem Mausmodell für Typ-1 Diabetes, dass die Arginase-Isoformen regional unterschiedlich exprimiert werden. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe erfolgten dabei an arteriellen Gefäßästen der rechten und linken Koronararterie und der Mesenterialarterie. Während die Proteinexpression von Arginase 1 und der endothelialen NO-Synthase in den diabetischen Koronararterien erhöht war, zeigten die Mesenterialarterien der diabetischen Mäuse eine erhöhte Expression des Arginase 2-Proteins und eine reduzierte Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase [78]. Auch wenn Pernow et al. keine Genexpressionsanalysen durchführten, belegt die Studie dennoch, dass regional Expressionsunterschiede vorhanden sind und eine Hochregulation der Arginase 2 unter Hyperglykämie zu der Entstehung der endothelialen Dysfunktion in großen Blutgefäßen beitragen könnte.

## 2. Beeinflussung des Arginase-eNOS-Gleichgewichts durch Glucose

In vielen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Arginase-Aktivität und einer Veränderung der NO-Produktion festgestellt werden. Aufgrund der Konkurrenz um das Substrat L-Arginin resultiert aus einer gesteigerten Arginase-Aktivität eine reduzierte Bildung von NO durch die endotheliale NO-Synthase [25], [26], [33]. Berkowitz et al. wiesen ein Ungleichgewicht in der Beziehung zwischen der Arginase und der endothelialen NO-Synthase während des Alterungsprozesses in Ratten nach. In der Aorta der älteren Ratten war im Vergleich zur jüngeren Kontrollgruppe die Arginase-Aktivität erhöht und die Konzentration von cGMP sowie die NOS-Aktivität reduziert. Die Behandlung der älteren Ratten mit den Arginase-Inhibitoren S-(2-Boronoethyl)-L-cystein (BEC) und  $\alpha$ -Difluoromethylornithin (DFMO) hob die cGMP-Konzentration und die NOS-Aktivität auf das Niveau der Kontrollgruppe an. Dies zeigte, dass durch die Arginase die Verfügbarkeit von L-Arginin und infolgedessen die NOS-Aktivität in der Rattenaorta im Alter beeinflusst wird [79].

Die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit zeigten eine gegenläufige Veränderung der Expression des Arginase 2-Gens und des Gens der endothelialen NO-Synthase in EA.hy926-Zellen unter High Glucose. Dies weist auf eine Gegenregulation der beiden Enzyme auf der Transkriptionsebene hin. Mazrouei et al. zeigten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen der unter High Glucose erhöhten Arginase 1 Proteinexpression und einer erniedrigten Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase in HUVEC-Zellen [71]. Jedoch wurde die Genexpression der beiden Enzyme nicht untersucht, sodass erneut nicht geklärt wird, ob eine veränderte Genexpression die Ursache für die Veränderung der Proteinexpression ist. Zusätzlich wurde in der Studie von Mazrouei et al. das Phosphorylierungsmuster der endothelialen NO-Synthase untersucht, da die posttranslationale Phosphorylierung für die Regulation der Enzymaktivität entscheidend ist. So erhöht eine Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> den Elektronenfluss durch die Reduktasedomäne und infolgedessen die Enzymaktivität, während eine Phosphorylierung an Thr<sup>495</sup> diesen Elektronenfluss reduziert und damit die Enzymaktivität senkt [29]. Die Versuche von Mazrouei et al. zeigten eine reduzierte Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> und eine unveränderte Phosphorylierung an Thr<sup>495</sup> [71], wodurch die Arbeitsgruppe die unter High Glucose reduzierte Aktivität der endothelialen NO-Synthase in HUVEC-Zellen erklärte. Inwiefern die erhöhte Arginase 1-Proteinexpression mit dem veränderten Phosphorylierungsmuster in Verbindung stand, wurde in der Studie nicht weiter untersucht. Mit dieser Fragestellung befassten sich Koo et al. in einem Zell- (HUVEC) und einem Tiermodell (ArgII<sup>-/-</sup>-Knockout). Die Arbeitsgruppe behandelte HUVEC-Zellen mit dem Arginase-Inhibitor ABH, um die Arginase-Aktivität insgesamt, und mit *small interfering RNA* (siRNA), um Arginase 2 direkt, zu hemmen. Infolge der Arginase-Inhibierung wurde das Phosphorylierungsmuster der endothelialen NO-Synthase in den HUVEC-Zellen so verändert, dass Ser<sup>1177</sup> vermehrt und Thr<sup>495</sup> reduziert phosphoryliert wurde. In der Aorta der ArgII<sup>-/-</sup>-Knockoutmäuse wurde dasselbe Phosphorylierungsmuster nachgewiesen [80]. Auch Du et al. wiesen eine Abnahme der Aktivität der endothelialen NO-Synthase unter Hyperglykämie (30 mM, 48 h) in BAEC-Zellen nach, die auf der unter

den Versuchsbedingungen reduzierten Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> beruhte [81]. Diese Studien zeigen einen weiteren Mechanismus, durch den die Arginase die Aktivität der endothelialen NO-Synthase beeinflussen könnte.

Da eine erhöhte Arginase-Aktivität die Bildung von NO nachweislich beeinflusst und die Endothelfunktion infolgedessen gestört ist, stellt die Arginase ein potentiell Target und ihre Hemmung eine Möglichkeit zur Prophylaxe und Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen dar [25]. Demougeot et al. konnten beispielsweise durch die Behandlung von spontan hypertensiven Ratten mit dem Arginase-Inhibitor DMFO die Endothelfunktion aufrechterhalten und die Entwicklung von Bluthochdruck verhindern [82]. Der Einsatz von Pflanzenextrakten nimmt aufgrund der großen therapeutischen Breite und vergleichsweise guten Verträglichkeit immer mehr an Bedeutung zu. Einige Pflanzeninhaltsstoffe konnten bereits als Inhibitoren der Arginase-Aktivität identifiziert werden [83]. Somit wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Pflanzenextrakte, deren Einfluss auf die Arginase-Expression und -Aktivität bislang noch unklar war, auf ihre Eignung als Arginase-Inhibitoren untersucht.

### **3. Effekt der einzelnen Pflanzenextrakte und der Kombination**

#### **3.1. Bestimmung des Referenzgens**

Bei der Auswertung der Multiplex-qRT-PCR wird die Expression des Zielgens im Verhältnis zu einer internen Kontrolle, dem Referenzgen, betrachtet [56]. Um auch geringe Änderungen in der Genexpression infolge einer Stimulation feststellen zu können, setzt dies voraus, dass das verwendete Referenzgen unter den ausgewählten Versuchsbedingungen stabil exprimiert wird [84]. Da aber auch die Expression der Referenzgene variieren und so möglicherweise zu fehlerhaften Quantifizierungsergebnissen führen kann, sollten Referenzgene vorab auf ihre Eignung geprüft werden [56], [85]. Für die Analysen der Genexpression nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten wurde aus insgesamt neun Referenzgen-Kandidaten aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen das optimale Referenzgen bestimmt. Gemäß Klenke et al. wurden für die Auswertung der qRT-PCRs unterschiedliche Analysemethoden herangezogen [86]. Diese lieferten unterschiedliche Ergebnisse, sodass je nach Methode ein anderer Referenzgen-Kandidat als am stabilsten exprimiert galt (s. Ergebnisse, Kapitel 2.1). Dies verdeutlichte, dass für die Wahl des Referenzgens mehr als eine Analysemethode angewendet werden sollte.

Für die Referenzgen-qRT-PCRs nach der Stimulation mit den Einzelextrakten war unter der Berücksichtigung aller Analysemethoden *TBP* der unter den Versuchsbedingungen am stabilsten exprimierte Referenzgen-Kandidat.

#### **3.2. Effekt der einzelnen Pflanzenextrakte**

Auch nach der Stimulation der Zellen mit den einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal Glucose war das Arginase 1-Gen nicht in EA.hy926-Zellen exprimiert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass

alle Effekte auf die Arginase-Aktivität in den Experimenten der vorliegenden Arbeit auf Arginase 2 zurückzuführen sind.

**Ginkgo** wurde aufgrund seiner durchblutungsfördernden Wirkung für die Versuche in dieser Arbeit ausgewählt [40]. In EA.hy926-Zellen reduzierte Ginkgo die Arginase-Aktivität nur unter High Glucose. Hyperglykämie ist durch eine vermehrte Bildung von ROS und erhöhtem oxidativem Stress in der Zelle gekennzeichnet [16]. Für den Ginkgo-Spezialextrakt EGb 761® konnten in der Studie von Ren et al. antioxidative Eigenschaften gezeigt werden. Der Spezialextrakt erhöhte die Überlebensrate von BAEC-Zellen unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und schützte die Endothelzellen vor den durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Schädigungen [87]. Ou et al. zeigten in HUVEC-Zellen, dass der durch oxidiertes LDL ausgelöste oxidative Stress durch die Stimulation mit Ginkgo gesenkt werden konnte. Neben der reduzierten Bildung von ROS war zudem die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) in den HUVEC-Zellen erhöht [48]. So wäre es möglich, dass die antioxidative Wirkung des Ginkgos den durch Hyperglykämie erzeugten oxidativen Stress in den EA.hy926-Zellen reduzierte und somit in Folge die ROS-vermittelte Aktivitätssteigerung der Arginase verhinderte. Koltermann et al. beeinflussten unter Nutzung des Spezialextrakts EGb 761® die Genexpression der endothelialen NO-Synthase und die posttranslationale Phosphorylierung des Proteins in EA.hy926-Zellen, wodurch die Synthese von NO erhöht wurde [88]. Auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit war das Gen der endothelialen NO-Synthase in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Ginkgo erhöht. Inwiefern die Enzymaktivität durch den Einzelextrakt beeinflusst werden konnte, müsste durch eine anschließende Aktivitätsmessung und / oder Messung der Proteinphosphorylierung untersucht werden.

**Ginseng** wurde aufgrund seiner adaptogenen Wirkung als Pflanze für die Versuche dieser Arbeit ausgewählt [43]. In einer Studie von Ahn et al. wurde in HUVEC-Zellen durch die Stimulation mit Ginseng-Extrakten und einzelnen Ginsenosiden das Phosphorylierungsmuster der endothelialen NO-Synthase beeinflusst und infolgedessen die Enzymaktivität und Bildung von NO erhöht [49]. Shin et al. konnten in ihrer Studie die Arginase-Aktivität in HUVEC-Zellen durch die Stimulation mit Ginseng hemmen, während die Bildung von NO unter dem Einzelextrakt zunahm. Die Proteinexpression von Arginase 2 und der endothelialen NO-Synthase wurden dabei nicht verändert [89]. In der vorliegenden Arbeit reduzierte Ginseng die Arginase 2-Proteinexpression und die Arginase-Aktivität in den EA.hy926-Zellen nur unter Normal Glucose, unter High Glucose hatte der Einzelextrakt keinen Effekt. Dies lässt darauf schließen, dass der Extrakt bei erhöhtem oxidativen Stress unter High Glucose nicht ausreichend wirksam war, obwohl in einer Studie von Kim et al. antioxidative Effekte für Ginseng beschrieben wurden [90]. In dieser doppelblinden, randomisierten Studie mit 82 gesunden Probanden wurde gezeigt, dass durch die Einnahme hoher Dosen von 1 g oder 2 g Ginseng-Extrakt/ Tag über 4 Wochen die Serumspiegel von ROS und Malondialdehyd, einem Marker für oxidativen Stress, reduziert wurden. Es ist daher denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Konzentration des Ginsengs zu gering war, um unter High Glucose antioxidativ wirksam zu sein. Die Abnahme der Arginase-Aktivität unter Normal Glucose

in den EA.hy926-Zellen könnte aus einem verstärkten Abbau des Arginase 2-Proteins, welcher durch Ginseng angeregt wird, folgen.

Da seine schützende Wirkung bei endothelialer Dysfunktion mehrfach beschrieben wurde und die Pflanze insbesondere für ihre antioxidative Wirkung bekannt ist [91], wurde der **Granatapfel** für die Versuche in dieser Arbeit ausgewählt. Omar et al. untersuchten die Wirkung von Punicalagin, dem Hauptinhaltsstoff der Granatapfelschalen [39], auf die NO-Synthese in EA.hy926-Zellen. Die Studie zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Bildung von NO. Da die Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase durch die Stimulation nicht verändert wurde, vermutete die Arbeitsgruppe eine Steigerung der Enzymaktivität infolge einer Veränderung des Phosphorylierungsmusters des eNOS-Proteins. Näher untersucht wurde die Hypothese in der Studie jedoch nicht [50]. Nigris et al. simulierten in ihrem Zellmodell gestörte Blutströmungsverhältnisse und lösten dadurch oxidativen Stress in *Human Coronary Artery Endothelial Cells* (HCAEC) aus. Dieser konnte durch einen Extrakt aus Granatapfel Früchten und durch ein Konzentrat des Granatapfelsafts verringert werden. Weiter wurde die zuvor herabgesetzte Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase und die intrazelluläre cGMP-Konzentration erhöht, wobei der Effekt des Fruchtextrakts im Vergleich zum Konzentrat stärker war [92]. In der vorliegenden Arbeit war der Effekt des Granatapfels auf die Arginase von allen untersuchten Pflanzenextrakten am stärksten. Entgegen allen Erwartungen wurde durch den Einzelextrakt die Arginase-Aktivität in den EA.hy926-Zellen allerdings sehr stark erhöht. Auch waren sowohl das Gen als auch das Protein der Arginase 2 unter dem Granatapfel stärker exprimiert. Da mRNA, Protein und Aktivität gleichsinnig anstiegen, ist davon auszugehen, dass die Regulation unter dem Granatapfel auf der Transkriptionsebene stattfand. Für das murine Arginase 2-Gen wurden AP-1, CRE-BP1, CRE-BP2, NF- $\kappa$ B und SP1 als Promotorsequenzen beschrieben [93], sodass in kommenden Versuchen untersucht werden könnte, inwiefern diese Sequenzen an der Hochregulation der Arginase 2-Genexpression in EA.hy926-Zellen beteiligt sind. Die Wahl der Extrakt-Konzentration, die in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurde, erfolgte basierend auf der Studie von Omar et al., in der der Effekt von Punicalagin als Reinsubstanz untersucht wurde [50]. In der Studie von Seeram et al. wurde die Wirkung des Saftes des Granatapfels mit der Wirkung der darin enthaltenen Polyphenole Punicalagin und Ellagsäure als Reinsubstanz in verschiedenen Krebszelllinien verglichen. Es zeigte sich, dass Punicalagin und Ellagsäure selbst auch antiproliferativ, apoptotisch und antioxidativ wirksam sind, die Wirkung des Granatapfelsafts aufgrund synergistischer Effekte im Vergleich jedoch deutlich größer ist [94]. Dies zeigt, dass sich die Wirkung des Extrakts von denen der Einzelsubstanzen in der Stärke unterscheiden können.

**Mariendistel** wurde trotz der vorrangigen Anwendung der Pflanze und ihrer Zubereitungen bei gastrointestinalen Beschwerden und chronischen Leberentzündungen in dieser Arbeit untersucht, da für den Hauptwirkstoff antioxidative Wirkungen beschrieben sind [95]. Als Hauptwirkstoff der Mariendistel gilt ein Gemisch aus Flavanonderivaten, genannt „Silymarin“, mit Silybinin, Silydianin und Silychristin als

wesentlichen Bestandteilen [43]. Die Stimulation der EA.hy926-Zellen mit Mariendistel in dieser Arbeit bewirkte eine gegensätzliche Beeinflussung der Genexpression der endothelialen NO-Synthase und Arginase 2: während das Gen der endothelialen NO-Synthase stärker exprimiert wurde, sank die Expression des Arginase 2-Gens. Trotz der reduzierten Genexpression war die Arginase-Aktivität unter der Mariendistel erhöht, sodass die Enzymaktivität demnach auf der Funktionsebene reguliert war. Silymarin und dessen Bestandteile gehören zu der Klasse der Polyphenole. Diese können über ihre phenolischen OH-Gruppen Wasserstoffbrücken und ionische Bindungen mit freien Aminogruppen von Proteinen bilden und dadurch die Konformation von Proteinen ändern [39]. Möglicherweise wurde auf diese Weise die Proteinkonformation der Arginase 2 so verändert, dass entweder die Affinität zum Substrat L-Arginin oder die Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  erhöht wurde. Da die Glucose-Konzentration des Mediums keinen Einfluss auf die Wirkung des Extrakts hatte, scheint oxidativer Stress kein entscheidender Faktor des zugrundeliegenden Wirkmechanismus zu sein. Die Studie von Palomino et al. untersuchte die endothelschützende Wirkung eines Extrakts aus Mariendistelsamen vor oxidativem Stress in EA.hy926-Zellen. Die Arbeitsgruppe testete verschiedene Konzentrationen des Extrakts und zeigte, dass bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml keine Zellschäden induziert wurden [51]. Die Silymarin-Zusammensetzung des Extrakts von Palomino et al. ähnelte trotz der unterschiedlichen Pflanzenteile (Samen und Früchte) der Zusammensetzung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Extrakts. Aus diesem Grund wurde diese Konzentration für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ausgewählt.

**Olive** wurde aufgrund ihrer antihypertensiven Wirkung in dieser Studie untersucht [39]. Für die blutdrucksenkende Wirkung der Olivenblätter soll das darin enthaltene Oleuropein verantwortlich sein [39]. Der zu den Polyphenolen gehörende Inhaltsstoff hemmt die Thrombozytenaggregation und wirkt zudem antioxidativ, antiinflammatorisch und antiatherogen [96]. In einer Studie von Khayyal et al. wurde in Ratten durch die tägliche Gabe von  $N^G$ -Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME), einem Inhibitor der endothelialen NO-Synthase, ein Bluthochdruck erzeugt und dieser mit Hilfe eines Extrakts aus Olivenblättern gesenkt [97]. In einer doppelblinden, randomisierten klinischen Studie wurde die blutdrucksenkende Wirkung des Olivenblätter-Spezialextrakt EFLA®943 mit der Wirkung von Captopril, einem Inhibitor des Angiotensin-Konversionsenzyms, an Patienten mit Bluthochdruck im Stadium 1 (systolisch: 140-159 mm HG, diastolisch: < 99 mm HG) verglichen. Es wurde gezeigt, dass der Spezialextrakt den systolischen und diastolischen Blutdruck ähnlich wirksam senkte wie Captopril und zusätzlich den Triglyceridspiegel reduzierte [98]. In den EA.hy926-Zellen wurden unabhängig von der Glucose-Konzentration des Mediums weder die Arginase-Expression noch die Arginase-Aktivität durch die Stimulation mit Olive verändert. In der Studie von Khayyal et al. konnte ein zeitlich versetzter Wirkungseintritt des Extrakts beobachtet werden. Insgesamt wurden die hypertensiven Ratten über 12 Wochen mit dem Olivenextrakt behandelt. Nach einem anfänglichen Anstieg des Blutdrucks, trat die hypotensive Wirkung erst nach 8 Wochen ein [97]. Es ist also möglich, dass der Beobachtungszeitraum

der vorliegenden Arbeit zu kurz war und die durch die Olive vermittelten Effekte erst nach einer länger andauernden Stimulation eintreten. An dieser Stelle wären Langzeitversuche nötig, um die Wirksamkeit des Einzelextrakts besser beurteilen zu können.

**Roskastanie** wurde aufgrund der venenstärkenden und antiinflammatorischen Wirkung in dieser Arbeit untersucht [43]. Die Wirkung des Extrakts aus Roskastaniensamen wird durch Aescin, einem komplexen Gemisch aus Triterpensaponinen, vermittelt [39]. Carrasco et al. untersuchten die endothelschützende Wirkung des Aescin an Aortenringen von Ratten. Die Arbeitsgruppe beobachtete eine verbesserte vasodilatierende Reaktion der Aortenringe unter Aescin nach der Stimulation mit Acetylcholin und eine Erhöhung der NO-Produktion [99]. Inwiefern die Arginase-Aktivität unter den Versuchsbedingungen verändert war, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Die Forscher gingen davon aus, dass die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase infolge eines erhöhten Calciumeinstroms die Ursache für die Zunahme der NO-Synthese war. Triterpensaponine sind strukturbedingt in der Lage, in Biomembranen einzudringen und mit dem darin enthaltenen Cholesterol Komplexe zu bilden. Ihr hydrophiler Zuckerrest interagiert dabei auf der Membranaußenseite mit Glykoproteinen und -lipiden. Durch diese Interaktion wird die Membranfluidität gestört [39]. Die Arginase ist ein Metalloenzym und benötigt als solches divalente Kationen, um aktiv zu sein. Unter physiologischen Bedingungen ist dies  $Mn^{2+}$ . Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Enzym auch mit anderen gebundenen Kationen, wie z.B.  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , aktiv sein kann [28]. Durch die Interaktion der Triterpensaponine der Roskastanie mit der Biomembran könnten sich Poren gebildet und das Ein- und Ausströmen von Ionen verursacht haben, sodass für die „normale“ Aktivität der Arginase möglicherweise nicht ausreichend divalente Kationen zur Verfügung standen. Dies würde die unter der Roskastanie beobachtete Hemmung der Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen unter Normal Glucose erklären. Unter High Glucose blieb dieser hemmende Effekt aus. Da der hydrophile Zuckerrest der Triterpensaponine auf der Membranaußenseite mit Glykoproteinen und -lipiden interagiert und dies zur Porenbildung beiträgt, wäre es möglich, dass diese Interaktion durch die erhöhte Glucose-Konzentration ausblieb und die Membranfluidität im Vergleich zu Normal Glucose weniger stark gestört wurde.

Für alle Versuche wurde eine Konzentration des jeweiligen Pflanzenextrakts basierend auf den Angaben aus der Literatur ausgewählt und in Vorversuchen auf Zytotoxizität getestet. Die Zusammensetzung von Pflanzenextrakten wird durch viele Faktoren (Ausgangsdroge, Auszugsmittel, Extraktionsverfahren) beeinflusst [42], [43]. Studien in der Literatur enthalten meist nur wenige Angaben zum Herstellungsverfahren oder zum Wirkstoffgehalt der verwendeten Extrakte, was die Vergleichbarkeit von Ergebnissen und die Arbeit mit Pflanzenextrakten erschwert. Ahn et al. untersuchten mehrere Ginseng-Extrakte, die auf unterschiedliche Weise hergestellt wurden, und verglichen ihre Wirkung auf die Bildung von NO in EA.hy926-Zellen. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass der Effekt der Extrakte vom Herstellungsverfahren abhing, da sich die ihre Zusammensetzung und die Konzentration einzelner Komponenten voneinander unterschied [49].

### **3.3. Effekt der Pflanzenkombination**

Es sollte untersucht werden, ob die hemmenden Einzelextrakte in der Kombination einen synergistischen Effekt auf die Arginase-Aktivität haben. Die Voraussetzung für einen solchen Synergismus ist eine Wirkung der Inhaltsstoffe über unterschiedliche Rezeptoren beziehungsweise Signalwege [4]. Die Kombination einzelner Pflanzenextrakte bietet den Vorteil, dass sich die darin enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe in ihrer Wirkung ergänzen oder verstärken können, da sie von Natur aus als „Multi-Target“-Systeme mehrere Signalwege zur selben Zeit stimulieren können [39]. So zeigte die Studie von Ahn et al., dass die Komponenten des Ginsengs in der Kombination einen größeren Effekt auf die NO-Synthese in EA.hy926-Zellen haben als die einzelnen Inhaltsstoffe alleine [49]. Auch in der Studie von Seeram et al. war der Effekt des Granatapfelsafts größer als die des darin enthaltenen Punicalagin und der Ellagsäure als Reinsubstanzen [94].

Die Kombination aus Ginkgo, Ginseng und Rosskastanie senkte die Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen unter High Glucose. Die Einzelextrakte beeinflussten unter denselben Versuchsbedingungen die Arginase-Aktivität nicht signifikant. Da weder die Gen- noch die Proteinexpression durch die Kombination beeinflusst wurde, fand die Hemmung der Arginase-Aktivität somit voraussichtlich auf der Funktionsebene statt. Möglicherweise erfolgte dies durch eine Änderung der Proteinkonformation. Die unter der Pflanzenkombination gesteigerte Genexpression der endothelialen NO-Synthase wurde eventuell durch Ginkgo verursacht, da dieser als einziger Extrakt der Kombination die *NOS3* Genexpression als Einzelextrakt erhöhte. Ob die Aktivität der endothelialen NO-Synthase unter der Kombination erhöht war, müsste durch die entsprechenden Versuche nachfolgend untersucht werden.

#### **4. Ausblick**

Arzneipflanzen werden bereits seit langer Zeit zur Behandlung von Erkrankungen und zur Linderung von Symptomen in vielen Indikationsgebieten eingesetzt. Einige der pflanzlichen Inhaltsstoffe haben dabei ihren Weg als Einzelwirkstoff in die moderne Arzneimitteltherapie gefunden. Neben der Therapie ist auch die Prävention von chronischen Erkrankungen und deren Langzeitfolgen ein wesentlicher Aspekt der Gesundheitsförderung. Für den Diabetes mellitus ist dies insbesondere die Vermeidung der Folgeschäden im kardiovaskulären System.

Die Pflanzenextrakte, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, stellen nur eine kleine Auswahl der Arzneipflanzenvielfalt dar. Basierend auf den Daten publizierter Studien wurden Pflanzenextrakte ausgewählt, für die eine vorteilhafte Wirkung des Pflanzenextrakts auf die Aktivität der Arginase als möglich erachtet wurde. Viele weitere Pflanzen könnten noch auf ihre Arginase-beeinflussenden Eigenschaften unter Hyperglykämie untersucht werden.

Natürlich können molekulare und zelluläre Untersuchungen im Zellkulturmodell nicht direkt zu einer präventiven oder therapeutischen Anwendung am Menschen führen. Hierzu bedarf es weiterer, z.B. konzentrationsabhängiger Versuche, um für jeden Extrakt die Konzentration mit der therapeutisch maximalen Wirkung bei minimalen unerwünschten Wirkungen zu finden. Dies gilt ebenso für Kombinationen von Pflanzenextrakten. Anschließende Untersuchungen am Gesamtorganismus, z.B. im Tiermodell, müssen weitere Aufschlüsse über Wirksamkeit und Verträglichkeit geben, bevor eine Anwendung in klinische Studien mit Patienten möglich ist.

Für die Prävention von vaskulären Erkrankungen wurde die Supplementierung mit L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase, wiederholt diskutiert, lieferte jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Der Versuch der Hochregulation der NO-Synthase durch Pflanzenextrakte in Kombination mit einer Reduktion der Arginase-Aktivität könnte die gefäßprotective Wirkung von L-Arginin verstärken. Dies wäre in einer weiteren Studie zu zeigen.

Auch bei der Anwendung von Pflanzenextrakten sind Sicherheit und Verträglichkeit wichtige Faktoren. Dies wurde insbesondere durch die Ergebnisse des Granatapfels verdeutlicht. Trotz der in der Literatur beschriebenen positiven Effekte, wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit eine sehr starke Arginase-aktivierende Wirkung nachgewiesen. Diese könnte bei einer Anwendung den anderen, vorteilhaften Eigenschaften der Arzneipflanze möglicherweise entgegenstehen.

Durch die Kombination der erwünschten Wirkungen der Einzelextrakte können synergistische Effekte erzielt werden, ohne dass es dabei zur Verstärkung der unerwünschten Wirkungen kommt. Dies spielt insbesondere im Kontext der Prävention eine entscheidende Rolle, da präventive Maßnahmen meist an primär gesunden Menschen angewendet und unerwünschte Wirkungen in diesem Zusammenhang weniger toleriert werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass Pflanzenextrakte gerade in der Prävention chronischer Erkrankungen und ihrer Komplikationen ein großes Potential besitzen und die Wirkungen der Einzelextrakte durch Kombination verstärkt werden können.



## Anhang

### I. Zusätzliche Daten

#### Stoffklassen der pflanzlichen Sekundärstoffe

Tabelle 37: Übersicht über die verschiedenen Stoffklassen der Sekundärstoffe von Arzneipflanzen [40], [43].

Stoffklasse	Struktureller Aufbau	Eigenschaften/ Wirkmechanismus	Wirkung
<b>Ätherische Öle</b>	Lipophiles Substanzgemisch bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Terpenen</b> Isoprenoid-Grundstruktur</li> <li>▪ <b>Phenylpropanderivate</b> abgeleitet von Tyrosin und Phenylalanin</li> </ul>	Interaktion mit Biomembran <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Porenbildung</li> <li>▪ Konformationsänderung von Membranproteinen (Kanäle, Transporter, Rezeptoren)</li> </ul> Kovalente Bindung von Proteinen <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Konformationsänderung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ spasmolytisch</li> <li>▪ analgetisch</li> <li>▪ antimikrobiell</li> <li>▪ antiphlogistisch</li> <li>▪ diuretisch</li> <li>▪ sekretolytisch</li> </ul> Nebenwirkung bei zu hoher Dosierung <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ abortiv</li> <li>▪ allergen</li> <li>▪ nephrotoxisch</li> <li>▪ hepatotoxisch</li> </ul>
<b>Alkaloide</b>	Stickstoffhaltige Verbindung <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ heterozyklisch (Ring)</li> <li>▪ nicht-heterozyklisch</li> </ul>	Wirkung über ZNS und PNS durch strukturelle Ähnlichkeit zu Neurotransmittern <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agonist/ Antagonist an Rezeptoren</li> <li>▪ Spannungskontrollierte Ionen-Kanäle</li> <li>▪ Enzyme, die Neurotransmitter abbauen</li> </ul> DNA-Interkalation  Störung des Auf- und Abbaus von Mikrotubuli	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ analgetisch</li> <li>▪ sedativ</li> <li>▪ narkotisch</li> <li>▪ antitussiv</li> <li>▪ anticholinerg</li> <li>▪ parasympatholytisch</li> <li>▪ sympathomimetisch</li> <li>▪ spasmolytisch</li> <li>▪ expektorierend</li> <li>▪ emetisch</li> <li>▪ mutagen</li> <li>▪ karzinogen</li> </ul>
<b>Bitterstoffe</b>	<b>Terpenoide</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sesquiterpenlactone</li> <li>▪ Iridoide</li> </ul> <b>Nicht terpenoide Bitterstoffe</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Flavonglykoside</li> <li>▪ Hopfenbitterstoffe</li> </ul>	Wirkung über Bitterrezeptoren in den Geschmacksknospen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ sekretionsförderend (Speichel, Magensaft)</li> <li>▪ Verbesserung der Motilität von Magen und Darm</li> </ul>
<b>Flavonoide</b>	<b>Polyphenole</b> , die je nach Substitutionsmuster weiter untergliedert werden in: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Flavone</li> <li>▪ Flavanole</li> <li>▪ Flavanone</li> <li>▪ Isoflavon</li> <li>▪ Anthocyanidine</li> </ul>	Bindung von Proteinen über Wasserstoffbrücken <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Konformationsänderung</li> </ul> Isoflavone haben strukturelle Ähnlichkeit zu Östrogen	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ antioxidativ</li> <li>▪ antimikrobiell</li> <li>▪ antiphlogistisch</li> <li>▪ spasmolytisch</li> <li>▪ aquaretisch</li> <li>▪ diuretisch</li> <li>▪ sekretolytisch</li> <li>▪ hepatoprotektiv</li> <li>▪ positiv inotrop</li> <li>▪ östrogen (Isoflavon)</li> </ul>

PNS: peripheres Nervensystem, ZNS: zentrales Nervensystem

Tabelle 37 (Fortsetzung): Übersicht über die verschiedenen Stoffklassen der Sekundärstoffe von Arzneipflanzen [40], [43].

<b>Gerbstoffe</b>	<p><b>Gallotannine</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hydrolysierbar</li> </ul> <p><b>Catechine</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nicht hydrolysierbar (kondensiert)</li> </ul>	<p>Bindung von Proteinen über Wasserstoffbrücken</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Konformationsänderung</li> <li>Bildung von unlöslichen Proteinkomplexen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>adstringierend</li> <li>antiexsudativ</li> <li>antiphlogistisch</li> <li>antimikrobiell</li> <li>antisekretorisch</li> <li>antiperistaltisch</li> <li>antidiarrhoisch</li> </ul>
<b>Glykoside</b>	<p><b>Herzglykoside</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Struktur: Steroidsaponine</li> </ul>	<p>Selektive Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</p>	<p>Wirkung auf das insuffiziente Herz</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>positiv inotrop</li> <li>negativ chronotrop</li> <li>negativ dromotrop</li> <li>positiv bathmotrop</li> </ul>
	<p><b>Anthrachinonglykoside</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Anthracen-Grundstruktur</li> </ul>	<p>Bakterielle β-Glucosidasen und Reduktasen setzen im Dickdarm die aktive Form frei (Anthron, Dianthron)</p> <p>Anregung der Peristaltik</p> <p>Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>laxierend</li> </ul>
<b>Saponine</b>	<p>Amphiphile Verbindung</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Zuckerrest (hydrophil)</li> <li>Aglykon (lipophil)</li> </ul> <p>Je nach Struktur des Aglykons wird unterschieden:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Triterpensaponin</b> (30-C) Isoprenoid-Grundstruktur</li> <li><b>Steroidsaponin</b> (27-C) Cholesterol-Grundstruktur</li> <li><b>Steroidalkaloidsaponin</b> Alkaloid-Grundstruktur</li> </ul>	<p>Interaktion mit Biomembran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Porenbildung</li> <li>Konformationsänderung von Membranproteinen (Kanäle, Transporter, Rezeptoren)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>expektorierend</li> <li>immunmodulierend</li> <li>antimikrobiell</li> <li>membranstabilisierend</li> <li>antiphlogistisch</li> <li>hämolytisch</li> </ul>
<b>Senföle</b> (Isothiocyanate)	<p>Schwefelhaltige Verbindung</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Speicherform: Glykosid</li> <li>Wirkform: <b>Isothiocyanat</b></li> </ul>	<p>Freisetzung des Isothiocyanats nach Abspaltung des Aglykons durch Myrosinase (Pflanze) oder β-Glucosidase im GIT</p> <p>Interaktion mit Biomembran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Porenbildung</li> <li>Konformationsänderung von Membranproteinen (Kanäle, Transporter, Rezeptoren)</li> </ul> <p>Kovalente Bindung von Proteinen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Konformationsänderung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>antibakteriell</li> <li>antimykotisch</li> <li>hautreizend</li> </ul>

GIT: Gastrointestinaltrakt

## Bestimmung des Referenzgens: Pairwise- $\Delta c_T$

**Tabelle 38: Mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung der Referenzgenkandidaten.** EA.hy926-Zellen wurden 48 h mit 70  $\mu\text{g/ml}$  Ginseng (gelöst in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), 100  $\mu\text{g/ml}$  Ginkgo, 150  $\mu\text{g/ml}$  Granatapfel, 50  $\mu\text{g/ml}$  Mariendistel, 100  $\mu\text{g/ml}$  Olive und 15  $\mu\text{g/ml}$  Rosskastanie (gelöst in 70% DMSO) unter 5,5 mM Glucose (NG) und ohne Pflanzenextrakte unter 25,0 mM Glucose (HG) kultiviert. Die DMSO-Endkonzentration betrug 0,2%. Nach der Singleplex-qRT-PCR wurde für jedes Referenzgen-Paar die Differenz der  $c_T$ -Werte berechnet und für jeden Referenzgen-Kandidaten die mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung berechnet ( $n = 31$ ).

Referenzgen-Paar	$\Delta c_T$ -Mittelwert	$\Delta c_T$ -SD	Mittelwert der $\Delta c_T$ -SD
TBP vs. RPL13a	4,704	0,281	0,344 $\pm$ 0,060
TBP vs. B2M	3,861	0,386	
TBP vs. SDHA	3,307	0,313	
TBP vs. ACTB	9,905	0,349	
TBP vs. 18S	18,750	0,454	
TBP vs. PUM1	0,418	0,295	
TBP vs. PPIA	1,453	0,378	
TBP vs. UBC	1,360	0,296	
RPL13a vs. TBP	4,704	0,281	0,376 $\pm$ 0,081
RPL13a vs. B2M	0,843	0,494	
RPL13a vs. SDHA	1,398	0,396	
RPL13a vs. ACTB	5,201	0,247	
RPL13a vs. 18S	14,040	0,448	
RPL13a vs. PUM1	4,312	0,383	
RPL13a vs. PPIA	3,252	0,400	
RPL13a vs. UBC	3,345	0,359	
B2M vs. TBP	3,861	0,386	0,522 $\pm$ 0,160
B2M vs. RPL13a	0,843	0,494	
B2M vs. SDHA	0,703	0,371	
B2M vs. ACTB	6,044	0,635	
B2M vs. 18S	14,890	0,776	
B2M vs. PUM1	3,469	0,307	
B2M vs. PPIA	2,408	0,592	
B2M vs. UBC	2,502	0,613	
SDHA vs. TBP	3,307	0,313	0,385 $\pm$ 0,054
SDHA vs. RPL13a	1,398	0,396	
SDHA vs. B2M	0,703	0,371	
SDHA vs. ACTB	6,599	0,425	
SDHA vs. 18S	15,440	0,418	
SDHA vs. PUM1	2,914	0,473	
SDHA vs. PPIA	1,854	0,360	
SDHA vs. UBC	1,946	0,321	
ACTB vs. TBP	9,905	0,349	0,406 $\pm$ 0,115
ACTB vs. RPL13a	5,201	0,247	
ACTB vs. B2M	6,044	0,635	
ACTB vs. SDHA	6,599	0,425	
ACTB vs. 18S	8,843	0,368	
ACTB vs. PUM1	9,513	0,488	
ACTB vs. PPIA	8,453	0,391	
ACTB vs. UBC	8,545	0,346	
18S vs. TBP	18,750	0,454	0,470 $\pm$ 0,162
18S vs. RPL13a	14,040	0,448	
18S vs. B2M	14,890	0,776	
18S vs. SDHA	15,440	0,418	
18S vs. ACTB	8,843	0,368	
18S vs. PUM1	18,360	0,642	
18S vs. PPIA	17,300	0,376	
18S vs. UBC	17,390	0,277	

18S: 18S ribosomal RNA, ACTB:  $\beta$ -Actin, B2M:  $\beta_2$ -Mikrotubulin,  $c_T$ : cycle threshold, PPIA: Peptidylprolyl isomerase A, PUM1: Pumilio RNA binding family member 1, RPL13a: Ribosomal Protein L13a, SDHA: Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A, TBP: TATA-Box-Bindeprotein, UBC: Ubiquitin C.

Tabelle 38 (Fortsetzung): Mittlere  $\Delta c_T$ -Standardabweichung der Referenzgenkandidaten.

Referenzgen-Paar	$\Delta c_T$ -Mittelwert	$\Delta c_T$ -SD	Mittelwert der $\Delta c_T$ -SD
PUM1 vs. TBP	0,418	0,295	0,441 ± 0,114
PUM1 vs. RPL13a	4,312	0,383	
PUM1 vs. B2M	3,469	0,307	
PUM1 vs. SDHA	2,914	0,473	
PUM1 vs. ACTB	9,513	0,488	
PUM1 vs. 18S	18,360	0,642	
PUM1 vs. PPIA	1,061	0,430	
PUM1 vs. UBC	0,968	0,510	
PPIA vs. TBP	1,453	0,378	0,388 ± 0,113
PPIA vs. RPL13a	3,252	0,400	
PPIA vs. B2M	2,408	0,592	
PPIA vs. SDHA	1,854	0,360	
PPIA vs. ACTB	8,453	0,391	
PPIA vs. 18S	17,300	0,376	
PPIA vs. PUM1	1,061	0,430	
PPIA vs. UBC	0,250	0,175	
UBC vs. TBP	1,360	0,296	0,362 ± 0,138
UBC vs. RPL13a	3,345	0,359	
UBC vs. B2M	2,502	0,613	
UBC vs. SDHA	1,946	0,321	
UBC vs. ACTB	8,545	0,346	
UBC vs. 18S	17,390	0,277	
UBC vs. PUM1	0,968	0,510	
UBC vs. PPIA	0,250	0,175	

18S: 18S ribosomal RNA, ACTB:  $\beta$ -Actin, B2M:  $\beta_2$ -Mikrotubulin, c: cycle threshold, PPIA: Peptidylprolylisomerase A, PUM1: Pumilio RNA binding family member 1, RPL13a: Ribosomal Protein L13a, SDHA: Succinatdehydrogenase Komplex Flavoprotein Untereinheit A, TBP: TATA-Box-Bindeprotein, UBC: Ubiquitin C.

## II. Literaturverzeichnis

- [1] Braun, Jörg; Müller-Wieland, Dirk; Renz-Polster, Herbert; Altiok, Ertunc (Hg.) (2022): Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier Urban & Fischer. 7. Auflage. München: Elsevier.
- [2] Magliano, Dianna; Boyko, Edward J. (2021): IDF diabetes atlas. 10th edition. Brussels: International Diabetes Federation. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581934/>.
- [3] Robert Koch-Institut (2019): Diabetes in Deutschland. Nationale Diabetes-Surveillance am Robert Koch-Institut, 2019. Online verfügbar unter [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Studien/Diabetes\\_Surveillance/Diabetesbericht.html](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Studien/Diabetes_Surveillance/Diabetesbericht.html).
- [4] Geisslinger, Gerd; Menzel, Sabine; Gudermann, Thomas; Hinz, Burkhard; Ruth, Peter (2020): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Pharmakologie – Klinische Pharmakologie – Toxikologie. 11. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1658033>.
- [5] Schleicher, Erwin; Gerdes, Christian; Petersmann, Astrid; Müller-Wieland, Dirk; Müller, Ulrich A.; Freckmann, Guido et al. (2022): Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. In: *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 130 (S 01), S1-S8. DOI: 10.1055/a-1624-2897.
- [6] Aktories, Klaus; Flockerzi, Veit; Förstermann, Ulrich; Hofmann, Franz; Starke, Klaus; Eschenhagen, Thomas; Oetjen, Elke (Hg.) (2022): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Lehrbuch und Nachschlagewerk für Studierende der Medizin, Zahnmedizin, Pharmazie und Veterinärmedizin, für Ärzte, Zahnärzte, Apotheker und Tierärzte sowie für Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler verwandter Disziplinen. Urban-&-Fischer-Verlag. 13. Auflage. München: Elsevier.
- [7] Bakker, Wineke; Eringa, Etto C.; Sipkema, Pieter; van Hinsbergh, Victor W. M. (2009): Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. In: *Cell and tissue research* 335 (1), S. 165–189. DOI: 10.1007/s00441-008-0685-6.
- [8] Ulfing, Norbert (2019): Kurzlehrbuch Histologie. 5., unveränderte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Kurzlehrbuch).
- [9] Welsch, Ulrich; Kummer, Wolfgang; Deller, Thomas (2022): Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch. 6. Auflage. München: Elsevier.
- [10] Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2019): Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [11] Ignarro, L. J.; Ross, G.; Tillisch, J. (1991): Pharmacology of endothelium-derived nitric oxide and nitrovasodilators. In: *The Western journal of medicine* 154 (1), S. 51–62.
- [12] Li, H.; Förstermann, U. (2000): Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. In: *J. Pathol.* 190 (3), S. 244–254. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<244::AID-PATH575>3.0.CO;2-8.
- [13] Ignarro, L. J. (1989): Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 3 (1), S. 31–36. DOI: 10.1096/fasebj.3.1.2642868.
- [14] Hadi, Hadi A. R.; Carr, Cornelia S.; Al Suwaidi, Jassim (2005): Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. In: *Vascular Health and Risk Management* 1 (3), S. 183–198.
- [15] Münzel, T. (2008): Endotheliale Dysfunktion: Pathophysiologie, Diagnostik und prognostische Bedeutung. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 133 (47), S. 2465–2470. DOI: 10.1055/s-0028-1100941.
- [16] Maruhashi, Tatsuya; Higashi, Yukihito (2021): Pathophysiological Association between Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (8). DOI: 10.3390/antiox10081306.
- [17] Brownlee, M. (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. In: *Nature* 414 (6865), S. 813–820. DOI: 10.1038/414813a.
- [18] Hadi, Hadi A. R.; Suwaidi, Jassim Al (2007): Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. In: *Vascular Health and Risk Management* 3 (6), S. 853–876.
- [19] Tong, Betty C.; Barbul, Adrian (2004): Cellular and physiological effects of arginine. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 4 (8), S. 823–832. DOI: 10.2174/1389557043403305.
- [20] Wu, G.; Morris, S. M. (2004): Arginine metabolism in mammals. Arginine metabolism in mammals PART II: PHYSIOLOGY Section A: Metabolism. In: *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition*, Bd. 9780849313820. 2. ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press.

- [21] Wu, G.; Morris, S. M. (1998): Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. In: *The Biochemical journal* 336 (Pt 1), S. 1–17. DOI: 10.1042/bj3360001.
- [22] Müller-Esterl, Werner (2018): Biochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [23] Lorin, Julie; Zeller, Marianne; Guillard, Jean-Claude; Cottin, Yves; Vergely, Catherine; Rochette, Luc (2014): Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. In: *Molecular nutrition & food research* 58 (1), S. 101–116. DOI: 10.1002/mnfr.201300033.
- [24] Li, H.; Meininger, C. J.; Hawker, J. R.; Haynes, T. E.; Kepka-Lenhart, D.; Mistry, S. K. et al. (2001): Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 280 (1), E75-82. DOI: 10.1152/ajpendo.2001.280.1.E75.
- [25] Pernow, John; Jung, Christian (2013): Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? In: *Cardiovascular research* 98 (3), S. 334–343. DOI: 10.1093/cvr/cvt036.
- [26] S Clemente, Gonçalo; van Waarde, Aren; F Antunes, Inês; Dömling, Alexander; H Elsinga, Philip (2020): Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective. In: *International journal of molecular sciences* 21 (15). DOI: 10.3390/ijms21155291.
- [27] Caldwell, Ruth B.; Toque, Haroldo A.; Narayanan, S. Priya; Caldwell, R. William (2015): Arginase: an old enzyme with new tricks. In: *Trends in pharmacological sciences* 36 (6), S. 395–405. DOI: 10.1016/j.tips.2015.03.006.
- [28] Ash, David E. (2004): Structure and function of arginases. In: *The Journal of nutrition* 134 (10 Suppl), 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S. DOI: 10.1093/jn/134.10.2760S.
- [29] Förstermann, Ulrich; Sessa, William C. (2012): Nitric oxide synthases: regulation and function. In: *European heart journal* 33 (7), 829-37, 837a-837d. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- [30] Alexander Ströhle, Andreas Hahn (2012): Arginin bei Atherosklerose. Diätetische Maßnahmen bei Atherosklerose – Stellenwert von L-Arginin. Teil 1: Pathophysiologische Grundlagen und diätetische Ansatzpunkte. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* (20), S. 97.
- [31] Preli, Robert B.; Klein, Karen Potvin; Herrington, David M. (2002): Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. In: *Atherosclerosis* 162 (1), S. 1–15. DOI: 10.1016/s0021-9150(01)00717-1.
- [32] Alexander Ströhle, Andreas Hahn (2012): Arginin bei Atherosklerose. Diätetische Maßnahmen bei Atherosklerose – Stellenwert von L-Arginin. Teil 2: Vasoprotektive Effekte von L-Arginin. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* (21), S. 74.
- [33] Caldwell, R. William; Rodriguez, Paulo C.; Toque, Haroldo A.; Narayanan, S. Priya; Caldwell, Ruth B. (2018): Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. In: *Physiological reviews* 98 (2), S. 641–665. DOI: 10.1152/physrev.00037.2016.
- [34] Böger, R. H.; Bode-Böger, S. M. (2001): The clinical pharmacology of L-arginine. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 41, S. 79–99. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.79.
- [35] Böger, Rainer H. (2003): The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. In: *Cardiovascular research* 59 (4), S. 824–833. DOI: 10.1016/s0008-6363(03)00500-5.
- [36] Luo, Suxin; Lei, Han; Qin, Honghua; Xia, Yong (2014): Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. In: *Current pharmaceutical design* 20 (22), S. 3548–3553. DOI: 10.2174/13816128113196660746.
- [37] www.escop.com.  
letzter Zugriff: 13.09.2023, 16:01 Uhr.
- [38] Ammon, Hermann P. T. (Hg.) (2021): Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. 10. neu bearb. und erw. Aufl., Reprint 2021. Berlin, Boston: De Gruyter.  
Online verfügbar unter <https://www.degruyter.com/isbn/9783112422120>.
- [39] van Wyk, Ben-Erik (2016): Handbuch der Arzneipflanzen. Ein Bildatlas. 3rd ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.  
Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=5181426>.

- [40] Schilcher, Heinz; Fischer, Manfred; Frank, Bruno; Kammerer, Susanne; Wegener, Tankred (Hg.) (2016): Leitfaden Phytotherapie. Unter Mitarbeit von Rainer Stange. Urban-&-Fischer-Verlag. 5. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter <http://www.elsevier.de/978-3-437-55344-8>.
- [41] Wenigmann, Margret; Keusgen, Michael (2017): Phytotherapie. Arzneidrogen - Phytopharmaka - Anwendung. 1. Auflage. München: Elsevier. Online verfügbar unter <http://shop.elsevier.de/978-3-437-55057-7>.
- [42] Kraft, Karin; März, Reinhard (2006): Die wissenschaftliche Basis der Phytotherapie. In: *Z Phytother* 27 (6), S. 279–283. DOI: 10.1055/s-2007-967720.
- [43] Bäuml, Siegfried (2010): Heilpflanzen-Praxis heute. Porträts, Rezepturen, Anwendung. Sonderausg.d.1.Aufl.2007. München: Elsevier Urban und Fischer.
- [44] ABDA – Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände e.V., Berlin (2023): Die Apotheke - Zahlen, Daten, Fakten 2023, 06.06.2023. Online verfügbar unter <https://www.abda.de/aktuelles-und-presse/publikationen/detail/die-apotheke-zahlen-daten-fakten-2023/>.
- [45] Teuscher, Eberhard; Lindequist, Ulrike; Melzig, Matthias F. (2020): Biogene Arzneimittel. Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie. Unter Mitarbeit von Elke Langner, Timo H. J. Niedermeyer und Alexander Weng. 8. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Online verfügbar unter <https://biblioscout.net/book/99.105015/9783804741423>.
- [46] Melzig, Matthias F.; Hiller, Karl (2023): Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen. 3rd ed. 2023. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint Springer Spektrum.
- [47] ABDA – Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände e.V., Berlin (Hg.) (2023): Deutscher Arzneimittel-Codex/ Neues Rezeptur-Formularium. DAC-Probe 12. Inprozessprüfungen. Eschborn: Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH.
- [48] Ou, Hsiu-Chung; Lee, Wen-Jane; Lee, I-Te; Chiu, Tsan-Hung; Tsai, Kun-Ling; Lin, Chih-Ying; Sheu, Wayne Huey-Herng (2009): Ginkgo biloba extract attenuates oxLDL-induced oxidative functional damages in endothelial cells. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 106 (5), S. 1674–1685. DOI: 10.1152/jappphysiol.91415.2008.
- [49] Ahn, Hee Yoon; Hong, So Young; Kim, Ji Yeon; Kwon, Oran (2013): Panax ginseng extract rich in ginsenoside protopanaxatriol offers combinatorial effects in nitric oxide production via multiple signaling pathways. In: *SpringerPlus* 2 (1), S. 96. DOI: 10.1186/2193-1801-2-96.
- [50] Omar, Ulfat; Aloqbi, Akram; Yousef, Marwa; K. Howell, Nazlin (2016): Punicalagin Induce the Production of Nitric Oxide and Inhibit Angiotensin Converting Enzyme in Endothelial Cell Line EA.hy926. In: *ujph* 4 (5), S. 268–277. DOI: 10.13189/ujph.2016.040507.
- [51] Palomino, Olga M.; Gouveia, Neire M.; Ramos, Sonia; Martín, M. Angeles; Goya, Luis (2017): Protective Effect of Silybum marianum and Silibinin on Endothelial Cells Submitted to High Glucose Concentration. In: *Planta medica* 83 (1-02), S. 97–103. DOI: 10.1055/s-0042-113135.
- [52] Scoditti, Egeria; Calabriso, Nadia; Massaro, Marika; Pellegrino, Mariangela; Storelli, Carlo; Martines, Giuseppe et al. (2012): Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 527 (2), S. 81–89. DOI: 10.1016/j.abb.2012.05.003.
- [53] Domanski, Dominik; Zegrocka-Stendel, Oliwia; Perzanowska, Anna; Dutkiewicz, Malgorzata; Kowalewska, Magdalena; Grabowska, Iwona et al. (2016): Molecular Mechanism for Cellular Response to  $\beta$ -Escin and Its Therapeutic Implications. In: *PloS one* 11 (10), e0164365. DOI: 10.1371/journal.pone.0164365.
- [54] Silver, Nicholas; Best, Steve; Jiang, Jie; Thein, Swee Lay (2006): Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. In: *BMC molecular biology* 7, S. 33. DOI: 10.1186/1471-2199-7-33.
- [55] Andersen, Claus Lindbjerg; Jensen, Jens Ledet; Ørntoft, Torben Falck (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. In: *Cancer research* 64 (15), S. 5245–5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- [56] Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

- [57] Corraliza, I. M.; Campo, M. L.; Soler, G.; Modolell, M. (1994): Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. In: *Journal of immunological methods* 174 (1-2), S. 231–235.  
DOI: 10.1016/0022-1759(94)90027-2.
- [58] Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paeppe, Anne de; Speleman, Frank (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome biology* 3 (7), RESEARCH0034.  
DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- [59] van Acker, Sara I.; van Acker, Zoë P.; Haagdoorens, Michel; Pintelon, Isabel; Koppen, Carina; Zakaria, Nadia (2019): Selecting Appropriate Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Studies in Isolated and Cultured Ocular Surface Epithelia. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 19631.  
DOI: 10.1038/s41598-019-56054-1.
- [60] Leonhart, Rainer (2022): Lehrbuch Statistik. Einstieg und Vertiefung. Unter Mitarbeit von Angela Cho, Stephanie Lichtenberg, Katrin Schornstein und Jana Groß Ophoff. 5. überarbeitete Auflage. Bern: Hogrefe.  
Online verfügbar unter <https://elibrary.hogrefe.com/book/10.1024/86258-000>.
- [61] Bagnost, Teddy; Ma, Ling; Da Silva, Rafaela F.; Rezakhanliha, Rana; Houdayer, Christophe; Stergiopoulos, Nikos et al. (2010): Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. In: *Cardiovascular research* 87 (3), S. 569–577.  
DOI: 10.1093/cvr/cvq081.
- [62] Xu, Weiling; Kaneko, F. Takao; Zheng, Shuo; Comhair, Suzy A. A.; Janocha, Allison J.; Goggans, Tannishia et al. (2004): Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (14), S. 1746–1748.  
DOI: 10.1096/fj.04-2317fje.
- [63] Ryoo, Sungwoo; Lemmon, Christopher A.; Soucy, Kevin G.; Gupta, Gaurav; White, Anthony R.; Nyhan, Daniel et al. (2006): Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. In: *Circulation research* 99 (9), S. 951–960.  
DOI: 10.1161/01.RES.0000247034.24662.b4.
- [64] Kloner, R. A. (2008): Erectile dysfunction as a predictor of cardiovascular disease. In: *International journal of impotence research* 20 (5), S. 460–465.  
DOI: 10.1038/ijir.2008.20.
- [65] Lacchini, Riccardo; Muniz, Jaqueline J.; Nobre, Yuri T. D. A.; Cologna, Adauto J.; Martins, Antonio C. P.; Tanus-Santos, Jose E. (2015): Relationship between Arginase 1 and Arginase 2 levels and genetic polymorphisms with erectile dysfunction. In: *Nitric oxide : biology and chemistry* 51, S. 36–42.  
DOI: 10.1016/j.niox.2015.10.003.
- [66] Bivalacqua, T. J.; Hellstrom, W. J.; Kadowitz, P. J.; Champion, H. C. (2001): Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. In: *Biochemical and biophysical research communications* 283 (4), S. 923–927. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4874.
- [67] Kurreck, Jens; Engels, Joachim W.; Lottspeich, Friedrich (Hg.) (2022): Bioanalytik. 4. Aufl. 2022. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.  
Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1960929>.
- [68] Mahmood, Tahrin; Yang, Ping-Chang (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. In: *North American journal of medical sciences* 4 (9), S. 429–434.  
DOI: 10.4103/1947-2714.100998.
- [69] Shatanawi, Alia; Gharaibeh Munir N.; Caldwell, Ruth B.; Caldwell, R. William (2014): High Glucose Upregulates Arginase 1 and Decreases NO Production through ATF-2 and c-Jun Transcription Factors. In: *Life sciences* 11 (5), 374–379.  
Online verfügbar unter [https://www.lifesciencesite.com/lj/life1105/050\\_23661life110514\\_374\\_379.pdf](https://www.lifesciencesite.com/lj/life1105/050_23661life110514_374_379.pdf).
- [70] Hartung, Thomas (2008): Thoughts on limitations of animal models. In: *Parkinsonism & related disorders* 14 Suppl 2, S81–3.  
DOI: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.003.
- [71] Mazrouei, Safoura; Sharifpanah, Fatemeh; Caldwell, R. William; Franz, Marcus; Shatanawi, Alia; Muessig, Johanna et al. (2019): Regulation of MAP kinase-mediated endothelial dysfunction in hyperglycemia via arginase I and eNOS dysregulation. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866 (9), S. 1398–1411.  
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.05.004.
- [72] Ahn, K.; Pan, S.; Beningo, K.; Hupe, D. (1995): A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. In: *Life sciences* 56 (26), S. 2331–2341.  
DOI: 10.1016/0024-3205(95)00227-w.

- [73] Uruski, Paweł; Mikuła-Pietrasik, Justyna; Drzewiecki, Marcin; Budkiewicz, Sylwia; Gładki, Marcin; Kurmanalina, Gulnara et al. (2021): Diverse functional responses to high glucose by primary and permanent hybrid endothelial cells in vitro. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 156, S. 1–6.  
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2021.03.004.
- [74] Lu, Ze Jun; Ren, Ya Qiong; Wang, Guo Ping; Song, Qi; Li, Mei; Jiang, Sa Sa et al. (2009): Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 28 (1), S. 16.  
DOI: 10.1186/1756-9966-28-16.
- [75] Beleznai, Timea; Feher, Attila; Spielvogel, David; Lansman, Steven L.; Bagi, Zsolt (2011): Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes. In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 300 (3), H777-83.  
DOI: 10.1152/ajpheart.00831.2010.
- [76] Bouïs, D.; Hoppers, G. A.; Meijer, C.; Molema, G.; Mulder, N. H. (2001): Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. In: *Angiogenesis* 4 (2), S. 91–102.  
DOI: 10.1023/a:1012259529167.
- [77] Wei, L. H.; Jacobs, A. T.; Morris, S. M.; Ignarro, L. J. (2000): IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 279 (1), C248-56.  
DOI: 10.1152/ajpcell.2000.279.1.C248.
- [78] Pernow, J.; Kiss, A.; Tratsiakovich, Y.; Climent, B. (2015): Tissue-specific up-regulation of arginase I and II induced by p38 MAPK mediates endothelial dysfunction in type 1 diabetes mellitus. In: *British journal of pharmacology* 172 (19), S. 4684–4698.  
DOI: 10.1111/bph.13242.
- [79] Berkowitz, Dan E.; White, Ron; Li, Dechun; Minhas, Khalid M.; Cernetich, Amy; Kim, Soonyul et al. (2003): Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. In: *Circulation* 108 (16), S. 2000–2006.  
DOI: 10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7.
- [80] Koo, Bon-Hyeock; Won, Moo-Ho; Kim, Young-Myeong; Ryoo, Sungwoo (2020): p32-Dependent p38 MAPK Activation by Arginase II Downregulation Contributes to Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation in HUVECs. In: *Cells* 9 (2).  
DOI: 10.3390/cells9020392.
- [81] Du, Xue Liang; Edelstein, Diane; Dimmeler, Stefanie; Ju, Qida; Sui, Chengyu; Brownlee, Michael (2001): Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. In: *J. Clin. Invest.* 108 (9), S. 1341–1348.  
DOI: 10.1172/JCI200111235.
- [82] Demougeot, Céline; Prigent-Tessier, Anne; Marie, Christine; Berthelot, Alain (2005): Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. In: *Journal of hypertension* 23 (5), S. 971–978.  
DOI: 10.1097/01.hjh.0000166837.78559.93.
- [83] Girard-Thernier, C.; Pham, T-N; Demougeot, C. (2015): The Promise of Plant-Derived Substances as Inhibitors of Arginase. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 15 (10), S. 798–808.  
DOI: 10.2174/1389557515666150511153852.
- [84] Chapman, Joanne R.; Waldenström, Jonas (2015): With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. In: *PloS one* 10 (11), e0141853.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0141853.
- [85] Thellin, O.; Zorzi, W.; Lakaye, B.; Borman, B. de; Coumans, B.; Hennen, G. et al. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. In: *Journal of biotechnology* 75 (2-3), S. 291–295.  
DOI: 10.1016/S0168-1656(99)00163-7.
- [86] Klenke, Stefanie; Renckhoff, Kristina; Engler, Andrea; Peters, Jürgen; Frey, Ulrich H. (2016): Easy-to-use strategy for reference gene selection in quantitative real-time PCR experiments. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 389 (12), S. 1353–1366.  
DOI: 10.1007/s00210-016-1305-8.
- [87] Ren, De Cheng; Du, Guan-Hua; Zhang, Jun Tian (2002): Protective effect of ginkgo biloba extract on endothelial cell against damage induced by oxidative stress. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 40 (6), S. 809–814.  
DOI: 10.1097/00005344-200212000-00001.
- [88] Koltermann, A.; Hartkorn, A.; Koch, E.; Fürst, R.; Vollmar, A. M.; Zahler, S. (2007): Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (13), S. 1715–1722.  
DOI: 10.1007/s00018-007-7085-z.

- [89] Shin, Woosung; Yoon, Jeongyeon; Oh, Goo Taeg; Ryoo, Sungwoo (2013): Korean red ginseng inhibits arginase and contributes to endotheliumdependent vasorelaxation through endothelial nitric oxide synthase coupling. In: *Journal of ginseng research* 37 (1), S. 64–73.  
DOI: 10.5142/jgr.2013.37.64.
- [90] Kim, Hyeong-Geug; Yoo, Sa-Ra; Park, Hye-Jung; Lee, Nam-Hun; Shin, Jang-Woo; Sathyanath, Rekha et al. (2011): Antioxidant effects of Panax ginseng C.A. Meyer in healthy subjects: A randomized, placebo-controlled clinical trial. In: *Food and Chemical Toxicology* 49 (9), S. 2229–2235.  
DOI: 10.1016/j.fct.2011.06.020.
- [91] Delgado, Nathalie T. B.; Rouver, Wender N.; Dos Santos, Roger L. (2020): Protective Effects of Pomegranate in Endothelial Dysfunction. In: *Current pharmaceutical design* 26 (30), S. 3684–3699.  
DOI: 10.2174/1381612826666200406152147.
- [92] Nigris, Filomena de; Williams-Ignarro, Sharon; Sica, Vincenzo; Lerman, Lilach O.; D'Armiento, Francesco P.; Byrns, Russell E. et al. (2007): Effects of a pomegranate fruit extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. In: *Cardiovascular research* 73 (2), S. 414–423.  
DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.08.021.
- [93] Shi, O.; Kepka-Lenhart, D.; Morris, S. M.; O'Brien, W. E. (1998): Structure of the murine arginase II gene. In: *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society* 9 (10), S. 822–824. DOI: 10.1007/s003359900874.
- [94] Seeram, Navindra P.; Adams, Lynn S.; Henning, Susanne M.; Niu, Yantao; Zhang, Yanjun; Nair, Muraleedharan G.; Heber, David (2005): In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 16 (6), S. 360–367.  
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.006.
- [95] Surai, Peter F. (2015): Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 4 (1), S. 204–247.  
DOI: 10.3390/antiox4010204.
- [96] Omar, Syed Haris (2010): Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. In: *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 18 (3), S. 111–121.  
DOI: 10.1016/j.jsps.2010.05.005.
- [97] Khayyal, Mohamed T.; el-Ghazaly, Mona A.; Abdallah, Dalal M.; Nassar, Noha N.; Okpanyi, Samuel N.; Kreuter, Matthias-Heinrich (2002): Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. In: *Arzneimittel-Forschung* 52 (11), S. 797–802.  
DOI: 10.1055/s-0031-1299970.
- [98] Susalit, Endang; Agus, Nafrialdi; Effendi, Imam; Tjandrawinata, Raymond R.; Nofiarny, Dwi; Perrinjaquet-Moccetti, Tania; Verbruggen, Marian (2011): Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. In: *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 18 (4), S. 251–258.  
DOI: 10.1016/j.phymed.2010.08.016.
- [99] Carrasco, Omar F.; Vidrio, Horacio (2007): Endothelium protectant and contractile effects of the antivaricose principle escin in rat aorta. In: *Vascular pharmacology* 47 (1), S. 68–73.  
DOI: 10.1016/j.vph.2007.04.003.

### III. Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> Physiologische Funktionen von Stickstoffmonoxid im kardiovaskulären System.	3
<b>ABBILDUNG 2:</b> Hauptwege der durch Stickstoffmonoxid vermittelten Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen.	4
<b>ABBILDUNG 3:</b> Risikofaktoren der endothelialen Dysfunktion und ihre Folgen.	5
<b>ABBILDUNG 4:</b> Mechanismus der Entstehung der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus.	5
<b>ABBILDUNG 5:</b> Strukturformel von L-Arginin.	6
<b>ABBILDUNG 6:</b> Hauptwege des L-Arginin-Metabolismus.	7
<b>ABBILDUNG 7:</b> Reaktionsmechanismus der Hydrolyse von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff.	7
<b>ABBILDUNG 8:</b> L-Arginin-Metabolismus.	8
<b>ABBILDUNG 9:</b> Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO).	9
<b>ABBILDUNG 10:</b> Reaktionsmechanismus der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).	11
<b>ABBILDUNG 11:</b> Funktionsverlust der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) („Entkopplung“).	13
<b>ABBILDUNG 12:</b> Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten EA.hy926-Zellen.	25
<b>ABBILDUNG 13:</b> Aufbau des Transfersandwichs für den Proteintransfer.	37
<b>ABBILDUNG 14:</b> Strukturformel von $\alpha$ -Isonitrosopropiophenon (ISPF).	40
<b>ABBILDUNG 15:</b> Schematischer Ablauf der Messung der Arginase-Aktivität.	41
<b>ABBILDUNG 16:</b> Schematischer Ablauf der LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin.	43
<b>ABBILDUNG 17:</b> Relative ARG2 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	52
<b>ABBILDUNG 18:</b> Relative NOS3 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	52
<b>ABBILDUNG 19:</b> Relative Arg2 Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	53
<b>ABBILDUNG 20:</b> Relative eNOS Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	53
<b>ABBILDUNG 21:</b> Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	54
<b>ABBILDUNG 22:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	54
<b>ABBILDUNG 23:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Citrullin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	55
<b>ABBILDUNG 24:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Ornithin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Glucose.	55
<b>ABBILDUNG 25:</b> $C_T$ -Werte der Referenzgen-qRT-PCR nach der Stimulation mit den einzelnen Pflanzenextrakten.	56
<b>ABBILDUNG 26:</b> Mittlere $\Delta C_T$ -Standardabweichung der Referenzgen-Kandidaten.	58
<b>ABBILDUNG 27:</b> Relative ARG2 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	61
<b>ABBILDUNG 28:</b> Relative NOS3 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	62
<b>ABBILDUNG 29:</b> Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der einzelnen Pflanzenextrakte auf die Genexpression von ARG2 und NOS3 in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.	63
<b>ABBILDUNG 30:</b> Relative Arg2 Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	64
<b>ABBILDUNG 31:</b> Relative eNOS Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	65
<b>ABBILDUNG 32:</b> Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der einzelnen Pflanzenextrakte auf die Arg2 und eNOS Proteinexpression in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.	66
<b>ABBILDUNG 33:</b> Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	67
<b>ABBILDUNG 34:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	68

<b>ABBILDUNG 35:</b> Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre relative Konzentration von L-Arginin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.	69
<b>ABBILDUNG 36:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Citrullin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	70
<b>ABBILDUNG 37:</b> Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre relative Konzentration von L-Citrullin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.	71
<b>ABBILDUNG 38:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Ornithin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit einzelnen Pflanzenextrakten unter Normal und High Glucose.	72
<b>ABBILDUNG 39:</b> Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der Einzelextrakte auf die extra- und intrazelluläre relative Konzentration von L-Ornithin in EA.hy926-Zellen in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration.	73
<b>ABBILDUNG 40:</b> Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	75
<b>ABBILDUNG 41:</b> Relative Arginase-Aktivität in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination B unter Normal und High Glucose.	76
<b>ABBILDUNG 42:</b> Relative ARG2 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	77
<b>ABBILDUNG 43:</b> Relative NOS3 Genexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	77
<b>ABBILDUNG 44:</b> Relative Arg2 Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	78
<b>ABBILDUNG 45:</b> Relative eNOS Proteinexpression in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	79
<b>ABBILDUNG 46:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Arginin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	79
<b>ABBILDUNG 47:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Citrullin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	80
<b>ABBILDUNG 48:</b> Extra- und intrazelluläre relative L-Ornithin-Konzentration in EA.hy926-Zellen nach der Stimulation mit Pflanzenkombination A unter Normal und High Glucose.	81

## IV. Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b>	Mit Diabetes mellitus assoziierte Störungen der Endothelfunktion.	6
<b>TABELLE 2:</b>	Eigenschaften der Arginase-Isoformen.	8
<b>TABELLE 3:</b>	Eigenschaften der Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen.	10
<b>TABELLE 4:</b>	Klassifizierung der Inhaltsstoffe in der Phytotherapie	15
<b>TABELLE 5:</b>	Kurzmonographie des Ginkgos.	17
<b>TABELLE 6:</b>	Kurzmonographie des Ginsengs.	19
<b>TABELLE 7:</b>	Kurzmonographie des Granatapfels.	20
<b>TABELLE 8:</b>	Kurzmonographie der Mariendistel.	21
<b>TABELLE 9:</b>	Kurzmonographie der Olive.	22
<b>TABELLE 10:</b>	Kurzmonographie der Rosskastanie.	23
<b>TABELLE 11:</b>	Zelldichten der EA.hy926-Zellen, die in Abhängigkeit der Stimulationsversuchen ausgesät wurden.	26
<b>TABELLE 12:</b>	Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Testung der EA.hy926-Zellen auf eine Mykoplasmen-Kontamination.	27
<b>TABELLE 13:</b>	Übersicht über die verwendeten Pflanzenextrakte und die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen.	28
<b>TABELLE 14:</b>	Zusammensetzung der Pflanzenkombinationen und die Konzentration der Extrakt-Stammlösungen.	29
<b>TABELLE 15:</b>	Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese.	31
<b>TABELLE 16:</b>	Programmeinstellungen der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).	32
<b>TABELLE 17:</b>	Eigenschaften der verwendeten Mini- und Midigele.	35
<b>TABELLE 18:</b>	Zusammensetzung des Trenngels in Abhängigkeit vom Zielprotein.	35
<b>TABELLE 19:</b>	Zusammensetzung des Sammelgels.	36
<b>TABELLE 20:</b>	Zusammenfassung der Versuchsbedingungen der Gelelektrophorese, des Proteintransfers und der Immundetektion.	39
<b>TABELLE 21:</b>	Standardlösungen der LC-MS/MS-Messung der L-Arginin-, L-Citrullin- und L-Ornithin-Konzentration.	44
<b>TABELLE 22:</b>	Eigenschaften der in der LC-MS/MS-Messung verwendeten Säule.	45
<b>TABELLE 23:</b>	Einstellung des Fließmittelgradienten der LC-MS/MS-Messung der Konzentrationen von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin.	45
<b>TABELLE 24:</b>	Massenübergänge (m/z) der detektierten Analyten.	46
<b>TABELLE 25:</b>	Primär- und Sekundärintikörper, welche in den Western Blots verwendet wurden.	47
<b>TABELLE 26:</b>	Aufstellung des verwendeten Kits.	47
<b>TABELLE 27:</b>	Zusammensetzung der Nährmedien, die zur Kultivierung und Stimulierung der EA.hy926-Zellen verwendet wurden.	48
<b>TABELLE 28:</b>	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Analyse der mRNA eingesetzt wurden.	48
<b>TABELLE 29:</b>	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Analyse der Proteine (Western Blot) verwendet wurden.	48
<b>TABELLE 30:</b>	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, die zur Messung der Arginase-Aktivität verwendet wurden.	49
<b>TABELLE 31:</b>	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer, welche bei der Messung der LC-MS/MS-Messung der Konzentration von L-Arginin, L-Citrullin und L-Ornithin eingesetzt wurden.	50
<b>TABELLE 32:</b>	Aufstellung der verwendeten Software.	50
<b>TABELLE 33:</b>	<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -Genexpressionsassays, welche bei der Analyse der Genexpression verwendet wurden.	51
<b>TABELLE 34:</b>	$c_T$ -Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Referenzgen-Kandidaten.	57
<b>TABELLE 35:</b>	Stabilitätswerte der Referenzgen-Kandidaten nach der NormFinder-Analyse.	59
<b>TABELLE 36:</b>	Zusammenfassung der Referenzgen-qRT-PCRs.	60
<b>TABELLE 37:</b>	Übersicht über die verschiedenen Stoffklassen der Sekundärstoffe von Arzneipflanzen.	96
<b>TABELLE 38:</b>	Mittlere $\Delta c_T$ -Standardabweichung der Referenzgenkandidaten.	98
<b>TABELLE 39:</b>	Aufstellung der verwendeten Laborgeräte.	109
<b>TABELLE 40:</b>	Aufstellung der verwendeten Substanzen und Reagenzien.	112
<b>TABELLE 41:</b>	Aufstellung des verwendeten Verbrauchsmaterials.	115

## V. Material

### Laborgeräte

Tabelle 39: Aufstellung der verwendeten Laborgeräte.

Laborgerät	Modell	Hersteller
Absaugsystem	BVC Control	Vacuubrand GmbH & Co. KG, (Wertheim, DE)
Analysenwaage	CP225D	Sartorius AG (Göttingen, DE)
Blotkammer	Criterion™ Blotter	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)
	Mini Trans-Blot®	
Chemilumineszenz-Detektionssystem	ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)
Chromatographiesystem	ACQUITY UPLC H-Class PLUS System	Waters Corporation (Milford, US)
CO <sub>2</sub> - Inkubator	HeraCell 150	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold, DE)
	IncuSafe	Panasonic Healthcare Co., Ltd. (Oizumi, JP)
Digitalthermometer	P300 W	DOSTMANN electronic GmbH (Wertheim-Reicholzheim, DE)
Eismaschine	AF-103	Scotsman Ice Srl (Mailand, IT)
Elektrophorese-Kammer	Criterion™ Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)
	Mini-PROTEAN	
Gefrierbehälter	5100-0001	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Gefrierschrank (-80 °C)	MDF-U53V	SANYO Electric Co., Ltd. (Moriguchi, JP)
Gefriertruhe (-80 °C)	Kryotec-Kryosafe GmbH (Hamburg, DE)	
Heizblock	Rotilabo® H250	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
	Stuart® SBH130D/3	Cole Parmer Instrument Co Ltd (St. Neots, GB)
Kühl-Gefrierkombination	Liebherr (Kirchdorf an der Iller, DE)	
	Siemens AG (München, DE)	
Magnetrührer	IKA-COMBIMAG REO	IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)
	IKAMAG® RET	IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)
	MR Hei-Tec	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, DE)
Massenspektrometer	Xevo TQ-S cronos	Waters Corporation (Milford, US)
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)
Mikrowelle	Micromat 15 G715MA	AEG/ Electrolux Hausgeräte GmbH (Nürnberg, DE)
Minizentrifuge	Combi-Spin FVL-2400N	BIOSAN SIA (Riga, LV)
	MC6	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Netzteil	Biometra P25	Analytik Jena GmbH & Co. KG (Jena, DE)
	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)
pH-Elektrode	LE438	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, DE)

Tabelle 39 (Fortsetzung): Aufstellung der verwendeten Laborgeräte.

<b>Laborgerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
pH-Meter	FiveEasy™	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, DE)
Photometer	NanoPhotometer® N60	Implen GmbH (München, DE)
	Varioskan™ LUX	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Pipette	ErgoOne® 0.5 - 10 µl	STARLAB GmbH (Hamburg, DE)
	ErgoOne® 10 - 100 µl	
	ErgoOne® 20 - 200 µl	
	ErgoOne® 100 - 1000 µl	
	Multipipette® plus	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
	Reference® 0.1 - 2.5 µl	
	Reference® 0.5 - 10 µl	
	Reference® 10 - 100 µl	
	Reference® 100 - 1000 µl	
	Reference® 0.25 - 2.5 ml	
	Reference® 0.5 - 5.0 ml	BRAND GMBH & Co. KG (Wertheim, DE)
	Transferpipette® -8	
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2	VWR International, LLC. (Radnor, US)
Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, DE)
	Titramax 101	
Präzisionswaage	BP 3100 S	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Göttingen, DE)
Rollenmischer	RM5 V-30	Labortechnik Fröbel GmbH (Lindau, DE)
Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS12	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold, DE)
Thermocycler	Mastercycler® eppgradient	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
	QuantStudio 5	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
	Thermomixer compact	
Ultraschallbad	Sonorex RK100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, DE)
Vortex-Schüttler	444-1372	VWR International, LLC. (Radnor, US)
	Certomat® MV	B. Braun Biotech International GmbH (Melsungen, DE)
	REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, DE)
	REAX top	
	VF 2494	IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)
Wärmeschrank	U30	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, DE)
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q® Direct	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Wasserbad	1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, DE)
Wecker	A802.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

Tabelle 39 (Fortsetzung): Aufstellung der verwendeten Laborgeräte.

<b>Laborgerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifuge	Rotina R 35	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, DE)
	RVC 2-25	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen (Osterode, DE)
	5415 R	Eppendorf AG (Hamburg, DE)

## Substanzen und Reagenzien

Tabelle 40: Aufstellung der verwendeten Substanzen und Reagenzien.

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Acetonitril (LC-MS)	2697	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Acetylchlorid	00990	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Agarose Standard (Roti®garose)	3810.3	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Ameisensäure (LC-MS)	94318	Honeywell International Inc (Charlotte, US)
Ammoniakwasser 25%	44273	Honeywell International Inc (Charlotte, US)
Ammoniumpersulfat	A3678	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
L-Arginin	A8094	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
L-Arginin-hydrochlorid (LC-MS)	A5131	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
L-Arginin-hydrochlorid (2,3,3,4,4,5,5- <sup>2</sup> H <sub>7</sub> )	DLM-541	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, US)
β-Mercaptoethanol	M3148	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Borsäure	6943.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Bromphenolblau	8122	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
1-Butanol (Rotipuran®)	7171.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Chloroform (Emprove® Essential)	1.02431	Merck KGaA, (Darmstadt, DE)
L-Citrullin (LC-MS)	C-7629	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
L-Citrullin (5- <sup>13</sup> C;4,4,5,5- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> )	CDLM-7139-0	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, US)
cComplete™ ULTRA-Mini, EDTA-free	5892791001	Roche Diagnostics International AG (Rotkreuz, CH)
Dimethylsulfoxid (Rotisolv®)	HN47.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	21885025	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	14190144	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Ethylendiamintetraessigsäure	ED2SS	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Essigsäure reinst.	6755.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Ethanol reinst.	2273	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Fetal Bovine Serum Advanced	FBS-11A	Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund, DE)
D-Glucose-Monohydrat	49159	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Glycerol	G7757	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Glycin (Pufferan®)	3908.2	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Glycin	9366	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Harnstoff	15604	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)

Tabelle 40 (Fortsetzung): Aufstellung der verwendeten Substanzen und Reagenzien.

Substanz	Katalognummer	Hersteller
$\alpha$ -Isonitrosopropiophenon	13502	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (EMSURE®)	1.05927	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Methanol	4627.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Methanol (LC-MS)	1428	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Midori <sup>Green</sup> Direct	MG06	NIPPON Genetics EUROPE (Düren, DE)
Milchpulver	T145.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid	0278	Avantor Inc. (Radnor, US)
Natriumdodecylsulfat	0183.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Natriumhydroxid 2 N (Titripur®)	1.09136	Merck KGaA, (Darmstadt, DE)
L-Ornithin-hydrochlorid (LC-MS)	75469	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
L-Ornithin-hydrochlorid (3,3,4,4,5,5- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> )	DLM-6046-0	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, US)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	26619	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
PBS Dulbecco	L1820-10	Biochrom GmbH (Berlin, DE)
Penicillin-Streptomycin	P4333	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Phosphorsäure 85%	30417-M	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Ponceau S	P-3504	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
2-Propanol (LC-MS)	1178	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
2-Propanol reinst	1197	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)
Pufferlösung pH 4,00 ± 0,02 (ROTI® CALIPURE)	A517.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Pufferlösung pH 7,00 ± 0,02 (ROTI® CALIPURE)	P713.5	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Pufferlösung pH 9,00 ± 0,02 (ROTI® CALIPURE)	P714.3	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Pufferlösung pH 10,00 ± 0,02 (ROTI® CALIPURE)	8086.5	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
RNase® AWAY	7000TS1	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Salzsäure 1 N	K025.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Salzsäure 4 N	N076.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Schwefelsäure 96%	07208-M	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Stable Cell™ Trypsin 10x	T2610	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizma® Base)	T1503	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Trizma® Hydrochlorid)	T5941	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)

Tabelle 40 (Fortsetzung): Aufstellung der verwendeten Substanzen und Reagenzien.

<b>Substanz</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Trypsin/ EDTA Solution 10x	L2153	Bioswisstec AG (Schaffhausen, DE)
Tween® 20	P1379	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Wasser (LC-MS)	455	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, DE)

## Verbrauchsmaterial

Tabelle 41: Aufstellung des verwendeten Verbrauchsmaterials.

Verbrauchsmaterial		Hersteller	
Abdeckfolie	für Deep Well MegaBlock® (1,2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
	7mm Silicon PTFE (96-well)	Waters Corporation (Milford, US)	
Autoklavierband	Comply™ Steam	3M, Corp. (Saint Paul, US)	
Criterion Empty Cassettes	18-Taschen	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	
	26-Taschen		
Einmalspritze	Omnifix® (1 ml)	B. Braun SE (Melsungen, DE)	
	BD Discardit™ II (20 ml)	Becton Dickinson GmbH (Franklin Lakes, US)	
Filterplatte (MultiScreen <sub>HTS</sub> )	96-well (0,22 µm)	Merck Millipore (Burlington, US)	
	96-well (0,45 µm)		
Kryo-Röhrchen	CryoPure (1,2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
Mikrotiterplatte	96-well (F-bottom)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE)	
	96-well (U-bottom)		
Nitrocellulosemembran	Protran® (0,45 µm)	Amersham™, GE Healthcare (Little Chalfont, UK)	
PCR-Abdeckfolie	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	
PCR-Platte	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	
PCR-Reagiergefäße (Einzel + Kette)	0,2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
	0,5 ml		
Pipettenspitzen	10 µl	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	Starlab International GmbH (Hamburg, DE)
	200 µl		
Probenplatte für LC-MS	1000 µl	Waters Corporation (Milford, US)	
	700 µl		
SafeSeal Reagiergefäß	1,5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
	2,0 ml		
Serologische Pipette	2,0 ml	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
	5,0 ml		
Skalpellklinge	10,0 ml	Baya GmbH (Tuttlingen, DE)	
	25,0 ml		
Sterilfilter	Nr. 22	Corning Incorporated (Corning, US)	
	Corning®		
Whatmann Paper	Sterifix®	B. Braun SE (Melsungen, D)	
	3 MM CHR		
Zellkulturflasche	Cytiva (Malborough, US)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
Zellkulturschale	T-25	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
Zellschaber	100/20	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
Zentrifugenröhrchen	Größe S	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	
	15 ml	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE)
50 ml			



## **Danksagung**

Ich möchte Prof. Dr. Rainer Böger und PD Dr. Juliane Hannemann für die Betreuung meiner Arbeit und ihre Unterstützung innerhalb der letzten Jahre danken. Es war ein langer Weg, auf dem ich mehrfach an meine Grenzen gestoßen und darüber hinaus gewachsen bin. Ich danke Euch für all das, was ich in dieser Zeit lernen konnte, und für die einzigartige Möglichkeit an internationalen Konferenzen teilzunehmen zu dürfen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Thorsten Burmester für die Co-Betreuung der Arbeit und des Verfassens des Gutachtens. Prof. Dr. Julia Kehr und Prof. Dr. Dominik Begerow danke ich, dass sie als Mitglieder meiner Prüfungskommission fungiert haben.

Ein großer Dank gilt der ganzen Arbeitsgruppe der Klinischen Pharmakologie und Toxikologie: Mariola Kastner, Fiona Kleinsang, Yoana Mileva, Antonia Röglin, Lena Schmidt-Hutten und Daniel Stuh. Insbesondere möchte ich Mariola, Fiona und Daniel für ihre tatkräftige Unterstützung danken. Ohne Euch wäre so vieles nicht möglich gewesen!

Ich danke meiner Chefin, Barbara Kalinowski, die es mir immer ermöglichte, meine Arbeitszeit und die - teilweise ungewöhnlichen - Zeiten im Labor unter einen Hut zu bringen. Ein ganz großer Dank geht an meine Kolleginnen der ara-Apotheke für ihre Hilfsbereitschaft und die stets aufbauenden Worte. Auch wenn ein Tag mal nicht so erfolgreich gewesen ist, habt Ihr es immer geschafft, dass ich am Ende des Tages wieder mit einem Lächeln nach Hause gegangen bin!

Ich möchte all meinen Freunden, die mich auf diesem Weg begleitet haben, danken. Ihr wart eine große Stütze, habt mir zugehört und mich getröstet, wenn ich es brauchte. Mirjam danke ich dafür, dass sie zu jeder frühen Stunde und bei jedem Wetter mit mir um die Alster gerannt ist und bei Problemen unterschiedlichster Art für mich da war. Ahmet und Laura danke ich, dass sie auch in ihrer eigenen stressigen Phase immer ein offenes Ohr hatten. Lea und Lena, Ihr habt mir mit unseren Trash TV-Dates ein Highlight in jede noch so volle Arbeitswoche gezaubert. Meine letzte Rose, Krawatte und Kette sind Euch immer sicher! Meiner früheren „Arbeitskollegin“ - jetzt *bestie*, Lena, danke ich für jeden Moment, den wir in den letzten Jahren zusammen erlebt und durchlebt haben. Ohne Dich wäre es weniger lustig, weniger ertragbar und definitiv nicht machbar gewesen.

Der größte Dank gilt meiner Familie - Erich und Javella Stang, Nathalie, Michael und Mila Appel. Ich bin Euch unendlich dankbar dafür, dass Ihr mir alles ermöglicht und mich bei allem unterstützt habt, was ich mir in den Kopf gesetzt habe, auch wenn das gleichzeitig bedeutete kilometerweit von Euch entfernt zu sein. Es war zeitweise sehr hart, und dennoch habt Ihr nie den Glauben an mich und meine Fähigkeiten verloren. Ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

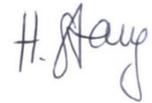
*Daghang salammat sa tanan!*



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Das gedruckte, gebundene Exemplar stimmt mit der elektronischen Version überein.

I hereby declare, on oath, that I have written the present dissertation by my own and have not used other than the acknowledged resources and aids. The printed copy agrees with the electronic version of this thesis.



Hamburg, den 30.01.2024

Heike Monika Stang

