



DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Die Wirkung von Inhaltsstoffen des Olivenöls auf die
ABCA1-Expression von Makrophagen“

verfasst von / submitted by

Sarah Wesemann

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

Wien, 2017 / Vienna, 2017

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch für die Möglichkeit bedanken, meine Diplomarbeit in der Molecular Target Group am Department für Pharmakognosie schreiben zu dürfen. Zudem haben mir ihre Ratschläge, Hinweise und konstruktive Kritik stets weitergeholfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Molecular Target Group für die Schaffung eines derart guten Arbeitsklimas bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Angela Ladurner und Mag. Verena Hiebl bedanken, an die ich mich mit Fragen und auftretenden Problemen immer wenden konnte.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Limei Wang bedanken, die mir geduldig alles erklärt hat, was ich für die praktische Arbeit wissen musste, und mir bei Fragen und Auswertung zur Seite stand.

Schlussendlich möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht hat, und bei meinen Freunden, die immer für mich da gewesen sind.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	9
Zusammenfassung.....	11
A. Einleitung	13
Grundlagen	13
Atherosklerose	14
B. Vorausgegangene Studien	19
C. In der Arbeit getestete Naturstoffe	20
Erythrodial.....	20
Uvaol.....	21
Oleanolsäure	22
Maslinsäure	23
Oleocanthal.....	24
Oleuropein	25
3-Hydroxytyrosol	26
Betulinsäure.....	27
Chlorogensäure	28
Pioglitazon	29
D. Ziel der Arbeit	30
E. Material und Methoden	31
THP-1 Zellen	31
Kultivierung der THP-1 Zellen.....	31
Behandlung der THP-1 Zellen mit den Testsubstanzen.....	33
Western Blot	35
Bradford-Assay	35
Herstellung der Gele	37
Blotten	38
Detektion	40
Prüfung der Zellviabilität	41
Untersuchung zur Abbaugeschwindigkeit von ABCA1	43
F. Statistik und Datenanalyse	44
G. Resultate	45
H. Diskussion	53
I. Fazit	56
J. Appendix	57

Abkürzungen	57
Tabellen.....	59
K. Quellenverzeichnis.....	63

Abstract

The atherosclerotic process starts with the deposition of low-density-lipoprotein (LDL) in the vessel walls of arteries, which activates macrophages to develop into foam cells. Further accumulation of LDL and calcium leads to the formation of plaques. This process is antagonized by reverse cholesterol transport (RCT), which has the ability to remove lipids from vessel walls. Part of this RCT is the cholesterol efflux from macrophages. Increased ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) protein levels represent an effective way to increase cholesterol efflux in macrophages. In this study the THP-1 cell line was used as a model for macrophages.

Different *in vitro* studies suggested a positive impact of extra-virgin olive oil (Oil from *Olea europaea*) on arteriosclerosis via enhanced cholesterol efflux in macrophages partly through increased ABCA1 protein levels. However, there was no information available whether this is caused by the olive oil extract as a whole or by one single compound. Moreover, there were to our knowledge no studies performed that elucidated the underlying mechanism. This work focused on olive oil compounds and their ability to increase ABCA1 protein levels.

The THP-1-derived macrophages were treated with olive oil compounds at a concentration of 10 μM . Western blotting was performed for evaluation of a potential increase of ABCA1 protein levels. After incubation with antibodies against ABCA1 and detection through chemiluminescence a significant increase of ABCA1 protein levels by erythrodiol (at 10 μM) could be determined. To evaluate cell viability of the tested compounds the resazurine conversion assay was used. Beginning toxicity of erythrodiol could be observed starting at a concentration of 20 μM , while most of the other compounds appeared safe for THP-1 cells until 40 μM . Further mechanistic analyses showed a delayed degradation of ABCA1 protein by erythrodiol at 10 μM after treatment of THP-1 cells with cycloheximide, a *de novo* protein synthesis inhibitor, at different time points (0, 20, 40, 60 min). Furthermore, erythrodiol showed no impact on ABCG1 and SR-B1 protein levels compared to DMSO. Therefore the increase in cholesterol efflux from macrophages after treatment with erythrodiol can be considered specific for ABCA1.

Taken together, the compound erythrodiol can be an explanation for the increased ABCA1 protein levels in macrophages and enhanced cholesterol efflux from macrophages ascribed to olive oil. The therapeutic use of erythrodiol as a single compound needs to be evaluated in *in vivo* studies.

Zusammenfassung

Der atherosklerotische Prozess beginnt mit der Ablagerung von LDL-Cholesterin in der Gefäßwand von Arterien, wodurch Makrophagen aktiviert und zu Schaumzellen werden. Durch die weitere Einlagerung von LDL-Cholesterin und Kalzium entstehen sogenannte Plaques. Diesem Prozess wirkt der „Reverse Cholesterol Transport“ (RCT) entgegen, welcher in der Lage ist, Lipide wieder aus den Gefäßwänden zu entfernen. Teil dieses „Reverse Cholesterol Transports“ ist der Cholesterin-Efflux aus Makrophagen. Ein effektiver Weg, diesen „Reverse Cholesterol Transport“ zu steigern, besteht darin, die Expression des ABCA1 Transporters in Makrophagen zu erhöhen. In dieser Arbeit wurde die THP-1 Zelllinie als Makrophagen-Modell verwendet.

Verschiedene *In-vitro*-Studien schreiben nativem Olivenöl einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung von Atherosklerose durch erhöhte ABCA1-Expression zu, wodurch der sogenannte „Reverse Cholesterol Efflux“ gesteigert wird. Jedoch waren keine Informationen darüber verfügbar, ob dies nun durch den Olivenölextrakt als Ganzes oder durch einen einzelnen Inhaltsstoff verursacht wird. Außerdem gab es bis dato unseres Wissens keine Studien über den zu Grunde liegenden Wirkmechanismus. Diese Arbeit konzentrierte sich darauf, ob und welche Olivenölinhaltsstoffe in der Lage sind, ABCA1-Proteinlevel zu erhöhen.

Die zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen wurden mit einer Konzentration von 10 μM der verschiedenen Olivenölinhaltsstoffe behandelt. Nach anschließendem Western Blot wurde die Membran mit Antikörpern gegen ABCA1 und Aktin inkubiert und die Proteine mittels Chemilumineszenz detektiert. Es konnte eine signifikante Erhöhung der ABCA1-Expression durch den Inhaltsstoff Erythrodiol (bei 10 μM) festgestellt werden.

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe von Resazurin überprüft, wobei erst ab einer Konzentration von 20 μM Erythrodiol eine beginnende Toxizität beobachtet wurde, während die meisten anderen Inhaltsstoffe bis 40 μM kaum Toxizität aufwiesen.

Es konnte festgestellt werden, dass der Wirkmechanismus von Erythrodiol auf einem verzögerten Abbau des ABCA1-Transporters beruht, was mittels Zugabe von Cycloheximid,

eines *de novo* Proteinsynthesehemmers, zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 20, 40, 60 min) gezeigt werden konnte.

Des Weiteren blieben die Expressionslevel an ABCG1- und SR-B1-Transportern unbeeinflusst von Erythrodiol, so dass man den Effekt als spezifisch für ABCA1 bezeichnen kann.

Schlussendlich könnte Erythrodiol als Erklärung für die Erhöhung der ABCA1-Proteinlevel durch Olivenöl dienen, wobei der therapeutische Nutzen von Erythrodiol als Einzelwirkstoff noch in *In-vivo*-Studien erforscht werden muss.

A. Einleitung

Grundlagen

Olivenöl ist das Öl des Baumes *Olea europaea*, welcher im Mittelmeerraum weit verbreitet ist. Heutzutage wird das Olivenöl mit einer Ernährungsweise namens Mittelmeerdiät assoziiert, welcher zugeschrieben wird, das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen wie Atherosklerose zu verringern (Ros et al., 2014).

Die World Health Organisation bewertet die Folgeschäden von kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose als eine der Haupt-Todesursachen in der industrialisierten Welt. Atherosklerose führt zu Durchblutungsstörungen, welche die betroffenen Organe irreparabel schädigen, und zu Infarkten und Schlaganfällen führen (WHO).

Atherosklerose wird eher als eine Erkrankung der Neuzeit wahrgenommen, welche in unserem westlichen Lebensstil, gekennzeichnet durch die Aufnahme von Fertignahrung und mangelnde Bewegung begründet liegt. Dass dies nicht unbedingt der Wahrheit entsprechen muss, lässt sich rasch feststellen, indem man sich Untersuchungen von Mumien und anderen Leichen aus vorindustriellen Epochen ansieht.

CT-Untersuchungen von bis zu 4000 Jahre alten Mumien aus verschiedenen geographischen Regionen des Planeten konnten zeigen, dass Atherosklerose in vorindustriellen Zeiten selbst bei Jägern und Sammlern nicht ungewöhnlich war (Thompson et al., 2013). Durch weitere CT-Untersuchungen von Mumien aus dem alten Ägypten ließen sich ähnliche Anzeichen von Gefäßverkalkung und atherosklerotischen Veränderungen feststellen (Allam et al., 2011).

Andererseits scheinen Populationen rund um das Mittelmeer ein niedrigeres Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen zu haben, was der mediterranen Ernährungsweise zugesprochen wird, die bekanntlich viel Olivenöl enthält (Tektonidis et al., 2015).

Atherosklerose

Pathogenese

Atherosklerose ist eine der wichtigsten zugrunde liegenden Ursachen für Herz-Kreislaufkrankungen, welcher gemäß der Statistik pro Jahr 17,5 Millionen Menschen zum Opfer fallen. Als Risikofaktoren gelten Bluthochdruck, hohe Blutfettwerte, sowie Diabetes. Obwohl der genaue Prozess der Entwicklung einer Atherosklerose noch nicht vollständig geklärt wurde, scheint es sich um eine chronisch fortschreitende Entzündung des Endothels der Arterien zu handeln. Die Folgen sind der Verlust der Flexibilität der Blutgefäße und die Verengung dieser, was in der Folge zu Infarkten und Schlaganfällen führen kann. (Gui et al., 2012; Jia et al., 2017).

Atherosklerotische Veränderungen betreffen vorwiegend Verzweigungen und Kurvaturen des arteriellen Systems, da diese geringeren Scherkräften ausgesetzt sind (Wentzel et al., 2012; Wohlschlaeger et al., 2015).

Im Rahmen der Veränderung des lokalen Blutflusses kommt es zur Veränderung (sog. Remodelling) in der Arterienwand und dort zur Entstehung von Plaques (Kwak et al., 2014; Wohlschlaeger et al., 2015). Atherosklerotische Plaques bestehen aus einem nekrotischen Kern, kalzifizierten Regionen, veränderten Lipiden, immigrierten glatten Muskelzellen, Schaumzellen, Endothelzellen und Leukozyten (Gui et al., 2012).

Lipide im Zusammenhang mit Atherosklerose

Es wird ein starker Zusammenhang zwischen Lipidspiegeln und dem Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen, wie Atherosklerose beobachtet. Dabei korreliert der LDL-Spiegel mit dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, während der HDL-Spiegel in einem umgekehrten Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen steht. Monogene Störungen, welche einen erhöhten LDL-Plasmaspiegel zur Folge haben, erhöhen das Risiko, während Interventionen um den LDL-Plasmaspiegel zu senken, vor atherosklerotische Folgeschäden zu schützen scheinen (Libby et al., 2011).

Entstehung von Plaques

Zu Beginn infiltrieren ApoB-Lipoproteine die Intima der Gefäßwand, welche durch oxidative und hydrolytische Prozesse modifiziert werden, was dazu führt, dass sich lokal weitere Lipoproteine anlagern können. Diese modifizierten Lipoproteine senden Entzündungssignale aus, welche zur Aktivierung des Endothels führen und somit zur Rekrutierung von Monozyten, welche anschließend zu Makrophagen differenzieren (Jeong et al., 2017; Mestas and Ley, 2008). Diese Makrophagen absorbieren über ihre Scavenger-Rezeptoren oxidiertes LDL und entwickeln sich zu Schaumzellen. Die verantwortlichen Scavenger-Rezeptoren heißen SR-A1 (Scavenger-Rezeptor Typ A1) und CD36 (cluster of differentiation 36), welcher zu den Scavenger-Rezeptoren Typ B gehört (Chistiakov et al., 2017; Jeong et al., 2017). Zusätzlich wird in der Literatur noch ein dritter Rezeptor mit dem Namen LOX-1 (Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1) beschrieben (Chistiakov et al., 2016). Innerhalb der Makrophagen wird das modifizierte LDL zu freiem Cholesterin und Fettsäuren hydrolysiert. Das freie Cholesterin wird anschließend durch die Acetyl-CoA-Acyltransferase 1 (ACAT1) oder die Sterol-O-Acyltransferase 1 (SOAT1) verestert und als Cholesterinester in Lipidtröpfchen des Cytoplasmas gespeichert (Abbildung 1) (Jeong et al., 2017; Suckling and Stange, 1985).

Gleichzeitig migrieren glatte Muskelzellen (SMC) aus der Tunica Media in die Tunica Intima und proliferieren als Antwort auf Mediatoren wie dem PDGF (platelet-derived growth factor). In der Intima produzieren die glatten Muskelzellen (SMC) nun extrazelluläre Matrixmoleküle, wie Kollagen und Elastin um eine fibröse Bindegewebskappe zu bilden. Diese Bindegewebskappe liegt über einer Ansammlung von Schaumzellen, wovon einige absterben, und die zuvor aufgenommenen Lipide extrazellulär freisetzen. Aufgrund des ineffizienten Abtransports der abgestorbenen Schaumzellen akkumulieren die Zellreste und die freigegebenen Lipide innerhalb der Plaques zu nekrotischen Kernen (Libby et al., 2011).

Cholesterin-Rücktransport

Dem oben genannten Prozess wirkt der „reverse cholesterol transport“ – also der Cholesterin-Rücktransport entgegen. Der Cholesterin-Rücktransport beschreibt den Transport von Cholesterin aus dem peripheren Gewebe zurück zur Leber durch high-density-Lipoprotein (HDL). Die Leber produziert dafür das lipidarme Apolipoprotein A1, welches durch den Körper zirkuliert und Cholesterin und Phospholipide aufnimmt. Dadurch reift es zu sphärischen Partikeln, welche dann HDL bilden (Oram and Lawn, 2001).

Ein bedeutender Schritt beim Cholesterin-Rücktransport ist der Cholesterin-Efflux (ChE) aus Makrophagen, welcher in der Lage ist, Cholesterin aus Makrophagen zu entfernen. Der Cholesterin-Efflux wird hauptsächlich von 3 Transportern vermittelt: ATP-binding cassette transporter A member 1 (ABCA1), ATP-binding cassette transporter G member 1 (ABCG1) und Scavenger-Receptor class B member 1 (SR-B1) (Abbildung 1). Zusätzlich könnte passive Diffusion ebenfalls einen Beitrag leisten (Chistiakov et al., 2017).

Hierbei dient HDL, genauer seine Bestandteile Apolipoprotein A1 (ApoA1) und reife HDL-Partikel als Akzeptoren für das ausgeschiedene Cholesterin. Lipidarmes ApoA1 bewerkstelligt den ChE aus den Makrophagen durch den Transporter ABCA1, während reifes HDL den Cholesterin-Efflux mit Hilfe von ABCG1 und SR-B1 fördert (Abbildung 1) (Linton et al., 2000; Rader et al., 2009).

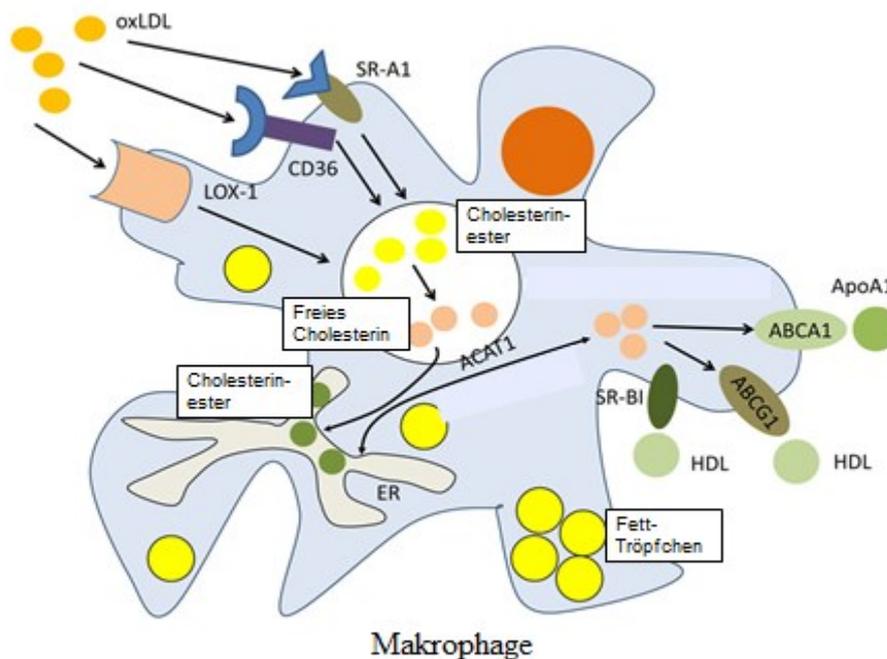
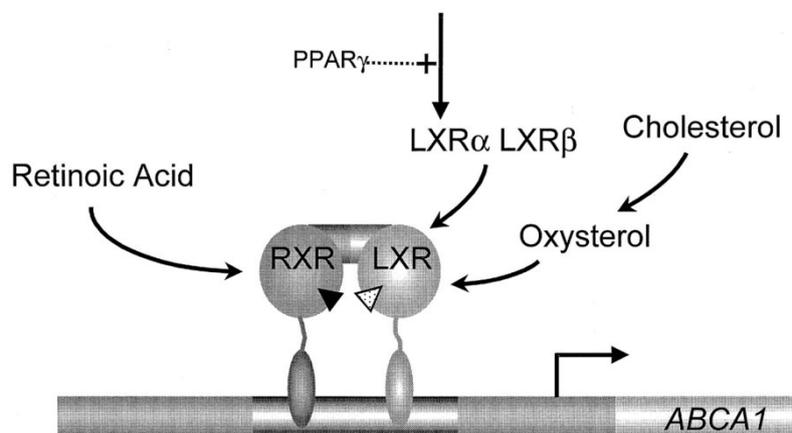


Abbildung 1: Cholesterin-Metabolismus in Makrophagen. Makrophagen absorbieren oxidiertes Cholesterin mit Hilfe der Rezeptoren SR-A1, CD36 und LOX-1. Das aufgenommene Cholesterin wird von der ACAT1 verestert und als Fett-Tröpfchen gespeichert. Die Fett-Tröpfchen können wieder mobilisiert und per Cholesterin-Efflux via ABCA1, ABCG1, SR-B1 ausgeschleust werden. ABCG1 und SR-B1 geben das freie Cholesterin auf reifes HDL ab, während ABCA1 es an ApoA1 abgibt. (vereinfacht, von Chistiakov, Bobryshev et al., 2016)

Die wichtigste Rolle wird dabei dem Transporter ABCA1, einem integralen Membranprotein beigemessen, da die genetische Mutation dieses Transporters ein schweres HDL-Mangel-Syndrom, namens Tangier-Krankheit verursacht. Bei homozygoten Mutationen von ABCA1 sind HDL und ApoA1 im Plasma praktisch nicht vorhanden, LDL ist erniedrigt, während der Triglyceridspiegel erhöht ist. Als Folge kommt es zur Akkumulation von Cholesterin in Gewebemakrophagen, Darmzellen und Leberzellen (Frikke-Schmidt, 2010; Oram and Lawn, 2001). Allerdings scheint dies weder vorzeitig, noch im späteren Leben zwangsläufig zu Atherosklerose zu führen, trotzdem wurde ein erhöhtes Risiko dafür beobachtet. Als Ursache wird der ebenfalls erniedrigte LDL-Spiegel in Betracht gezogen und der Zusammenhang kontrovers diskutiert. Im Allgemeinen gilt ein niedriger HDL-Spiegel als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. (Schaefer et al., 2016; Serfaty-Lacrosniere et al., 1994).

Die Expression von ABCA1 in Makrophagen, und somit der Cholesterin-Efflux wird vom Kernrezeptor PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma) induziert. Die Aktivierung von PPAR γ führt zur Induktion des Liver X Rezeptors (LXR α) (Chawla et al., 2001). LXR bildet daraufhin mit RXR (retinoid X receptor) ein Heterodimer, welches die Transkription von ABCA1 aktiviert (Abbildung 2) (Costet et al., 2000; Jeong et al., 2017). PPAR γ und LXR α in Makrophagen werden durch die Exposition mit oxidiertem LDL aktiviert. PPAR γ benötigt zur Aktivierung oxidierte Fettsäuren wie 9- und 13- HODE, während LXR von oxidierten Cholesterinmetaboliten wie 22(R)- und 25-Hydroxycholesterin induziert werden kann (Chawla et al., 2001).



John F. Oram, and Richard M. Lawn J. Lipid Res. 2001;42:1173-1179

Abbildung 2: Regulation der Gentranskription von ABCA1. PPAR γ induziert LXR, welches mit RXR ein Heterodimer bildet und somit die Transkription von ABCA1 aktiviert. Zur Aktivierung von LXR werden Oxysterole benötigt. (vereinfacht, aus Oram and Lawn, 2001)

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass eine gesteigerte Expression von ABCA1 positive Auswirkungen in Form eines gesteigerten Cholesterin-Rücktransports hat. Dies stellt eine Möglichkeit dar, um Wege zu finden einer Atherosklerose vorzubeugen oder zumindest den Verlauf zu verlangsamen.

In dieser Arbeit wurden als Versuchsmodell für Makrophagen THP-1 Zellen verwendet.

B. Vorausgegangene Studien

Die Mittelmeerküche wird im Allgemeinen mit einem niedrigeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Das darin enthaltene Olivenöl ist dafür bekannt, zu dieser Beobachtung beizutragen. Tatsächlich weisen einige *in vivo* durchgeführten Studien auf den positiven Einfluss von Olivenöl (Öl der Pflanze *Olea europaea*) auf den atherosklerotischen Prozess hin (Casas et al., 2016; Estruch et al., 2013; Montserrat-de la Paz et al., 2016).

Unter den verschiedenen Komponenten des nativen Olivenöls befinden sich einige, deren nützliche Eigenschaften sich positiv auf den atherosklerotischen Prozess auswirken könnten. Konkret werden der Triterpen-Fraktion anti-inflammatorische und vor der LDL-Oxidation schützende Wirkungen zugeschrieben und der phenolischen Fraktion dagegen eher eine Wirkung als Antioxidans und Radikalfänger. Die gesammelten Untersuchungen wurden größtenteils *in vitro* durchgeführt (Lou-Bonafonte et al., 2012).

Des Weiteren beschreibt eine an Apo-E-defizienten Mäusen durchgeführte Studie einen Anstieg des HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux durch extra-natives Olivenöl im Vergleich zu Placebo (Rosenblatt et al., 2008).

Außerdem besagt eine andere Studie, dass extra-natives Olivenöl die Kapazität des HDLs, Cholesterin zu transportieren, erhöht und die Expression der Transporter-Proteine ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen steigert, welche essentiell für den Cholesterin-Efflux aus Makrophagen sind. Andererseits gibt es keine Hinweise darüber, ob der Effekt durch das Olivenöl als Ganzes oder durch einen einzelnen Inhaltsstoff zustande kommt (Helal et al., 2013).

C. In der Arbeit getestete Naturstoffe

Eine kurze Vorstellung der getesteten Inhaltsstoffe des Olivenöls (*Olea europaea*).

Erythrodiol

Erythrodiol (Abbildung 3) ist eines der 4 wichtigsten Triterpene in Oliven, welchem anti-tumorale, anti-inflammatorische and anti-oxidative Eigenschaften zugeschrieben wird (Sanchez-Quesada et al., 2013).

Erythrodiol ist ein pentazyklisches Triterpen, welches im Endokarp, im nativen Olivenöl und in den Blättern des Olivenbaums zu finden ist. Die Konzentration im Öl ist allerdings von der Qualität des Olivenöls und der Varietät des Olivenbaumes abhängig (Sanchez-Quesada et al., 2013).

Des Weiteren konnte *in vitro* eine antiproliferative und apoptose-fördernde Wirkung auf Darmkrebszellen beobachtet werden (Juan et al., 2008; Sanchez-Quesada et al., 2013).

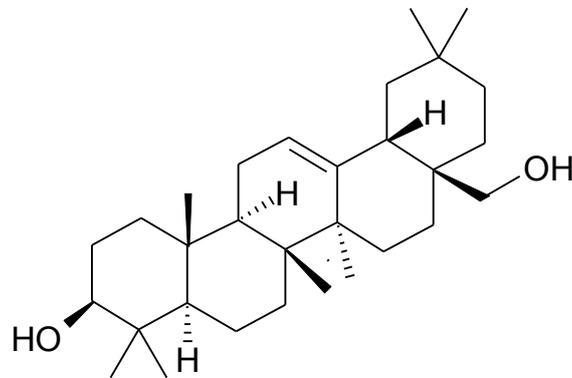


Abbildung 3: Chemische Struktur von Erythrodiol

Uvaol

Uvaol (Abbildung 4) ist ebenfalls eines der wichtigsten Triterpene im Olivenöl und den Blättern des Olivenbaums, wobei die Konzentration genauso von der Qualität des Öls und von der Varietät des Olivenbaums abhängt, wie bei Erythrodiol. Generell werden Uvaol ähnliche Effekte wie dem Inhaltsstoff Erythrodiol zugesprochen (Sanchez-Quesada et al., 2013).

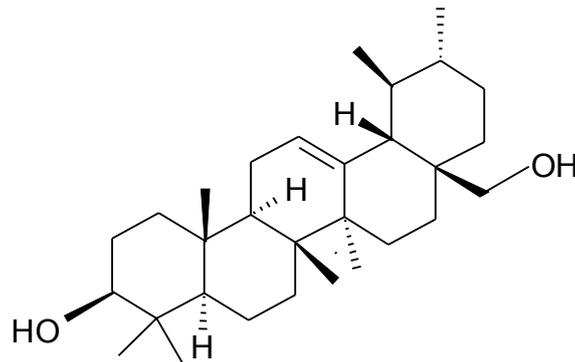


Abbildung 4: Chemische Struktur von Uvaol

Oleanolsäure

Die Oleanolsäure (Abbildung 5) ist eine Triterpensäure aus dem Olivenöl. Diesem Inhaltsstoff wird *in vitro* ein schützender Effekt gegen die Oxidation von LDL zugeschrieben (Andrikopoulos et al., 2003; Sanchez-Quesada et al., 2013).

Des Weiteren wird über Oleanolsäure berichtet, das Fortschreiten von Atherosklerose unabhängig vom Serumlipidspiegel zu verzögern. Die erwähnte Studie wurde *in vivo* an Knockout-Mäusen, denen Apolipoprotein E fehlte durchgeführt (Buus et al., 2011; Sanchez-Quesada et al., 2013).

Derivate der Oleanolsäure werden wiederum als blutfettsenkend und hypoglykämisch aktiv beschrieben (Gutierrez, 2016).

Außerdem konnte in Ratten eine anti-inflammatorische Wirkung festgestellt werden, welche auf Hemmung der Leukozyteninfiltration beruhte (Singh et al., 1992).

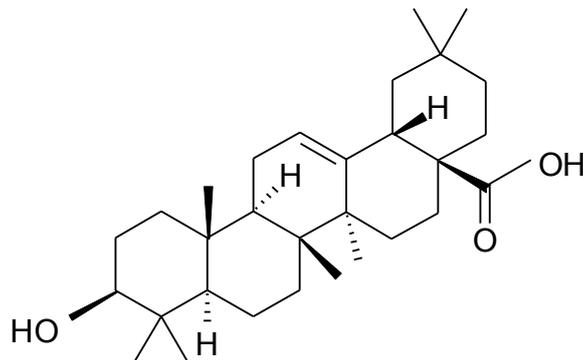


Abbildung 5: Chemische Struktur der Oleanolsäure

Maslinsäure

Maslinsäure (Abbildung 6) ist ebenfalls eine pentazyklische Triterpensäure, welche in den Oliven selbst und auf der Wachsschicht der Blätter zu finden ist. Der Gehalt nimmt allerdings mit fortschreitender Reifung ab (Guinda et al., 2010).

Mehrere Studien beschreiben *in vitro* einen dosisabhängigen, stark hemmenden Effekt auf die kupferinduzierte LDL-Oxidation (Allouche et al., 2010; Wang et al., 2006).

Des Weiteren wird eine anti-karzinogene Wirkung auf HT29 Colonkrebszellen beschrieben, welche auf der Hemmung des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose beruht. Zusätzlich soll Maslinsäure die Proliferation dieses Zelltyps dosisabhängig hemmen (Reyes-Zurita et al., 2009).

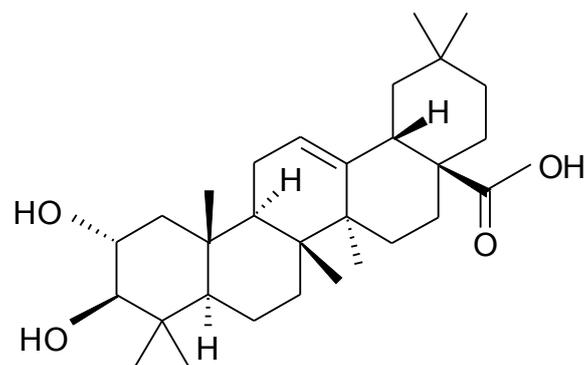


Abbildung 6: Chemische Struktur der Maslinsäure

Oleocanthal

Oleocanthal (Abbildung 7) ist eine phenolische Komponente des Olivenöls. Diesem Inhaltsstoff werden anti-inflammatorische Effekte zugesprochen, welche einer chronischen Entzündung und daraus entstehende weitere degenerative Leiden vorbeugen könnten. Obwohl keine strukturelle Verwandtschaft besteht, scheint Oleocanthal *in vitro* dieselben Cyclooxygenasen wie Ibuprofen zu inhibieren (Beauchamp et al., 2005; Parkinson and Keast, 2014).

Das in den hier präsentierten Experimenten verwendete Oleocanthal wurde von der Gruppe um Professor Liselotte Krenn am Department für Pharmakognosie an der Universität Wien isoliert und zur Verfügung gestellt (Adhami et al., 2015).

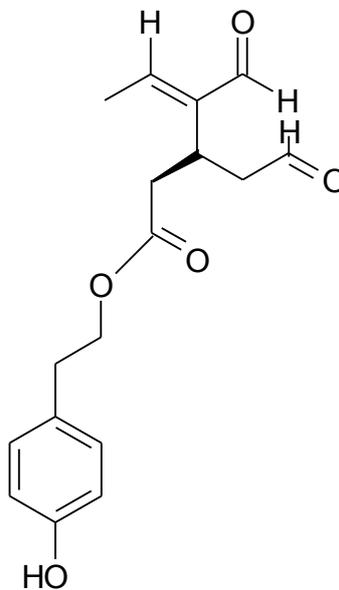


Abbildung 7: Chemische Struktur von Oleocanthal

Oleuropein

Oleuropein (Abbildung 8) ist die dominierende phenolische Komponente in frischem Fruchtfleisch der Olive und ebenfalls in den Blättern zu finden. Dieser Inhaltsstoff ist verantwortlich für den bitteren Geschmack des Olivenöls und wird normalerweise per alkalischer Hydrolyse entfernt (Charoenprasert and Mitchell, 2012).

Dieser Bitterstoff wird von der Pflanze zur Abwehr von Fressfeinden produziert und wirkt denaturierend (Konno et al., 1999).

Des Weiteren werden eine starke anti-oxidative Wirkung, eine Radikalfänger-Wirkung und anti-mikrobielle Eigenschaften gegen ATCC Bakterienstämme und Krankenhauskeime beschrieben (Tuck and Hayball, 2002). Außerdem konnte eine anti-proliferative und apoptose-fördernde Aktivität gegenüber humanen Brustkrebszellen vom Typ MCF-7 beobachtet werden (Han et al., 2009).

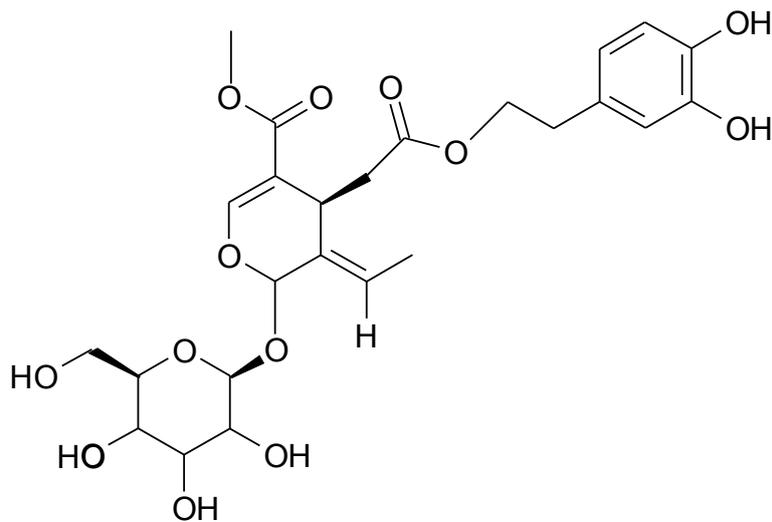


Abbildung 8: Chemische Struktur von Oleuropein

3-Hydroxytyrosol

Hydroxytyrosol (Abbildung 9) ist eine weitere phenolische Komponente des Olivenöls. Es konnten anti-inflammatorische Eigenschaften und eine Aktivität als Radikalfänger beobachtet werden, weshalb eine Empfehlung zur weiteren Untersuchung dieses Inhaltsstoffes bei chronischen und akuten Entzündungen durch rheumatische Erkrankungen ausgesprochen wurde (Silva et al., 2015).

3-Hydroxytyrosol schützt außerdem *in vitro* vor einer kupferinduzierten Oxidation von LDL (Visioli et al., 1995).

Weitere Studien betonen die anti-karzinogenen Aktivitäten von 3-Hydroxytyrosol sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* (Han et al., 2009; Nan et al., 2014).

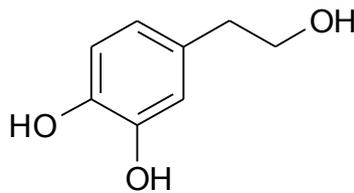


Abbildung 9: Chemische Struktur von 3-Hydroxytyrosol

Betulinsäure

Betulinsäure (Abbildung 10) ist ein pentazyklisches Triterpen. Es konnte *in vitro* eine anti-inflammatorische Aktivität aufgrund von Inhibition des NF- κ B Signalwegs festgestellt werden (Kim et al., 2016).

Auch scheint Betulinsäure die Apoptose von Tumorzellen über den mitochondrialen Signalweg einzuleiten, ohne gesunde Zellen zu schädigen (Zhang et al., 2016).

Des Weiteren wird über die Hemmung der ABCA1-Expression und des Cholesterol-Rücktransports durch Betulinsäure berichtet (Zhao et al., 2013).

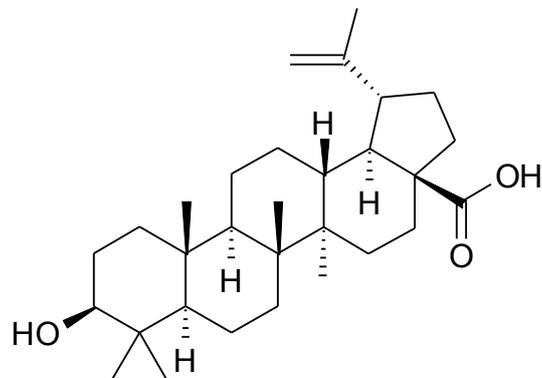


Abbildung 10: Chemische Struktur der Betulinsäure

Chlorogensäure

Chlorogensäure (Abbildung 11) ist ein Ester bestehend aus der Kaffeesäure und der Chinasäure, bekannt aus Kaffee (Jin et al., 2015).

Die Chlorogensäure wird als Antioxidans beschrieben, welches in Zellkulturen die DNA vor Schäden durch Radioaktivität schützt (Xu et al., 2012).

Ferner soll dieser Inhaltsstoff in der Lage sein, den prozentualen Körperfettanteil, den Blutzuckerspiegel, sowie den HbA1c-Wert in Mäusen zu senken. Dies soll durch die Erhöhung des Adiponectin-Spiegels passieren, welcher wiederum die Insulinsensitivität erhöht (Jin et al., 2015).

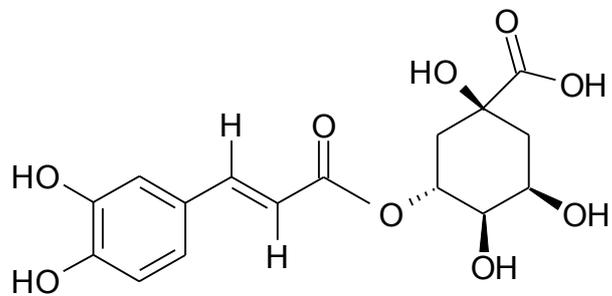


Abbildung 11: Chemische Struktur der Chlorogensäure

Pioglitazon

Pioglitazon (Abbildung 12) ist ein Thiazolidindion, welches die Insulinsensitivität verbessert, und deshalb zur Therapie von Diabetes Typ 2 eingesetzt wird (Miyazaki et al., 2002).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde Pioglitazon aufgrund seiner Fähigkeit, die ABCA1- und ABCG1-Expression von Makrophagen signifikant zu erhöhen, als Positivkontrolle eingesetzt. Dies geschieht über den PPAR γ -LXR α - Signalweg und fördert so den Cholesterol-Rücktransport der Makrophagen (Ozasa et al., 2011).

Mit Pioglitazon wird die Entstehung von Blumentumoren als Nebenwirkung assoziiert (Tuccori et al., 2016).

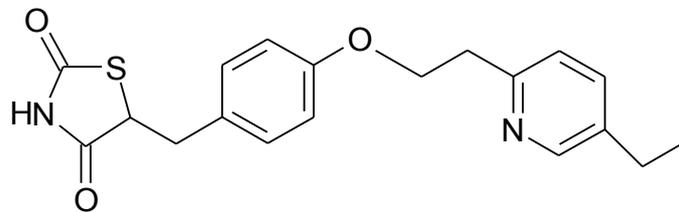


Abbildung 12: Chemische Struktur von Pioglitazon

D. Ziel der Arbeit

Studien suggerieren, dass Olivenöl den HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux aus Makrophagen steigert, wobei die erhöhte Expression von ABCA1 eine Rolle zu spielen scheint (Helal et al., 2013; Rosenblat et al., 2008).

Darüber, ob dieser Effekt von Olivenöl als Ganzes oder von einem einzelnen Inhaltsstoff verursacht wird, gibt es keine Informationen.

Ziel dieser Diplomarbeit war es deshalb, den Einfluss ausgewählter Inhaltsstoffe des Olivenöls auf das Expressionslevel des Transporter-Proteins ABCA1 an aus THP-1 Zellen differenzierten Makrophagen zu untersuchen.

E. Material und Methoden

THP-1 Zellen

Als Modell für Makrophagen wurden THP-1 Zellen verwendet.

Die THP-1 Zelllinie wurde erstmals 1980 von Tsuchiya et al., beschrieben. Sie wurde aus einem einjährigen männlichen Kind isoliert, welches an akuter monozytärer Leukämie erkrankt war (Chanput et al., 2014; Tsuchiya et al., 1980).

Diese monozytären Zellen können mittels PMA (Phorbol 12-myristat-13acetat) zu Makrophagen differenziert werden, was sie zu einem weitverbreiteten Modell zur Erforschung der Rolle von Makrophagen im Krankheitsgeschehen von Atherosklerose macht. Des Weiteren wachsen sie in Suspension, was die Handhabung erleichtert. Außerdem kann die THP-1 Zelllinie in flüssigem Stickstoff gelagert werden (Chanput et al., 2014).

Der Vorteil von THP-1 Zellen gegenüber Monozyten und Makrophagen direkten menschlichen Ursprungs besteht im homogenen genetischen Hintergrund. Die Folge ist eine geringere Variabilität des Phänotyps der Zellen, was in Konsequenz zu reproduzierbareren Ergebnissen führt (Chanput et al., 2014).

Kultivierung der THP-1 Zellen

Zellkultur und Medium

Sämtliche für die Zellkultur erforderlichen Arbeitsschritte wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zur Vorbeugung jeglicher Art von Kontamination der Zellen wurde ausschließlich steriles Material verwendet und in die Werkbank eingebrachte Gegenstände zuvor mit 70% Ethanol eingesprüht.

Zur Kultivierung der THP-1 Zellen (bezogen von ATCC®) wurde RPMI-1640-Medium (produziert von Lonza Group Ltd Basel, Schweiz) verwendet, welches zuvor mit L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin und 10% hitze-inaktiviertem Kälberserum mittels steriler Filtration versetzt wurde. (Tabelle 4)

Dieses komplettierte Medium (im Folgenden komplettes Medium genannt) wurde bei 4°C gelagert und vor Verwendung stets auf 37°C erwärmt und einmal pro Monat erneuert.

Für die Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen wurde des Weiteren kälberserumfreies RPMI-1640-Medium (im Folgenden serum-freies Medium genannt), dem nur L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurde, hergestellt. (Tabelle 4)

Die Zellen selbst wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer T-175 Flasche im Inkubator (HERAcell 150 Incubator, von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, CA, USA) gelagert.

Passagieren der THP-1 Zellen

Die THP-1 Zelllinie wächst in Suspension.

Die THP-1 Zellen wurden in regelmäßigen Intervallen von 2 bis 3 Tagen subkultiviert, um einer Überwucherung der Zellen über eine Konzentration von $1,0 \times 10^6$ lebende Zellen/ml vorzubeugen.

Bei jeder Subkultivierung wurde das komplette Medium vollständig ausgetauscht durch folgende Schritte:

Zunächst wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und darin bei 150 x g für 4 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und das in der Zentrifuge entstandene Zellpellet in frischem, auf 37°C Grad erwärmtem kompletten Medium resuspendiert.

Anschließend wurde die Zellkonzentration und der Lebendanteil mit Hilfe eines Vi-CellTM XR Cell Viability Analyzer (Beckman Counter, Fullerton, CA, USA) bestimmt.

Danach hat man das Volumen an Zellsuspension für eine Zellkonzentration von $0,2 \times 10^6$ lebende Zellen/ml auf 20ml berechnet, dieses Volumen in eine neue Flasche pipettiert und mit frischem kompletten Medium auf 20 ml aufgefüllt.

Für jedes Experiment wurden die THP-1 Zellen ausgesät und behandelt, wie folgt beschrieben.

Aussäen der THP-1 Zellen

Die THP-1 Zellen wurden in einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ lebende Zellen/ml in 6-Well Mikrotiterplatten gesät, wie im Folgenden beschrieben:

Die berechnete notwendige Menge an komplettem Medium wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, welches mit einer berechneten Menge an PMA auf eine Konzentration von 200 nM ergänzt wurde. (Tabelle 6) Anschließend wurde das berechnete Volumen an Zellsuspension zugesetzt, um eine Konzentration von $0,2 \times 10^6$ lebende Zellen/ml zu erreichen. Danach wurden die 6-Well Mikrotiterplatten mit 4ml dieser Suspension pro Well befüllt. Nach der mikroskopischen Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung der Zellen in den Wells, wurden die Mikrotiterplatten für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5,0% CO₂ platziert, um die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu ermöglichen.

Behandlung der THP-1 Zellen mit den Testsubstanzen

Die aus Olivenöl isolierten Testsubstanzen wurden mit DMSO auf eine Konzentration von 30 mM verdünnt und bei -20°C gelagert.

Getestet wurden die Substanzen Erythrodiol, Uvaol, Oleanolsäure, Malinsäure, 3-Hydroxytyrosol, Oleocanthal, Oleuropein, Betulinsäure und Chlorogensäure. Zusätzlich als Negativkontrolle DMSO, sowie als Positivkontrolle Pioglitazon. (Tabelle 1)

Nach der Überprüfung der erfolgreichen Differenzierung zu Makrophagen unter dem Mikroskop wurde mit der Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen begonnen.

Zunächst wurden PBS und serumfreies Medium im 37°C warmen Wasserbad für 30 min erwärmt, und die in DMSO gelösten Testsubstanzen aufgetaut.

Dem vorgewärmten serumfreien Medium wurde 0,1% BSA und 20 µg/ml unverestertes Cholesterin (Tabelle 6), sowie die einzelnen Testsubstanzen zugesetzt. In dieser Suspension betrug die Konzentration der Testsubstanzen 10 µM.

Um zu untersuchen, ob der steigende Effekt einer Testsubstanz auf den ABCA1-Proteinspiegel dosisabhängig ist, wurde die Testsubstanz hier in verschiedenen Konzentrationen (15, 10, 5, 2.5, 1 µM) der Zellsuspension zugesetzt.

Anschließend wurde das verbrauchte Medium aus den Wells der Mikrotiterplatte entfernt und die Zellen mit dem warmen PBS gewaschen. Nachdem das PBS entfernt worden war, erhielt jedes Well 2 ml der mit den Testsubstanzen versetzten Suspension. Danach wurden die Mikrotiterplatten für 24h inkubiert.

Tabelle 1: Testsubstanzen, Stammlösungen, Konzentrationen und deren Anbieter

Testsubstanz	Konzentration der Stammlösung	Getestete Konzentration	Anbieter
DMSO (Trägerlösung)			Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Pioglitazon	30 mM	10 μ M	Molekula Ltd (Shaftesbury, UK)
Erythrodiol	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Uvaol	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Oleanolsäure	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Maslinsäure	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
3-Hydroxytyrosol	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Oleocanthal	30 mM	10 μ M	Department für Pharmakognosie, Universität Wien (Wien, Austria)
Oleuropein	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Betulinsäure	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Chlorogensäure	30 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)

Western Blot

Der Western Blot wurde verwendet um die Expression des Transporter-Proteins ABCA1 in THP-1 Makrophagen zu untersuchen.

Zellyse und Proteinextraktion

Um die benötigten Membranproteine extrahieren zu können, mussten die Zellen lysiert werden. Für diesen Vorgang wurde eine frische Lösung aus NP40-Puffer und Protease-Inhibitoren (Compete, PMSF, NaF, Na₃VO₄) vorbereitet. (Tabelle 7)

Die 6-Well Mikrotiterplatten mit den behandelten Zellen wurden auf Eis gelegt, das Medium abgesaugt, und die Zellen mit ca. 4 ml kaltem PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden 280µl des zuvor frisch zubereiteten Lysepuffers in jedes der Wells pipettiert und die Mikrotiterplatten auf Eis für 30 min auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Nach der Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Schaber vom Boden der Wells gekratzt und die Lysate in 1,5ml große Eppendorf-Gefäße überführt und bei 4°C und 16,060 g 20 min zentrifugiert.

Als Ergebnis erhielt man einen Überstand, in welchem die Proteine enthalten waren und ein Pellet aus Zellresten. Die Überstände wurden vorsichtig ohne Berühren der Zellpellets mit einer Pipette abgesaugt und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Die Überstände wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Bradford-Assay

Der Bradford-Test dient zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Photometrie.

Da für die Vergleichbarkeit der Banden in der anschließenden Gelelektrophorese exakt dieselbe Menge Protein pro Tasche (hier 20 µg) benötigt wird, wurde die Konzentration der Proteinlysate mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt.

Für den Bradford-Test werden transparente 96-Well-Mikrotiterplatten ohne Deckel verwendet.

Zur Vorbereitung wurden Eppendorf-Gefäße (0,5 ml) entsprechend beschriftet, eine Reagenzlösung bestehend aus RotiQuant und doppelt destilliertem Wasser (RotiQuant +

ddH₂O = 1 + 3,75), eine 1:10 Verdünnung des NP40-Lysepuffers und 1:10 Verdünnungen der Proteinlysate frisch zubereitet. (Tabelle 8)

Für die Kalibrierkurve wurden Verdünnungsreihen von Albumin bekannter Konzentration verwendet und jede Probe dreifach vermessen.

Als Erstes wurden 190 µl Reagenzlösung in jedes Well pipettiert.

In die Wells der Eichkurve wurden anschließend 5 µl des 1:10 verdünnten Lysepuffers und in die für die Proben reservierten Wells 10 µl doppelt destilliertes H₂O pipettiert. Danach wurde den Wells für die Kalibrierung 10 µl der verschiedenen Albuminverdünnungen und den Probenwells 5 µl der Proteinlysate zugesetzt.

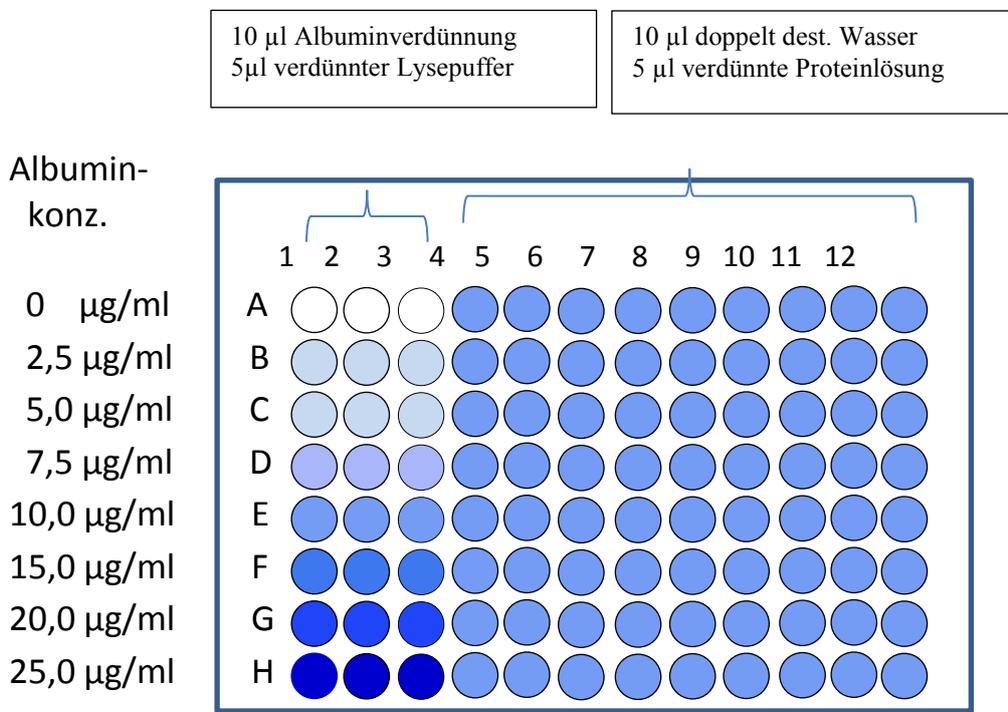


Abbildung 13: Bradford-Assay: Schematischer Pipettierplan

Direkt nach Zusatz der Proteinlysate wurde die Mikrotiterplatte bei einer Absorption von 595 nm mit Hilfe eines Tecan SunriseTM (Tecan) vermessen. Anschließend wurde mit Hilfe der erhaltenen Werte die Kalibrierkurve erstellt und die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

Gelelektrophorese

Denaturierung der Proteinproben

Um die Proteinlysate zu denaturieren, wurde eine Mischung aus 85% SDS und 15% β -Mercaptoethanol hergestellt. Die davon zu den einzelnen Proteinlysaten zugegebene Menge betrug ein Drittel. (Tabelle 9) Die Proteinproben wurden entweder sofort verwendet oder bei -80°C gelagert.

Herstellung der Gele

Für die Gelelektrophorese wurden 10%-ige Tris-HCl-Gele hergestellt, bestehend aus einem Trenngel im unteren Bereich und einem Sammelgel im oberen Bereich.

Das Trenngel bestand aus 30%-igem Polyacrylamid (PAA), destilliertem Wasser, 1,5M Tris-HCl und 10%iger SDS-Lösung. Direkt nach der Zugabe von TEMED und APS wurde das flüssige Gel in die Gelkammer gegossen. (Mengenangaben und Details siehe Tabelle 10)

Zur Vermeidung von Bläschen wurde eine kleine Menge Isopropanol auf das Trenngel gegeben.

Nach der Verfestigung des Trenngels und der Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel in die Gelkammer eingebracht, es bestand aus 30%-igem Polyacrylamid (PAA), destilliertem Wasser, 1,25M Tris-Gel und 10%-iger SDS-Lösung. (Mengenangaben und Details siehe Tabelle 10)

Direkt nach dem Einfüllen des Sammelgels wurde umgehend ein 10-Taschen-Gelkamm im Gel platziert.

Sobald die Verfestigung des Gels erfolgt war, wurde die gesamte Gelkammer in feuchte Tücher gewickelt, in einem Plastikbeutel luftdicht verschlossen und über Nacht bei 4°C gelagert.

Gelelektrophorese

Für die Experimente wurde eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur verwendet. Um die Elektrizität durch die Apparatur, in welche die Gele eingesetzt waren zu leiten, wurden die Zwischenräume mit einem Elektrophorese-Puffer befüllt. (Tabelle 10)

In die erste Tasche jedes Gels wurde Marker pipettiert (Precision Plus AllBlue, Biorad), in die übrigen eine 20 µg Protein entsprechende Menge der einzelnen denaturierten Proteinproben. Die nicht benötigten Wells wurden mit NP40-Lysepuffer befüllt, welcher im gleichen Verhältnis wie die Proteinproben mit SDS und β-Mercaptoethanol ergänzt war.

Die Elektrophorese wurde bei 0,025 A pro Gel durchgeführt, bis die 25kDa Bande den Boden erreicht hatte und sich die 220 kDa Markierung für das ABCA1-Protein im Trenngel befand, was ungefähr 80 min dauerte.

Blotten

Zur Übertragung der Proteinbanden auf eine PVDF-Membran wurde das Tank-Blot-System angewendet, kombiniert mit einem Magnetrührer und einem gefrorenen Kühlakku, um einer Erhitzung der Apparatur vorzubeugen.

Die PVDF-Membran wurde mit Methanol equilibriert, anschließend mit Transferpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) befeuchtet und zwischen zwei mit Transferpuffer befeuchtete Filter in der Blot-Apparatur platziert.

Für die anschließende Übertragung der Proteine wurde 2 Stunden lang eine Spannung von 100 V angelegt.

Danach wurde die Membran eine Stunde lang in 5% Milchpulver in TBST-Puffer auf einem Rüttler inkubiert, anschließend dreimal 15 Minuten lang in TBST (Tris buffered saline with Tween 20) gewaschen. (Tabelle 11)

Anschließend wurde die Membran in einen oberen Teil, welcher das ABCA1-Protein enthielt und in einen unteren Teil, welcher das dazugehörige Aktin enthielt, zerschnitten, was eine parallele Inkubation von ABCA1 und dem dazugehörigen Aktin ermöglichte.

Der obere Teil wurde in ein Zentrifugenröhrchen platziert, welches mit einem Primärantikörper gegen ABCA1 befüllt war, welcher 1:500 verdünnt in TBST mit 3% Milchpulver vorlag. Zur Untersuchung der Spiegel von ABCG1 und SR-B1 wurde an Stelle des Antikörpers gegen ABCA1 ein Antikörper gegen ABCG1 oder SR-B1 verwendet.

Der untere Teil wurde ebenfalls in ein Zentrifugenröhrchen platziert, welches einen Primärantikörper gegen Aktin enthielt, welcher 1:1000 in reinem TBST verdünnt worden war. (Tabelle 2)

Diese Zentrifugenröhrchen wurden über Nacht bei 4°C mit Hilfe eines Rotators inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Membranen aus den Zentrifugenröhrchen entfernt und zunächst 3 x 15 min in TBST gewaschen und anschließend 1 Stunde lang in sekundären Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert.

Als Sekundärantikörper gegen den primären ABCA1-Antikörper (oder ABCG1/SR-B1-Antikörper) wurde ein kaninchenspezifischer Antikörper verwendet, welcher 1:500 in TBST mit 3% Milchpulver verdünnt worden war.

Gegen den Primärantikörper von Aktin wurde sekundär ein mausspezifischer Antikörper verwendet, welcher 1:3000 in TBST verdünnt worden war. (Tabelle 2)

Hinterher wurden alle Membranen 3 x 15 min mit TBST gewaschen und anschließend detektiert.

Tabelle 2: Informationen über die verwendeten Antikörper

Immunogen	Molekulargewicht des Immunogens	Ursprung des Antikörpers	Verdünnung	Anbieter
Primäre Antikörper				
ABCA1	220kDa	Kaninchen, polyklonal	1:500 in 3% Milch in TBS-T	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
ABCG1	75.6 kD	Kaninchen, polyklonal	1:500 in 1% Milch in TBS-T	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
SR-B1	82 kD	Kaninchen, polyklonal	1:500 in TBS-T	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)
Actin	42kDa	Maus, monoklonal	1:1000 in TBS-T	MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich)
Sekundäre Antikörper				
Kaninchen IgG	-	Maus, polyklonal, and HRP gekoppelt	1:500 in 3% milk in TBS-T	New England Biolabs (UK)
Maus IgG	-	Ziege, polyklonal, an HRP gekoppelt	1:3000 in TBS-T	Millipore (Wien, Austria)
Milchpulver			3% in TBS-T	Roth (Wien, Austria)

Detektion

Detektiert wurde mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe des IMAGE Reader LAS-3000.

Direkt vor der Detektion wurde die Membran mit einem Reagenz, bestehend aus ddH₂O, ECL-Reagenz, Luminol und Cumarsäure, benetzt, welches frisch zubereitet und lichtdicht bis zur Verwendung zwischengelagert und erst kurz vorher mit einem Tropfen H₂O₂ versetzt wurde. (Genaue Zusammensetzung in Tabelle 12)

Die darauffolgende Evaluierung geschah mit dem AIDA Image Analyzer und der Normalisierung der Bandenintensitäten von ABCA1 zu den Intensitäten der entsprechenden Aktinbanden.

Prüfung der Zellviabilität

Aussäen der Zellen

Nach der Zugabe von 200nM PMA zum kompletten Medium und des berechneten Volumens an Zellsuspension wurden die Zellen in einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ lebenden Zellen/ml in eine 96-Well-Platte ausgesät und anschließend 3 Tage lang bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet.

Behandlung

Vor der Behandlung der Zellen wurde das Medium entfernt, sowie die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen.

Das serumfreie Medium für die Behandlung wurde noch mit 0,1% BSA, 20 µg/ml unverestertem Cholesterin, sowie mit den jeweiligen Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen supplementiert.

Die getesteten Konzentrationen der Testsubstanzen betragen 40, 20, 10 und 5 µM und wurden mittels Verdünnungsreihe hergestellt.

Sämtliche Testsubstanzen wurden in allen Konzentrationen stets in dreifacher Ausführung getestet. Als Positivkontrolle diente Digitonin in einer Konzentration von 50 µg/ml.

Nach diesem Prozedere wurden die 96-Well-Platten für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet.

Herstellung des Resazurin-Reagens

Zunächst wurde eine Resazurin-Lösung in einer Konzentration von 1 mg/ml auf Vorrat hergestellt, bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht oder verworfen.

Hierfür wurde 1 mg Resazurin (genau gewogen) in 10 ml PBS gelöst.

Direkt vor der Behandlung der Zellen mit Resazurin wurde ein Teil der Vorratslösung entnommen und 1:10 mit PBS verdünnt, um eine Konzentration von 0,1 mg/ml zu erreichen.

Behandlung der Zellen mit Resazurin und Vermessung

Zunächst wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten aus dem Brutschrank entnommen, das darin enthaltene, verbrauchte Medium abgesaugt und mit vorgewärmten PBS gewaschen.

Nach dem Absaugen des PBS wurden die Mikrotiterplatten mit je 100 μ l/Well der vorbereiteten Resazurin-Verdünnung befüllt und erneut im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ 4 h lang bebrütet.

Anschließend wurde mit Hilfe eines Mikroplatten Readers (Tecan Genius Pro) die Fluoreszenz des entstandenen Resorufins bei einer Wellenlänge von 580 nm und einer Anregung von 535 nm vermessen.

Je mehr Zellen die Behandlung mit den Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen überlebt hatten, desto stärker war der pinke Farbton, der durch die Verstoffwechslung des blauen Resazurins zu Resorufin entsteht. Demzufolge bleiben die mit Digitonin als Positivkontrolle behandelten Wells blau, während sich die mit reinem DMSO als Negativkontrolle befüllten Wells stark pink verfärben.

Tabelle 3: Reagenzien für den Zellviabilitäts-Test und zur Untersuchung des Wirkmechanismus

	Stammlösung	Endkonzentration	Anbieter
Resazurin	Reinsubstanz	0,01 mg/ml	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Digitonin	5 mg/ml	50 μ g/ml	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Cycloheximid	100mM	140 μ M	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)

Untersuchung zur Abbaugeschwindigkeit von ABCA1

Um etwas über den Wirkmechanismus zu erfahren, wurde die Auswirkung einer Testsubstanz auf die Abbaugeschwindigkeit der ABCA1-Transporter mit Hilfe von Cycloheximid untersucht. Dafür wurden in zwei 6-Well-Mikrotiterplatten THP-1 Zellen wie zuvor in einer Konzentration von $0,2 \times 10^6$ lebende Zellen/ml ausgesät und 3 Tage lang inkubiert, um zu Makrophagen zu differenzieren. Anschließend wurden die Wells der einen Platte mit jeweils $10 \mu\text{M}$ der Testsubstanz, die der zweiten Platte zum Vergleich mit $10 \mu\text{M}$ DMSO als Negativkontrolle behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h begann die Behandlung mit Cycloheximid. Die Cycloheximid-Lösung wurde mit sterilfiltriertem kälberserumfreien RPMI-1640-Medium frisch hergestellt. Als Zeitpunkte für die Zugabe des Cycloheximids wurden 60 min, 40 min, 20min und 0 min vor Lyse gewählt. Zu jedem der Zeitpunkte wurde je einem Well der mit der Testsubstanz behandelten Platte und je einem Well der mit DMSO behandelten Platte Cycloheximid in einer Menge zugesetzt, welche einer Endkonzentration von $140 \mu\text{M}$ entsprach. (Tabelle 3)

Nach der anschließenden Lyse wurden diese Proteinproben denaturiert, einer Gelelektrophorese und einem Western Blot unterzogen, sowie mit Antikörpern gegen ABCA1 inkubiert und detektiert.

F. Statistik und Datenanalyse

Zur Datenanalyse wurde die Software GraphPad Prism Version 4.03. verwendet, um die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Versuchen zu analysieren.

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde Bonferroni`s Multiple Comparison Test verwendet. Grundsätzlich wurde zur Auswertung der Ergebnisse aller Fragestellungen die einfaktorielle Varianzanalyse (One-way analysis of variance - ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur als Post-hoc-Test herangezogen. Einzige Ausnahme bildete die Untersuchung zur Abbaurrate von ABCA1, wobei die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Korrektur als Post-hoc-Test zum Einsatz kam.

G. Resultate

Allgemeine Informationen

Die Abbildungen der Western Blots stehen immer repräsentativ für die in den Experimenten erhaltenen ABCA1/ABCG1/SR-B1- und Aktinbanden.

Die graphischen Auswertungen der Banden der Western Blots zeigen stets das Ergebnis nach der Normalisierung der ABCA1/ABCG1/SR-B1 zu den jeweiligen Kontrollproteinen (Aktin).

1. Die Effekte der Olivenölinhaltsstoffe auf die ABCA1 Proteinlevel

Beim Western Blot-Experiment der potentiell aktiven Inhaltsstoffe Erythrodiol, Uvaol, Maslinsäure, Oleanolsäure, 3-Hydroxytyrosol, Oleocanthal, Oleuropein, Betulinsäure und Chlorogensäure verursachte ausschließlich das Triterpen Erythrodiol einen signifikanten Anstieg des ABCA1-Proteinlevels. Uvaol zeigte eine leichte Tendenz, ABCA1-Proteinlevel zu erhöhen, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant.

Die verbliebenen Testsubstanzen Maslinsäure, Oleanolsäure, 3-Hydroxytyrosol, Oleocanthal, Oleuropein, Betulinsäure und Chlorogensäure zeigten keinerlei Wirkung auf das ABCA1-Proteinlevel (Abbildung 14).

Die Ergebnisse sind immer im Vergleich zur reinen Trägerlösung DMSO und zur Positivkontrolle Pioglitazon zu werten.

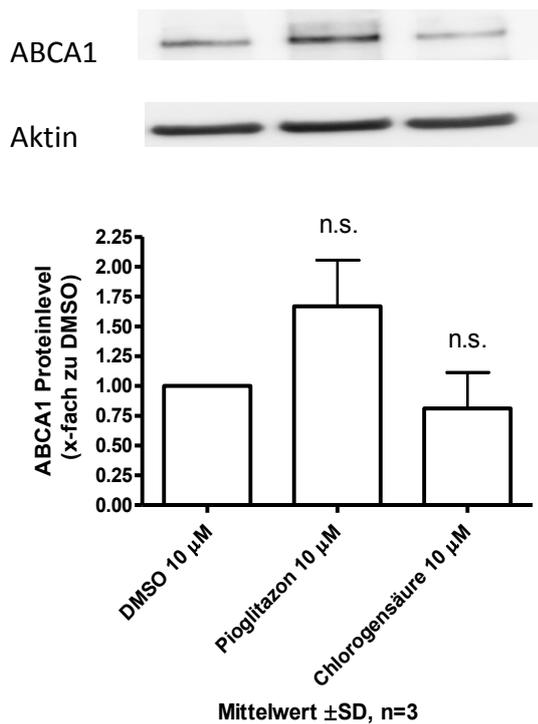
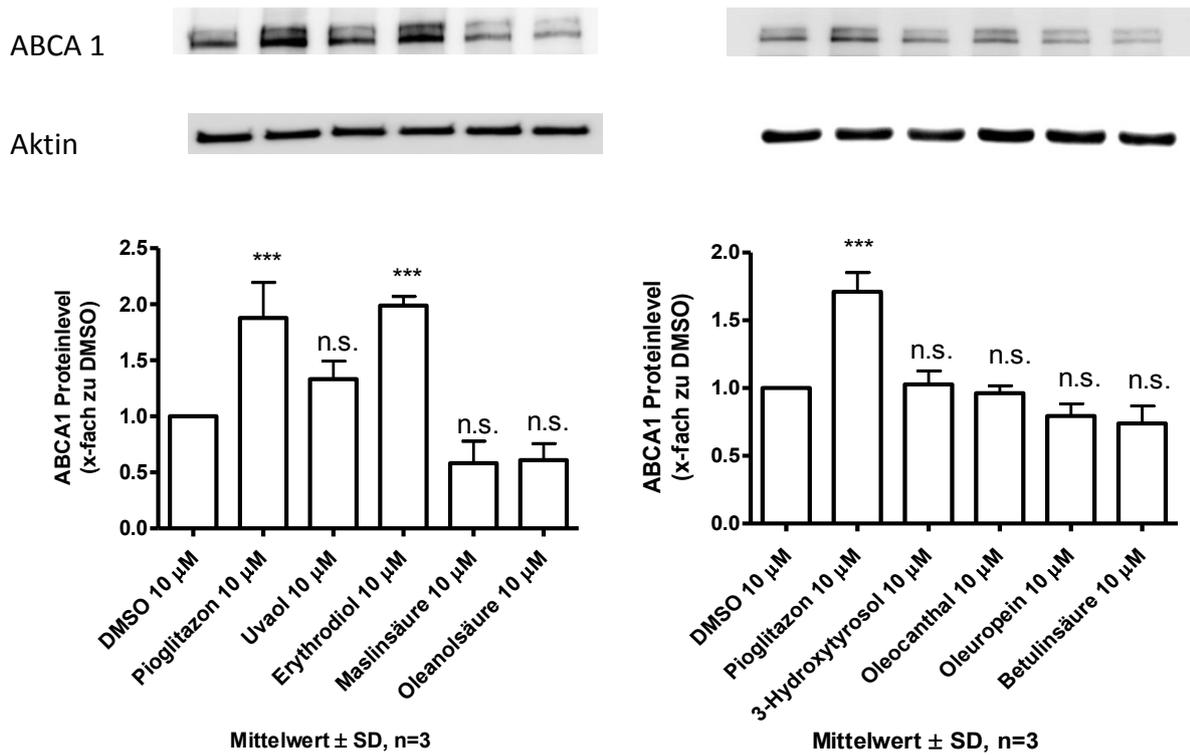


Abbildung 14: Einfluss der Testsubstanzen Uvaol, Erythrodiol, Maslinsäure, Oleanolsäure, 3-Hydroxytyrosol, Oleocanthal, Oleuropein, Betulinsäure und Chlorogensäure auf die Proteinlevel von ABCA1 verglichen mit DMSO (reine Trägerlösung) und Pioglitazon (Positivkontrolle). Differenzierte THP-1 Makrophagen wurden mit den jeweiligen Testsubstanzen behandelt, für 24h inkubiert, anschließend lysiert und mittels Western Blot analysiert. Sämtliche Werte werden als Mittelwert \pm SD von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels der One-Way ANOVA Analyse mit Bonferroni Post-Test ermittelt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. Keine Signifikanz

2. Prüfung der Zellviabilität

Der Zellviabilitäts-Test mit Resazurin wies Erythrodiol in der getesteten Konzentration von 10 μM in vier unabhängigen Versuchen als sicher aus. Als Vergleich diente die reine Trägerlösung DMSO. Die Wells der überlebenden Zellen verfärbten sich wie die reine Trägerlösung DMSO pink, während die Wells der abgestorben Zellen wie die Positivkontrolle Digitonin nach wie vor ein bläuliche Farbe aufwiesen.

Die mit Erythrodiol oder Maslinsäure behandelten Zellen starben bei einer Konzentration von ca. 20 μM , während die mit Oleanolsäure und Betulinsäure behandelten Zellen eine Stoffkonzentration von 20 μM unbeschadet überlebten.

Uvaol, 3-Hydroxytyrosol, Oleocanthal, Oleuropein und Chlorogensäure erwiesen sich als unschädlich bis zu einer Konzentration von 40 μM , wobei beachtet werden muss, dass nicht alle Testsubstanzen in dieser hohen Konzentration in DMSO löslich waren (Abbildung 15 und 16).

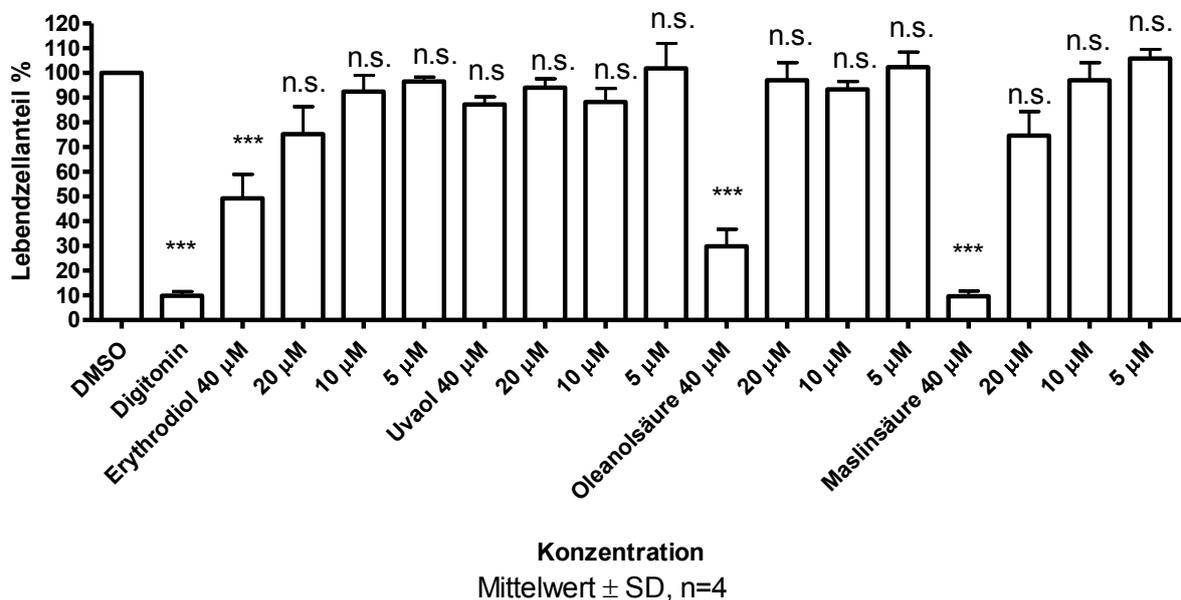


Abbildung 15: Einfluss der Testsubstanzen Erythrodiol, Uvaol, Oleanolsäure und Maslinsäure auf die Zellviabilität von zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen verglichen mit DMSO (reine Trägerlösung) und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin (zytotoxische Positivkontrolle). Die THP-1 Makrophagen wurden mit den einzelnen Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Resazurin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ weitere 4h inkubiert und anschließend das Stoffwechselprodukt mittels Fluoreszenz vermessen. Sämtliche Werte werden als Mittelwert \pm SD von 4 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels der One-Way ANOVA Analyse mit Bonferroni Post-Test ermittelt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. keine Signifikanz im Vergleich zu DMSO.

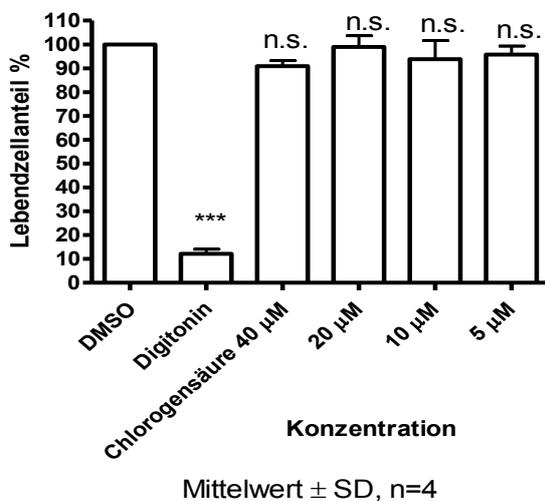
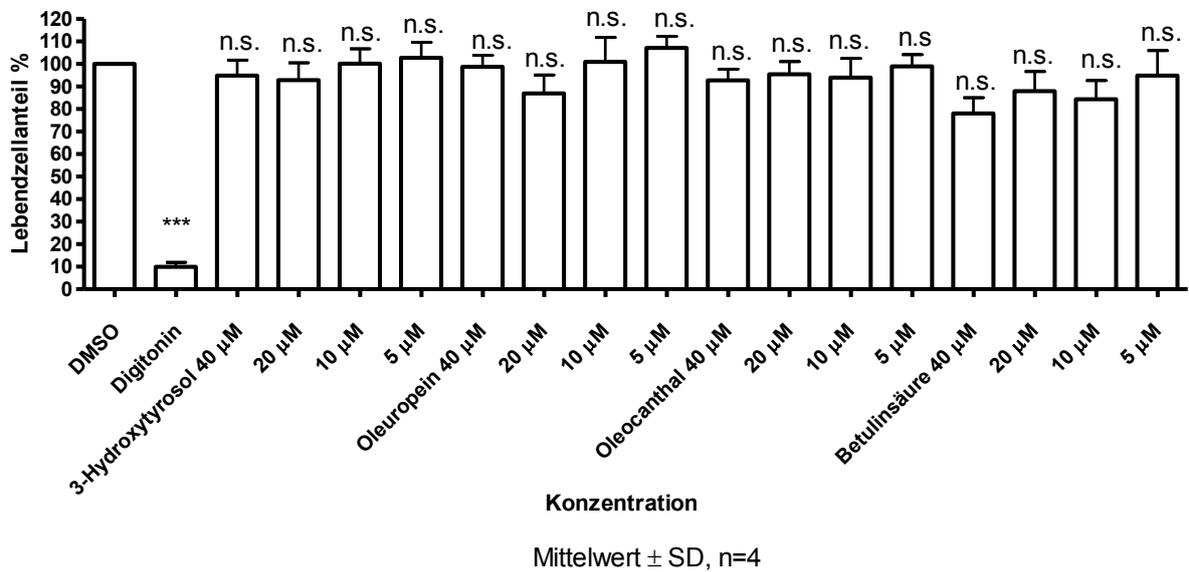
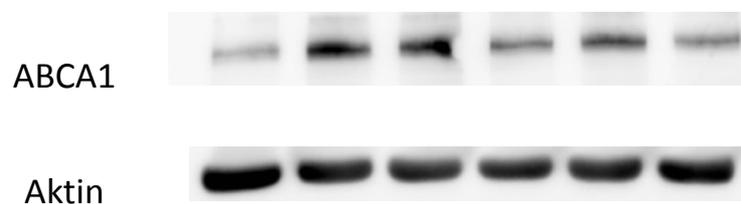


Abbildung 16: Einfluss der Testsubstanzen 3-Hydroxytyrosol, Oleuropein, Oleocanthal, Betulinsäure und Chlorogensäure auf die Zellviabilität von zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen verglichen mit DMSO (reine Trägerlösung) und 50µg/ml Digitonin (zytotoxische Positivkontrolle). Die THP-1 Makrophagen wurden mit den einzelnen Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Resazurin 10µg/ml weitere 4h inkubiert und anschließend das Stoffwechselprodukt mittels Fluoreszenz vermessen. Sämtliche Werte werden als Mittelwert ± SD von 4 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels der One-Way ANOVA Analyse mit Bonferroni Post-Test ermittelt. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. keine Signifikanz im Vergleich zu DMSO.

3. Dosisabhängigkeit der Wirkung von Erythrodiol

Da Erythrodiol in den vorangegangenen Experimenten den Gehalt an ABCA1 in den Membranen der Zellen steigerte und sich als ungiftig für THP-1 Zellen erwies, wurden weitere Untersuchungen mit dieser Substanz durchgeführt.

In vier unabhängigen Versuchen konnte mit Hilfe des Western Blots eine messbare Tendenz von Erythrodiol auf das ABCA1-Proteinlevel ab einer Konzentration von 2,5 μM beobachtet werden, während eine Signifikanz jedoch erst ab einer Konzentration von 10 μM gegeben war (Abbildung 17). Dieses Ergebnis ist im Vergleich mit der reinen Trägerlösung DMSO zu werten.



Erythrodiol in Abhängigkeit zur Dosis

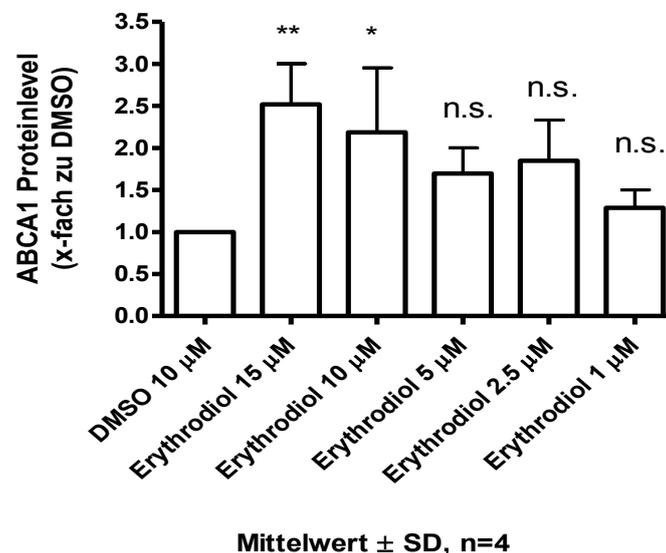


Abbildung 17: Die Abbildung stellt den konzentrationsabhängigen Einfluss von Erythrodiol auf das ABCA1 Proteinlevel in differenzierten THP-1 Makrophagen im Vergleich zu DMSO (reine Trägerlösung) dar. THP-1 Makrophagen wurden mit Erythrodiol in den Konzentrationen 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM und 15 μM behandelt und 24 h lang inkubiert und anschließend lysiert und einer Western Blot Analyse unterzogen. Sämtliche Werte werden als Mittelwert \pm SD von 4 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels der One-Way ANOVA Analyse mit Bonferroni Post-Test ermittelt. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. keine Signifikanz im Vergleich zu DMSO.

4. Effekt von Erythrodiol auf die Proteinlevel von ABCG1 und SR-B1

Des Weiteren wurde untersucht, ob Erythrodiol zusätzlich einen Effekt auf die Spiegel von ABCG1 und SR-B1 der THP-1 Zellen besitzt.

In drei unabhängigen Western Blot Experimenten konnte keinerlei Steigerung des ABCG1- oder des SR-B1-Proteinlevels durch Erythrodiol beobachtet werden (Abbildung 18).

Verglichen wurde mit der reinen Trägerlösung DMSO und der Positivkontrolle Pioglitazon.

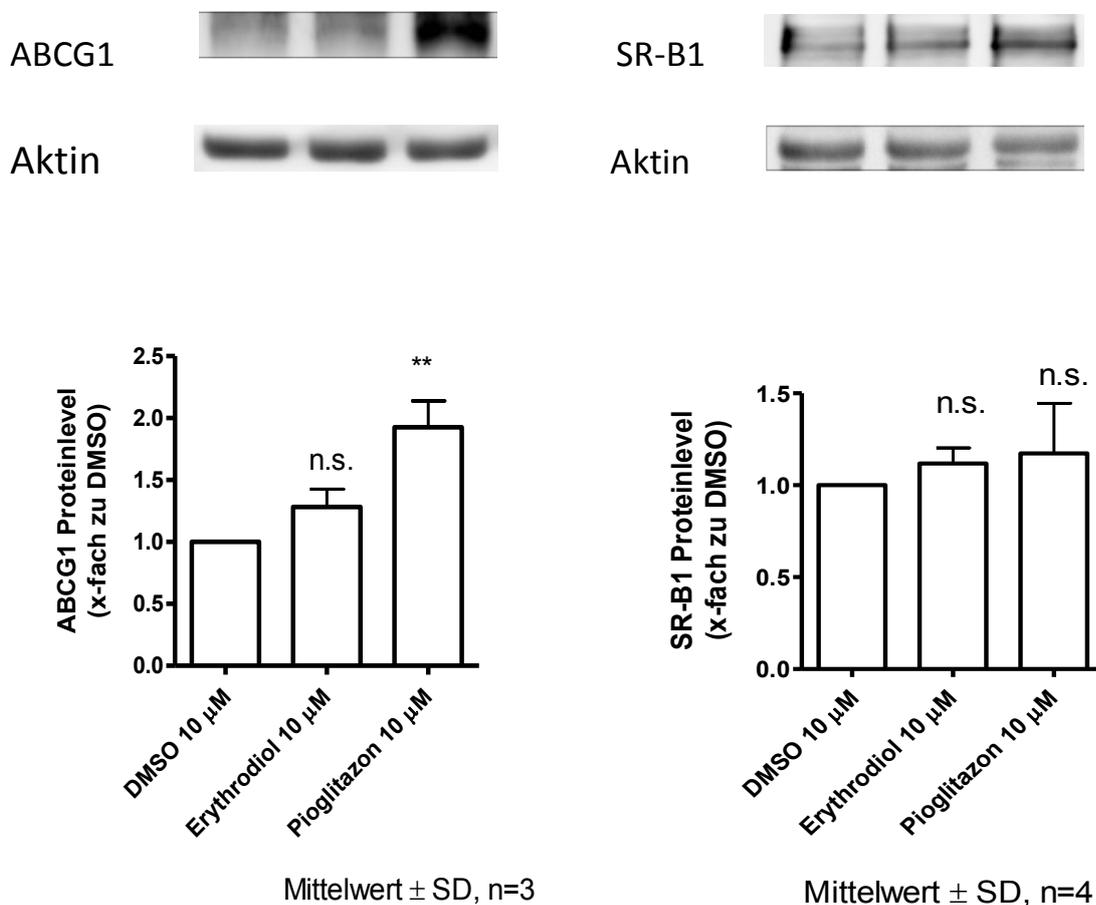


Abbildung 18: Einfluss der Testsubstanz Erythrodiol auf das Proteinlevel von ABCG1 und SR-B1 verglichen mit DMSO (reine Trägerlösung) und Pioglitazon (Positivkontrolle). Differenzierte THP-1 Makrophagen wurden mit Erythrodiol (10 μ M) behandelt, für 24h inkubiert, anschließend lysiert und einer Western Blot Analyse unterzogen. Sämtliche Werte werden als Mittelwert \pm SD von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels der One-Way ANOVA Analyse mit Bonferroni Post-Test ermittelt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. keine Signifikanz im Vergleich zu DMSO. Erythrodiol scheint keinen Einfluss auf das ABCG1 Proteinlevel in zu Makrophagen differenzierten THP-1 Zellen zu haben.

5. Effekt von Erythrodiol auf die Abbaugeschwindigkeit des ABCA1-Transporterproteins

Um den Einfluss von Erythrodiol auf die Abbaurrate des ABCA1-Transporterproteins zu untersuchen, wurden drei unabhängige Western Blot Experimente mit jeweils einer 6-Well Mikrotiterplatte, welche mit 10 μ M Erythrodiol behandelte THP-1-Zellen enthielt und jeweils einer 6-Well Platte, welche ausschließlich mit der reinen Trägerlösung DMSO behandelte THP-1-Zellen enthielt, durchgeführt. Diesen Platten wurde in je ein Well in den Zeitabständen 1 h, 40 min, 20 min und 0 min vor Lyse Cycloheximid zugesetzt. Während bei den mit DMSO behandelten Zellen eine kontinuierliche Abnahme der Intensität der ABCA1-Banden sichtbar ist, blieb bei den mit Erythrodiol behandelten Zellen die Intensität der ABCA1-Banden nahezu konstant (Abbildung 19).

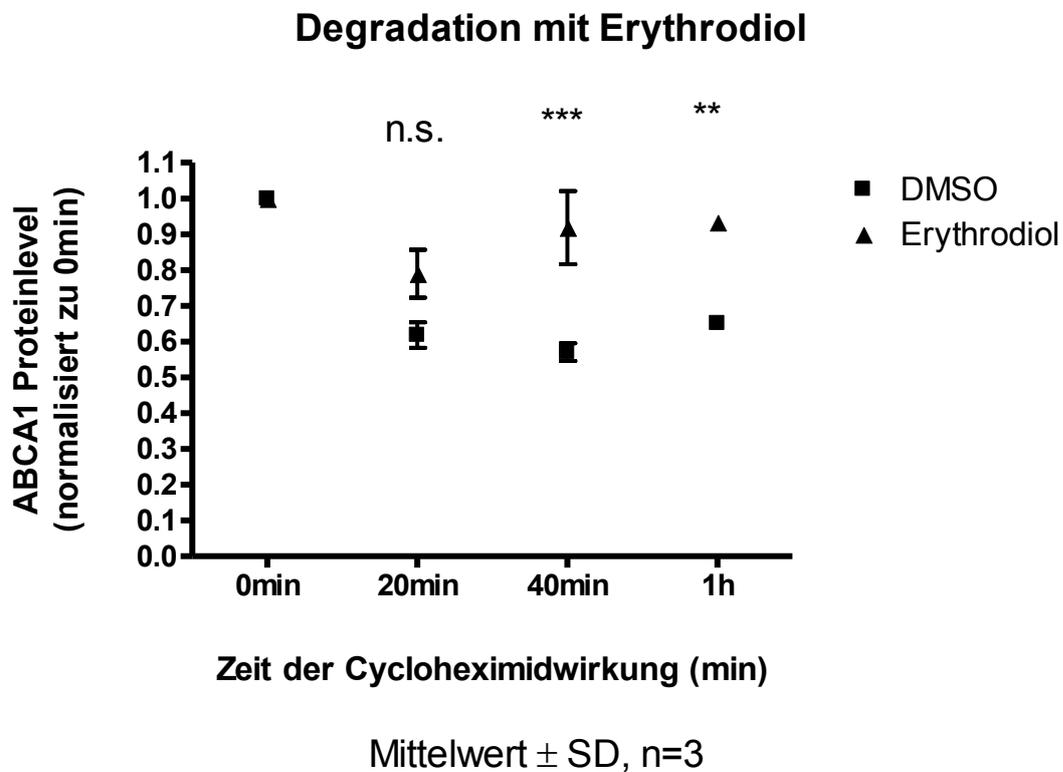
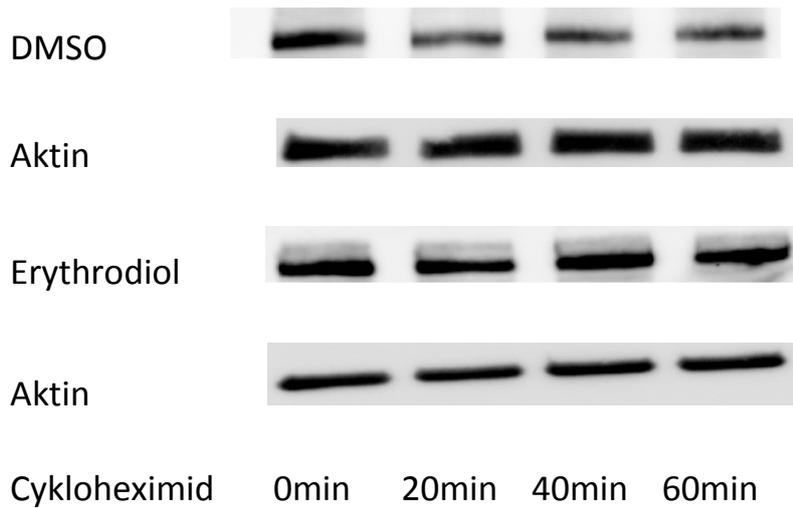


Abbildung 19: Die Abbildung stellt den Einfluss von Erythrodiol auf die Abbaurrate von ABCA1 dar. THP-1 Makrophagen wurden mit 10 μ M Erythrodiol oder DMSO (reine Trägerlösung) behandelt und 24h lang inkubiert. Anschließend wurden die Makrophagen mit 140 μ M Cycloheximid zu den Zeitpunkten 0 min, 20 min, 40 min und 1h behandelt bei Zeitpunkt 0 min lysiert und einer Westernblot Analyse unterzogen. Sämtliche Werte werden als Mittelwert \pm SD von 3 unabhängigen Versuchen dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels der Two-Way ANOVA Analyse mit Bonferroni Post-Test ermittelt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. keine Signifikanz im Vergleich zu DMSO.

H. Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob der Anstieg des ABCA1-Proteinlevels von THP-1 Makrophagen auf den Olivenölextrakt als Ganzes oder hauptsächlich auf einen einzelnen Inhaltsstoff zurückzuführen ist. Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit wurden bereits publiziert (Wang et al., 2017).

Die Resultate unterstützen grundsätzlich die These des positiven Einflusses auf den HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux durch die gesteigerte Expression der Transporter-Proteine ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen (Helal et al., 2013). Bisher war jedoch wenig darüber bekannt, welcher Inhaltsstoff wie und in welchem Maße zur Wirkung beiträgt.

Unter den im Rahmen dieser Diplomarbeit getesteten Inhaltsstoffen war ausschließlich Erythrodiol in der Lage, das ABCA1-Proteinlevel in THP-1 Makrophagen im direkten Vergleich mit der reinen Trägerlösung DMSO signifikant zu erhöhen (Abbildung 14). Dieser Effekt trat konzentrationsabhängig auf und war ab einer Konzentration von 10 μM als signifikant einzustufen (Abbildung 17). Zugleich konnte keinerlei Steigerung der Proteinlevel von ABCG1 und SR-B1 durch Erythrodiol beobachtet werden (Abbildung 18). Die Transporterproteine ABCG1 und SR-B1 tragen ebenfalls zum Cholesterin-Efflux aus Makrophagen bei (Hutchins and Heinecke, 2015).

Der Inhaltsstoff Erythrodiol, gehört zu den beiden Dialkoholen innerhalb der Triterpenfraktion. Diese unterscheiden sich von den Triterpensäuren Maslinsäure und Oleanolsäure hauptsächlich durch die Funktion am C-17. Erythrodiol und Uvaol unterscheiden sich lediglich durch eine voneinander abweichende Position und räumliche Anordnung einer einzigen Methylgruppe (Sanchez-Quesada et al., 2013).

In vorangegangenen Experimenten konnte Dr. Limei Wang keinerlei Anstieg der mRNA-Spiegel der Transporterproteine ABCA1, ABCG1 und SR-B1 durch Erythrodiol feststellen, weshalb ein Einfluss auf die Transkription von ABCA1 nicht anzunehmen war (Wang et al., 2017). Dieser Befund wurde als Hinweis auf posttranslationale Prozesse gewertet und deshalb die Wirkung von Erythrodiol auf die Abbaurate des Transporter-Proteins ABCA1 gezielt untersucht. Dies geschah mit Hilfe des *de-novo* -Proteinsynthese-Hemmers Cycloheximid. Tatsächlich war eine signifikante Verzögerung der Abbaurate der ABCA1-

Transporter durch Erythrodiol im Vergleich zur reinen Trägerlösung festzustellen. Am deutlichsten war dieser Effekt bei 40 min Inkubation mit Cycloheximid sichtbar (Abbildung 19).

Das verwendete Analyseverfahren Western Blot hat zwangsläufig größere Standardabweichungen zur Folge, da es sich um eine semi-quantitative Methode handelt und ein Proteinverlust während des Transfers auf die Membran unvermeidbar ist. Dessen ungeachtet konnte ein signifikanter Effekt von Erythrodiol auf das ABCA1-Proteinlevel der THP-1 Makrophagen festgestellt werden.

Der Zellviabilitäts-Test mit Resazurin zeigte, dass Erythrodiol bis zu einer Konzentration von etwa 20 μM für Makrophagen sicher zu sein scheint (Abbildung 15). In einem Teil der Versuche betrug der Lebendzellanteil bei einer Konzentration von 20 μM Erythrodiol über 80 %, während er in weiteren Versuchen unter 80 % sank. Somit könnte die Konzentration von 20 μM Erythrodiol als die Grenze betrachtet werden, bis zu welcher THP-1 Makrophagen überleben.

Zudem beschreibt eine Studie Erythrodiol als zytotoxisch für verschiedene Krebszelllinien, wie diverse Brustkrebszelllinien, Darmkrebszellen (HT-29), Leukämiezellen (K-562) und B16 Melanomzellen, jedoch als sicher für gesunde körpereigene Zellen bis zu einer Konzentration von 100 μM (Manayi et al., 2013).

Die mit Maslinsäure behandelten Zellen starben ab einer Konzentration von ca. 20 μM , während die mit Oleanolsäure und Betulinsäure behandelten Zellen eine Stoffkonzentration von 20 μM überlebten. Uvaol, 3-Hydroxytyrosol, Oleocanthal, Oleuropein und Chlorogensäure zeigten sich als unschädlich bis zu einer Konzentration von 40 μM (Abbildung 16). Während der Experimente im Rahmen dieser Diplomarbeit fiel bei hohen Konzentrationen der Testsubstanzen eine verschlechterte Löslichkeit in DMSO auf, was die Schwankungen in der Zellviabilität möglicherweise erklären könnte.

Der Triterpen-Fraktion, bestehend aus Erythrodiol, Uvaol, Oleanolsäure und Maslinsäure, wird vermehrt *in vitro* ein Schutz vor LDL Oxidation zugeschrieben (Sanchez-Quesada et al., 2013). Jedoch wurden die triterpenoiden Inhaltsstoffe des Olivenöls bis dato nie auf ihre Wirkung auf den Cholesterin-Efflux untersucht, weder als vollständige Fraktion, noch einzeln.

Bei der Untersuchung der phenolischen Fraktion wurde in einer Studie eine Steigerung der ABCA1-Expression bei J774-Makrophagen insbesondere durch Hydroxytyrosol und Tyrosol festgestellt (Berrougui et al., 2015), was jedoch in den Experimenten im Rahmen dieser Diplomarbeit weder für Hydroxytyrosol, noch für eine der anderen phenolischen Komponenten bestätigt werden konnte (Abbildung 14). Wobei darauf hingewiesen werden sollte, dass in der Studie und in den hiesigen Versuchen unterschiedliche Makrophagen-Typen zum Einsatz kamen.

Isolierte Betulinsäure hingegen scheint das ABCA1-Proteinlevel durch die Hemmung des NF- κ B-Signalweges zu senken (Zhao et al., 2013). Tatsächlich war in den Experimenten eine Senkung der ABCA1-Proteinlevel im Vergleich zum reinen Träger DMSO erkennbar (Abbildung 14).

I. Fazit

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Erythrodiol das ABCA1-Proteinlevel in aus THP-1 Monozyten differenzierten Makrophagen steigert. Diese Steigerung geschieht scheinbar durch eine Verzögerung des Abbaus der ABCA1-Transporterproteine. Dieser Zusammenhang könnte eine Erklärung für die Berichte über Olivenöl sein, das ABCA1-Proteinlevel in Makrophagen zu erhöhen. Unabhängig davon könnte es sich lohnen, Erythrodiol als Einzelwirkstoff weiter zu untersuchen.

In welchem Maße die ABCA1-Proteinlevel-senkende Wirkung der Betulinsäure im gesamten Olivenölextrakt ins Gewicht fällt, könnte noch untersucht werden. Dies könnte beispielsweise durch die Behandlung von THP-1 Makrophagen mit dem in der Natur vorliegenden Verhältnis von Erythrodiol zu Betulinsäure im Vergleich zu Erythrodiol als Einzelwirkstoff geschehen.

J. Appendix

Abkürzungen

ABCA1	ATP-binding cassette transporter subfamily A member 1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter subfamily G member 1
ACAT 1	Acetyl-CoA-Acyltransferase 1
ANOVA	One-way analysis of variance – einfaktorielle Varianzanalyse
ApoA1	Apolipoprotein A1
ApoB	Apolipoprotein B
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ChE	Cholesterol efflux – Cholesterin-Efflux
CD36	Cluster of differentiation 36
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced chemilumineszenz
HDL	High-density lipoproteins
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure - eine Puffersubstanz
HRP	Horseradish peroxidase - Meerrettichperoxidase
LDL	Low-density lipoprotein
LOX-1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor 1
LXR	Liver X receptor – ein nukleärer Rezeptor
NF-κB	nuclear factor of activated B-cells – ein Transkriptionsfaktor
n.s.	not significant – nicht signifikant
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline – Phosphate-gepufferte Salzlösung
PDGF	platelet-derived growth factor – ein Wachstumsfaktor
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma – ein nukleärer Rezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCT	Reverse cholesterol efflux – Cholesterin-Rücktransport

RPMI	Zellkultur-Medium mit Hydrogenkarbonat-Puffersystem
RXR	retinoid X rezeptor - Kernrezeptor
SDS	Sodium dodecyl sulfate - Natriumlaurylsulfat
SMC	Smooth Muscle Cell – glatte Muskelzelle
SOAT 1	Sterol-O-Acyltransferase
SR-A1	Scavenger receptor class A type 1
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
TBS-T	Tris-buffered saline and tween 20 – Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THP-1	Humane akute monozytische Leukämie-Zelllinie

Tabellen

Tabelle 4: Zusammensetzung des serumfreien und des kompletten Mediums und deren Anbieter

Medium	Endkonzentration	Anbieter
Serumfreies RPMI-1640-Medium		
RPMI-1640-Medium (phenol red Roswell Park Memorial Institute)		Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz)
Penicillin/Streptomycin Mixtur (10 000 U/ml Kalium-Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin-sulfat)	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz)
L-Glutamine 200 mM	2 mM	Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz)
Komplettes RPMI-1640-Medium		
RPMI-1640-Medium (phenol red Roswell Park Memorial Institute)		Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz)
Penicillin/Streptomycin Mixtur (10 000 U/ml Kalium-Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin-sulfat)	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz)
L-Glutamine 200 mM	2 mM	Lonza Group Ltd (Basel, Schweiz)
Hitze-inaktiviertes Kälberserum	10%	Gibco (Lofer, Austria)

Tabelle 5: Zusammensetzung des PBS-Puffers

PBS (pH 7.4)		
	36.0 g (123 mM)	NaCl
	7.4 g (10 mM)	Na ₂ HPO ₄
	2.15 g (3 mM)	KH ₂ PO ₄

Tabelle 6: Zusätze für die Behandlung der THP-1-Zellen

	Stammlösung	Endkonzentration	Anbieter
PMA	1mM	200 nM	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Unverestertes Cholesterin (geliefert als wasserlöslicher Komplex mit Methyl-β- cyclodextrin)	1 mg/ml	20 µg/ml	Sigma-Aldrich (Wien, Austria)
Rinderserum-albumin (BSA)	2%	0.1%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 7: Zusammensetzung des NP40-Lysepuffers

Stammlösung NP40		
	150 mM	NaCl
	50 mM	HEPES (pH 7.4)
	1%	NP40
Lysepuffer NP40		
	940 µl	NP40
	40 µl	complete® 25x (Roche)
	10 µl	PMSF (0.1M)
	5 µl	NaF (1M)
	5 µl	Na ₃ VO ₄ (100 mM)

Tabelle 8: Chemikalien für den Bradford-Assay

	Anbieter
Roti®-Quant 5xKonzentrat	Roth (Wien, Austria)
Albumin-Verdünnungsreihe	Roth (Wien, Austria)

Tabelle 9: Lösung zur Denaturierung der Proteinlysate für den Western Blot

Lösung zur Denaturierung der Proteinlysate		
	85 %	3 x SDS
	15 %	β-Mercaptoethanol
3 x SDS-Puffer		
	37.5 ml	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
	6 g	SDS-Natriumlaurylsulfat
	30 ml	Glycerin
	15 mg	Bromphenol-Blau
	Ad 100 ml	ddH ₂ O

Tabelle 10: Gele, Puffer und Reagenzien für die Gelelektrophorese

Trenngel 10 %		
	2.5 ml	PAA (30%)
	1.875 ml	Tris-HCl (1.5 M pH8.8)
	75 µl	SDS (10%)
	3.05 ml	ddH ₂ O
	7.5 µl	TEMED
	37.5 µl	APS (10%)
Sammelgel		
	640 µl	PAA (30%)
	375 µl	Tris-HCl (1.25M pH 6.8)
	37.5 µl	SDS (10%)
	2.62 ml	ddH ₂ O
	7.5 µl	TEMED
	37.5 µl	APS (10%)
Elektrophorese-Puffer 10X		
	30 g	Tris-Base
	144 g	Glycine

	10 g	SDS
	Ad 1000 ml	ddH ₂ O
Precision Plus Protein™ Standard All Blue		BIO-RAD (Wien, Austria)

Tabelle 11: Zusammensetzung der Waschflüssigkeit und des Transferpuffers

TBST-T 10x (pH 8.0)		
	30 g	Tris-Base
	111 g	NaCl
	10 ml	Tween 20
	Ad 1000 ml	ddH ₂ O
Transferpuffer 5x		
	15.169 g	Tris-Base
	72.9 g	Glycin
	Ad 1000 ml	ddH ₂ O

Tabelle 12: Chemikalien zur Detektion

Reagenz für die Chemilumineszenz		
	4.5 ml	ddH ₂ O
	500 µl	Tris-Base (1 M pH 8.5)
	22.5 µl	Luminol
	11.2 µl	Cumarsäure
	1.5 µl	H ₂ O ₂ (30%)
Luminol-Stammlösung		
	0.44 g	Luminol
	10 ml	DMSO
p-Cumarsäure-Stammlösung		
	0.15 g	Cumarsäure
	10 ml	DMSO

K. Quellenverzeichnis

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

Adhami, H.R., Zehl, M., Dangl, C., Dorfmeister, D., Stadler, M., Urban, E., Hewitson, P., Ignatova, S., and Krenn, L. (2015). Preparative isolation of oleocanthal, tyrosol, and hydroxytyrosol from olive oil by HPLC. *Food Chem* 170, 154-159.

Allam, A.H., Thompson, R.C., Wann, L.S., Miyamoto, M.I., Nur El-Din Ael, H., El-Maksoud, G.A., Al-Tohamy Soliman, M., Badr, I., El-Rahman Amer, H.A., Sutherland, M.L., *et al.* (2011). Atherosclerosis in ancient Egyptian mummies: the Horus study. *JACC Cardiovasc Imaging* 4, 315-327.

Allouche, Y., Beltran, G., Gaforio, J.J., Uceda, M., and Mesa, M.D. (2010). Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem Toxicol* 48, 2885-2890.

Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N., and Papapeorgiou, V.P. (2003). Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytother Res* 17, 501-507.

Beauchamp, G.K., Keast, R.S., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C.H., Smith, A.B., and Breslin, P.A. (2005). Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45-46.

Berrougui, H., Ikhlef, S., and Khalil, A. (2015). Extra Virgin Olive Oil Polyphenols Promote Cholesterol Efflux and Improve HDL Functionality. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 208062.

Buus, N.H., Hansson, N.C., Rodriguez-Rodriguez, R., Stankevicius, E., Andersen, M.R., and Simonsen, U. (2011). Antiatherogenic effects of oleanolic acid in apolipoprotein E knockout mice. *Eur J Pharmacol* 670, 519-526.

Casas, R., Sacanella, E., Urpi-Sarda, M., Corella, D., Castaner, O., Lamuela-Raventos, R.M., Salas-Salvado, J., Martinez-Gonzalez, M.A., Ros, E., and Estruch, R. (2016). Long-Term Immunomodulatory Effects of a Mediterranean Diet in Adults at High Risk of Cardiovascular Disease in the PREvencion con Dieta MEDiterranea (PREDIMED) Randomized Controlled Trial. *J Nutr* 146, 1684-1693.

Chanput, W., Mes, J.J., and Wichers, H.J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 23, 37-45.

Charoenprasert, S., and Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem* 60, 7081-7095.

Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., *et al.* (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7, 161-171.

- Chistiakov, D.A., Bobryshev, Y.V., and Orekhov, A.N. (2016). Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 20, 17-28.
- Chistiakov, D.A., Melnichenko, A.A., Myasoedova, V.A., Grechko, A.V., and Orekhov, A.N. (2017). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* 95, 1153-1165.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 28240-28245.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M.I., Corella, D., Aros, F., Gomez-Gracia, E., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., *et al.* (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 368, 1279-1290.
- Frikke-Schmidt, R. (2010). Genetic variation in the ABCA1 gene, HDL cholesterol, and risk of ischemic heart disease in the general population. *Atherosclerosis* 208, 305-316.
- Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T., and Muragaki, Y. (2012). Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm* 2012, 693083.
- Guinda, A., Rada, M., Delgado, T., Gutierrez-Adanez, P., and Castellano, J.M. (2010). Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *J Agric Food Chem* 58, 9685-9691.
- Gutierrez, R.M. (2016). Hypolipidemic and hypoglycemic activities of a oleanolic acid derivative from *Malva parviflora* on streptozotocin-induced diabetic mice. *Arch Pharm Res.*
- Han, J., Talorete, T.P., Yamada, P., and Isoda, H. (2009). Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 59, 45-53.
- Helal, O., Berrougui, H., Loued, S., and Khalil, A. (2013). Extra-virgin olive oil consumption improves the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux and increases ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages. *Br J Nutr* 109, 1844-1855.
- Hutchins, P.M., and Heinecke, J.W. (2015). Cholesterol efflux capacity, macrophage reverse cholesterol transport and cardioprotective HDL. *Curr Opin Lipidol* 26, 388-393.
- Jeong, S.J., Lee, M.N., and Oh, G.T. (2017). The Role of Macrophage Lipophagy in Reverse Cholesterol Transport. *Endocrinol Metab (Seoul)* 32, 41-46.
- Jia, S.J., Gao, K.Q., and Zhao, M. (2017). Epigenetic regulation in monocyte/macrophage: A key player during atherosclerosis. *Cardiovasc Ther* 35.
- Jin, S., Chang, C., Zhang, L., Liu, Y., Huang, X., and Chen, Z. (2015). Chlorogenic acid improves late diabetes through adiponectin receptor signaling pathways in db/db mice. *PLoS One* 10, e0120842.

Juan, M.E., Wenzel, U., Daniel, H., and Planas, J.M. (2008). Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Mol Nutr Food Res* 52, 595-599.

Kim, K.S., Lee, D.S., Kim, D.C., Yoon, C.S., Ko, W., Oh, H., and Kim, Y.C. (2016). Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Coussaric and Betulinic Acids Isolated from *Diospyros kaki* in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules* 21.

Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., and Nakamura, M. (1999). Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9159-9164.

Kwak, B.R., Back, M., Bochaton-Piallat, M.L., Caligiuri, G., Daemen, M.J., Davies, P.F., Hoefler, I.E., Holvoet, P., Jo, H., Krams, R., *et al.* (2014). Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *Eur Heart J* 35, 3013-3020, 3020a-3020d.

Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325.

Linton, M.F., Yancey, P.G., Davies, S.S., Jerome, W.G.J., Linton, E.F., and Vickers, K.C. (2000). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In *Endotext*, L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA)).

Lou-Bonafonte, J.M., Arnal, C., Navarro, M.A., and Osada, J. (2012). Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res* 56, 1043-1057.

Manayi, A., Saeidnia, S., Ostad, S.N., Hadjiakhoondi, A., Ardekani, M.R., Vazirian, M., Akhtar, Y., and Khanavi, M. (2013). Chemical constituents and cytotoxic effect of the main compounds of *Lythrum salicaria* L. *Z Naturforsch C* 68, 367-375.

Mestas, J., and Ley, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 18, 228-232.

Miyazaki, Y., Mahankali, A., Matsuda, M., Mahankali, S., Hardies, J., Cusi, K., Mandarino, L.J., and DeFronzo, R.A. (2002). Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2784-2791.

Montserrat-de la Paz, S., Bermudez, B., Cardelo, M.P., Lopez, S., Abia, R., and Muriana, F.J. (2016). Olive oil and postprandial hyperlipidemia: implications for atherosclerosis and metabolic syndrome. *Food Funct* 7, 4734-4744.

Nan, J.N., Ververis, K., Bollu, S., Rodd, A.L., Swarup, O., and Karagiannis, T.C. (2014). Biological effects of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: An extra view from genome-wide transcriptome analysis. *Hell J Nucl Med* 17 *Suppl* 1, 62-69.

- Oram, J.F., and Lawn, R.M. (2001). ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 42, 1173-1179.
- Ozasa, H., Ayaori, M., Iizuka, M., Terao, Y., Uto-Kondo, H., Yakushiji, E., Takiguchi, S., Nakaya, K., Hisada, T., Uehara, Y., *et al.* (2011). Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPARgamma/LXRalpha pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis* 219, 141-150.
- Parkinson, L., and Keast, R. (2014). Oleocanthal, a phenolic derived from virgin olive oil: a review of the beneficial effects on inflammatory disease. *Int J Mol Sci* 15, 12323-12334.
- Rader, D.J., Alexander, E.T., Weibel, G.L., Billheimer, J., and Rothblat, G.H. (2009). The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl, S189-194.
- Reyes-Zurita, F.J., Rufino-Palomares, E.E., Lupianez, J.A., and Cascante, M. (2009). Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett* 273, 44-54.
- Ros, E., Martinez-Gonzalez, M.A., Estruch, R., Salas-Salvado, J., Fito, M., Martinez, J.A., and Corella, D. (2014). Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Adv Nutr* 5, 330S-336S.
- Rosenblat, M., Volkova, N., Coleman, R., Almagor, Y., and Aviram, M. (2008). Antiatherogenicity of extra virgin olive oil and its enrichment with green tea polyphenols in the atherosclerotic apolipoprotein-E-deficient mice: enhanced macrophage cholesterol efflux. *J Nutr Biochem* 19, 514-523.
- Sanchez-Quesada, C., Lopez-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltran, G., and Gaforio, J.J. (2013). Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem* 61, 12173-12182.
- Schaefer, E.J., Anthonot, P., Diffenderfer, M.R., Polisecki, E., and Asztalos, B.F. (2016). Diagnosis and treatment of high density lipoprotein deficiency. *Prog Cardiovasc Dis* 59, 97-106.
- Serfaty-Lacrosniere, C., Civeira, F., Lanzberg, A., Isaia, P., Berg, J., Janus, E.D., Smith, M.P., Jr., Pritchard, P.H., Frohlich, J., Lees, R.S., *et al.* (1994). Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 107, 85-98.
- Silva, S., Sepodes, B., Rocha, J., Direito, R., Fernandes, A., Brites, D., Freitas, M., Fernandes, E., Bronze, M.R., and Figueira, M.E. (2015). Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis. *J Nutr Biochem* 26, 360-368.
- Singh, G.B., Singh, S., Bani, S., Gupta, B.D., and Banerjee, S.K. (1992). Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 44, 456-458.

Suckling, K.E., and Stange, E.F. (1985). Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 26, 647-671.

Tektonidis, T.G., Akesson, A., Gigante, B., Wolk, A., and Larsson, S.C. (2015). A Mediterranean diet and risk of myocardial infarction, heart failure and stroke: A population-based cohort study. *Atherosclerosis* 243, 93-98.

Thompson, R.C., Allam, A.H., Lombardi, G.P., Wann, L.S., Sutherland, M.L., Sutherland, J.D., Soliman, M.A., Frohlich, B., Mininberg, D.T., Monge, J.M., *et al.* (2013). Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *Lancet* 381, 1211-1222.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176.

Tuccori, M., Filion, K.B., Yin, H., Yu, O.H., Platt, R.W., and Azoulay, L. (2016). Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study. *Bmj* 352, i1541.

Tuck, K.L., and Hayball, P.J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* 13, 636-644.

Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G., and Galli, C. (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 117, 25-32.

Wang, L., Wesemann, S., Krenn, L., Ladurner, A., Heiss, E.H., Dirsch, V.M., and Atanasov, A.G. (2017). Erythrodiol, an Olive Oil Constituent, Increases the Half-Life of ABCA1 and Enhances Cholesterol Efflux from THP-1-Derived Macrophages. *Front Pharmacol* 8, 375.

Wang, R., Wei, W., Wang, L., Liu, R., Yi, D., and Du, L. (2006). Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 77, 534-537.

Wentzel, J.J., Chatzizisis, Y.S., Gijzen, F.J., Giannoglou, G.D., Feldman, C.L., and Stone, P.H. (2012). Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: current understanding and remaining questions. *Cardiovasc Res* 96, 234-243.

Wohlschlaeger, J., Bertram, S., Theegarten, D., Hager, T., and Baba, H.A. (2015). [Coronary atherosclerosis and progression to unstable plaques : Histomorphological and molecular aspects]. *Herz* 40, 837-844.

Xu, J.G., Hu, Q.P., and Liu, Y. (2012). Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J Agric Food Chem* 60, 11625-11630.

Zhang, X., Hu, J., and Chen, Y. (2016). Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression (Review). *Mol Med Rep* 14, 4489-4495.

Zhao, G.J., Tang, S.L., Lv, Y.C., Ouyang, X.P., He, P.P., Yao, F., Chen, W.J., Lu, Q., Tang, Y.Y., Zhang, M., *et al.* (2013). Antagonism of betulinic acid on LPS-mediated inhibition of ABCA1 and cholesterol efflux through inhibiting nuclear factor-kappaB signaling pathway and miR-33 expression. *PLoS One* 8, e74782.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.