

Institut für Ernährungswissenschaften  
der Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

## **Einfluss von konjugierten Linolsäure-Isomeren auf atheroskleroserelevante Parameter in humanen Endothelzellen der Aorta**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Oecotrophologin (FH) Sabine Schleser  
geb. am 11.12.1975 in Apolda

Gutachter: Prof. Dr. K. Eder  
Prof. Dr. G. Stangl  
Prof. Dr. G. Jahreis

Verteidigung am: 20.11.2006

Halle/Saale 2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000011152**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011152>]

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>2 Methoden und Material</b>	<b>8</b>
2.1 Kultivierung der humanen Endothelzellen der Aorta (HAoEC) . . . . .	8
2.2 Konjugierte Linolsäure (CLA)- und Linolsäure-Lösungen . . . . .	9
2.3 Untersuchungen zum Einfluss von <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA und <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA auf die Bildung vasoaktiver Substanzen in HAoEC . . . . .	9
2.3.1 Inkubation der Zellen . . . . .	9
2.3.2 Aufarbeitung der Zellen . . . . .	9
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau . . . . .	10
2.3.4 Proteinbestimmung . . . . .	10
2.3.5 Morphologie . . . . .	10
2.3.6 Bestimmung des Fettsäuremusters in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen Phosphatidylethanolamin (PE) und -cholin (PC) . . . . .	11
2.3.6.1 Extraktion von Gesamtlipiden . . . . .	11
2.3.6.2 Trennung der Lipidfraktionen . . . . .	11
2.3.6.3 Analyse des Fettsäuremusters . . . . .	12
2.3.7 Bestimmung konjugierter Dien-Fettsäuren in den Gesamtlipiden . . . . .	12
2.3.8 Die Bestimmung der Freisetzung der Eicosanoide PGI <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> und PGF <sub>2α</sub> . . . . .	12
2.3.9 Aktivitätsmessung der sekretorischen Phospholipase A <sub>2</sub> . . . . .	14
2.3.10 Bestimmung der Freisetzung des NO . . . . .	15
2.3.11 Bestimmung der relativen mRNA-Konzentrationen der Enzyme Δ5-, Δ6-Desaturase, sekretorische Phospholipase A <sub>2</sub> , Cyclooxygenase-1, -2 und endotheliale NO-Synthase . . . . .	15
2.3.11.1 RNA-Isolierung . . . . .	16
2.3.11.2 cDNA-Synthese . . . . .	16

2.3.11.3	RT-PCR . . . . .	17
2.3.12	Bestimmung der Freisetzung des Endothelin-1 . . . . .	21
2.4	Untersuchungen zum Einfluss von <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA, <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA und Linolsäure auf proinflammatorische Parameter in TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC . . . . .	22
2.4.1	Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$ . . . . .	22
2.4.2	Bestimmung der Zellvitalität mit dem MTT-Test . . . . .	22
2.4.3	Proteinbestimmung . . . . .	23
2.4.4	Bestimmung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin . . . . .	24
2.4.5	Bestimmung der Freisetzung der Chemokine MCP-1 und Interleukin-8 . . . . .	25
2.4.6	Bestimmung der Adhäsion der Monozyten U937 an die HAoEC . . . . .	26
2.4.7	Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und PPAR $\gamma$ . . . . .	27
2.4.7.1	Nuklearextraktion . . . . .	27
2.4.7.2	Proteinbestimmung des Nuklearextrakts . . . . .	28
2.4.7.3	DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren p50 und p65 der NF- $\kappa$ B-Familie und PPAR $\gamma$ . . . . .	28
2.5	Statistische Auswertung . . . . .	29
2.6	Geräte und Hilfsmittel . . . . .	29
2.7	Chemikalien und Lösungen . . . . .	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Einfluss von <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA und <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA auf die Bildung vasoaktiver Substanzen in HAoEC . . . . .	37
3.1.1	Zellzahl und Zellvitalität . . . . .	37
3.1.2	Proteingehalt . . . . .	37
3.1.3	Morphologie der Zellen . . . . .	38
3.1.4	Anteile der verwendeten CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC . . . . .	40
3.1.5	Anteile der Linolsäure und Arachidonsäure in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC . . . . .	41
3.1.6	Arachidonsäure/Linolsäure-Quotient und relative mRNA-Konzentrationen der $\Delta$ 5- und $\Delta$ 6-Desaturase . . . . .	43
3.1.7	Anteile konjugierter Dien-Fettsäuren in den Gesamtlipiden . . . . .	45
3.1.8	Aktivität und relative mRNA-Konzentration der sekretorischen Phospholipase A <sub>2</sub> . . . . .	46
3.1.9	Eicosanoidbildung . . . . .	47
3.1.9.1	Freisetzung der Eicosanoide 6-keto PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> , TXB <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> und PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> . . . . .	47
3.1.9.2	Relative mRNA-Konzentrationen der Cyclooxygenase-1 und -2 . . . . .	48
3.1.10	Bildung des NO . . . . .	50
3.1.10.1	Freisetzung von Nitrat und Nitrit . . . . .	50

3.1.10.2	Relative mRNA-Konzentration der endothelialen NO-Synthase . . . . .	51
3.1.11	Freisetzung des Endothelin-1 . . . . .	51
3.2	Einfluss von <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA, <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA und Linolsäure auf proinflammatorische Parameter in TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC . . . . .	52
3.2.1	Zellvitalität und Proteingehalt . . . . .	52
3.2.2	Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin . . . . .	53
3.2.3	Freisetzung der Chemokine MCP-1 und Interleukin-8 . . . . .	55
3.2.4	Adhäsion der Monozyten U937 an die HAoEC . . . . .	57
3.2.5	DNA-Bindungsaktivität der Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B . . . . .	58
3.2.6	DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionfaktors PPAR $\gamma$ . . . . .	60
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1	Einfluss der <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA und <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA auf die Bildung vasoaktiver Substanzen in HAoEC . . . . .	62
4.1.1	Anteile der verwendeten CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC . . . . .	63
4.1.2	Die Eicosanoidsynthese . . . . .	65
4.1.3	Die NO-Synthese . . . . .	73
4.1.4	Die Endothelin-1-Freisetzung . . . . .	75
4.2	Einfluss von <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA, <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA und Linolsäure auf proinflammatorische Parameter in HAoEC . . . . .	77
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>117</b>

## Abbildungsverzeichnis

3.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen der HAoEC mit 40facher Vergrößerung . . .	39
3.2	Relative mRNA-Konzentrationen der $\Delta 6$ -Desaturase (A) und $\Delta 5$ -Desaturase (B) in den HAoEC . . . . .	44
3.3	Aktivität der sekretorischen Phospholipase A <sub>2</sub> in den HAoEC. . . . .	46
3.4	Relative mRNA-Konzentration der sekretorischen Phospholipase A <sub>2</sub> in den HAoEC. . . . .	47
3.5	Relative mRNA-Konzentrationen der Cyclooxygenase-1 (A) und Cyclooxygenase-2 (B) in den HAoEC . . . . .	49
3.6	Menge des freigesetzten Nitrat und Nitrit aus den HAoEC in HBSS . . . . .	50
3.7	Relative mRNA-Konzentration der endothelialen NO-Synthase in den HAoEC . . . . .	51
3.8	Menge des freigesetzten Endothelin-1 aus den HAoEC in HBSS. . . . .	52
3.9	Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1(A), VCAM-1 (B) und E-Selektin (C) auf den HAoEC. . . . .	55
3.10	Mengen der freigesetzten Chemokine MCP-1 (A) und Interleukin-8 (B) aus den HAoEC. . . . .	56
3.11	Adhäsion der Monozyten U937 an die HAoEC . . . . .	57
3.12	DNA-Bindungsaktivität des p50 (A) und des p65 (B) der NF- $\kappa$ B-Familie in den HAoEC. . . . .	59
3.13	DNA-Bindungsaktivität des PPAR $\gamma$ in den HAoEC. . . . .	60
4.1	Schematische Darstellung der Bildung der vasoaktiven Substanzen Eicosanoide, NO und Endothelin-1 in einer Endothelzelle. . . . .	77
4.2	Schematische Darstellung proinflammatorischer Prozesse der frühen Entstehungsphase der Atherosklerose. . . . .	86

## Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Primer für die real-time RT-PCR im MJ Research Opticon . . .	18
2.2	Verwendete Primer für die real-time RT-PCR im RotorGene 2000 . . . . .	19
2.3	Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR im Mastercycler personal von Eppendorf . . . . .	21
3.1	Zellzahl und Zellvitalität der HAoEC. . . . .	37
3.2	Proteingehalt der HAoEC. . . . .	38
3.3	Anteile der verwendeten CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC der HAoEC. . . . .	41
3.4	Anteile der Linolsäure (LA) und der Arachidonsäure (AA) in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC der HAoEC. . . . .	42
3.5	Quotient aus den Anteilen der Arachidonsäure (AA) und Linolsäure (LA) in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC der HAoEC. . . . .	43
3.6	Anteile konjugierter Dien (CD)-Fettsäuren in den Gesamtlipiden der HAoEC. . . . .	45
3.7	Mengen der freigesetzten Eicosanoide aus den HAoEC in HBSS. . . . .	48
3.8	Zellvitalität und Proteingehalt der TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC. . . . .	53
A.1	Anteile der gesättigten, der einfach ungesättigten und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (SFA, MUFA und PUFA) in den Gesamtlipiden der HAoEC. . . . .	117
A.2	Anteile der gesättigten, der einfach ungesättigten und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (SFA, MUFA und PUFA) in der Phosphatidylethanolaminfraktion der HAoEC. . . . .	118
A.3	Anteile der gesättigten, der einfach ungesättigten und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (SFA, MUFA und PUFA) in der Phosphatidylcholinfraktion der HAoEC. . . . .	119

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure ( <i>arachidonic acid</i> )
AChE	Acetylcholinesterase
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
AP-1	<i>activator protein-1</i>
BAEC	Bovine Endothelzellen der Aorta ( <i>bovine aortic endothelial cells</i> )
BCECF-AM	2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein-Acetoxy-methylester
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin bzw. bovines Serumalbumin
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CD-Fettsäuren	Konjugierte Dien-Fettsäuren
cDNA	<i>complementary</i> bzw. <i>copy</i> DNA
CLA	Konjugierte Linolsäure ( <i>conjugated linoleic acid</i> )
COX	Cyclooxygenase
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische PLA <sub>2</sub> ( <i>cytosolic PLA<sub>2</sub></i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNTB	5,5-Dithiobis-[2-nitrobenzoesäure]
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ECE-1	<i>endothelin-converting-enzyme-1</i>
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
EIA	Enzymimmunassay
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale NOS
EPA	Eicosapentaensäure ( <i>eicosapentaenoic acid</i> )
ET-1	Endothelin-1
FAME	Fettsäuremethylester ( <i>fatty acid methyl esters</i> )
fwd	<i>forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

---

GC	Gaschromatographie
HAoEC	Humane Endothelzellen der Aorta ( <i>human aortic endothelial cells</i> )
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HepesBSS	<i>Hepes Buffered Salt Solution</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High Pressure Liquid Chromatographie</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HUVEC	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitorprotein $\kappa$ B $\alpha$
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 ( <i>intracellular adhesion molecule-1</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NOS
KHK	Koronare Herzkrankheit
LA	Linolsäure ( <i>linoleic acid</i> )
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant bzw. chemotactic protein-1</i>
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
MUFA	Einfach ungesättigte Fettsäuren ( <i>monounsaturated fatty acids</i> )
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OA	Ölsäure ( <i>oleic acid</i> )
P	Irrtumswahrscheinlichkeit ( <i>probability</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Prostaglandin
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
POD	Peroxidase
PPAR	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor

PPRE .....	<i>PPAR response elements</i>
PUFA .....	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren ( <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
rev .....	<i>reverse</i>
RNA .....	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT-PCR .....	Reverse-Transkriptase-PCR
RXR .....	Retinsäure-X-Rezeptor
SD .....	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS .....	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SFA .....	Gesättigte Fettsäuren ( <i>saturated fatty acids</i> )
sPLA <sub>2</sub> .....	sekretorische PLA <sub>2</sub>
TMB .....	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$ .....	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNS .....	Trypsin-Neutralisierungslösung ( <i>trypsin neutralizing solution</i> )
TX .....	Thromboxan
U .....	<i>Unit</i>
VCAM-1 .....	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 ( <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> )
WHO .....	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )

# 1 Einleitung und Zielstellung

Konjugierte Linolsäure (CLA)-Isomere sind C18-Fettsäuren mit zwei Doppelbindungen, d. h. Isomere der Linolsäure (LA) mit aufeinander folgenden (konjugierten) und nicht isolierten Doppelbindungen. Die biologisch bedeutendsten Isomere sind die *cis*-9, *trans*-11 CLA und die *trans*-10, *cis*-12 CLA. *Cis*-9, *trans*-11 CLA, als so genannte »Pansensäure«, wird hauptsächlich aus Linolsäure (LA) im Pansen von Wiederkäuern während der mikrobiellen Biohydrierung durch das Pansenbakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* isomerisiert. In wesentlich geringerer Konzentration wird auch *trans*-10, *cis*-12 CLA bakteriell im Pansen gebildet. Ein Teil der CLA-Isomere wird absorbiert und ist daher in Milch und Milchprodukten sowie Fleisch und Wurstwaren von Wiederkäuern enthalten (FRITSCHKE u. STEINHART 1998; MCGUIRE et al. 1999; SUGANO et al. 1999; MARTIN u. VALEILLE 2002; MATHERS 2003).

In den letzten Jahren ist das Interesse für CLAs gewachsen. Diesen Fettsäuren werden physiologisch positive Eigenschaften, z. B. antikanzerogene, antiatherogene, antidiabetogene und antiadipogene Effekte, zugesprochen (HA et al. 1990; IP et al. 1991; PICH et al. 1993; LEE et al. 1994; LIEW et al. 1995; BELURY et al. 1996; BELURY u. VANDEN HEUVEL 1997; CHEW et al. 1997; NICOLSI et al. 1997; SUGANO et al. 1997; CESANO et al. 1998; HOUSEKNECHT et al. 1998; PARK u. PARIZA 1998; SUGANO et al. 1998; DE DECKERE et al. 1999; IP et al. 1999a, b; BELURY 2002; YU et al. 2002; TOOMEY et al. 2003; CHENG et al. 2004).

Derzeit sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie koronare Herzkrankheit (KHK), Herzinfarkt, Schlaganfall, periphere Durchblutungsstörungen und Aneurysmen, die Haupttodesursachen in den Industrieländern. Diese Erkrankungen sind klinische Manifestationen der Atherosklerose (BIESALSKI u. GRIMM 1999; LEITZMANN et al. 2001; LIBBY 2002; MONACO u. PALEOLOG 2004). Das Atherosklerose-Risiko steht in enger Beziehung mit der Ernährungs- und Lebensweise der Menschen, wobei die Ernährung der wichtigste exogene Faktor ist. In den meisten westlichen Industrieländern ist eine hyperkalorische

und fettreiche Kost mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren üblich, die entscheidend zur Entstehung der Risikofaktoren Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, aber auch Bluthochdruck und Diabetes mellitus und somit zu hohen Herzinfarkttraten beiträgt (BIESALSKI u. GRIMM 1999; LEITZMANN et al. 2001).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass CLAs atherosklerotische Prozesse beeinflussen. In einigen tierexperimentellen Versuchen mit Ratten, Kaninchen, Hamstern und Mäusen wurde eine Verringerung von Plasma- oder Lipoprotein-Lipiden bzw. atherosklerotischen Plaques beobachtet (LEE et al. 1994; PICH et al. 1993; NICOLOSI et al. 1997; STANGL 2000a, b; SHER et al. 2003; TOOMEY et al. 2003). Wobei in Studien von LEE et al. (1994) und NICOLOSI et al. (1997) trotz verminderter Plasma- und Lipoproteine keine signifikante Verminderung der Fettstreifenbildung in der Aorta von Kaninchen und von Hamstern beobachtet wurde. Bei c57BL/6-Mäusen begünstigten CLAs sogar die Bildung von Läsionen in arteriellen Blutgefäßen (MUNDAY et al. 1999). Es gibt bisher nur wenige Studien über die Wirkung der CLAs auf atherogene Parameter in Blutgefäßzellen. Deshalb bildete die Untersuchung dieser Parameter die Grundlage für die Zielstellung der vorliegenden Arbeit.

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die Atherosklerose bzw. Arteriosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, die mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, von Blut und Blutbestandteilen, ferner mit Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergeht sowie mit Veränderungen der Media verbunden ist (BÖCKER et al. 2004; RIEDE et al. 2004). Die Intima ist die luminale Auskleidung der Arterien und Venen und besteht aus einem einschichtigen Endothel mit Basalmembran und subendotheliale Bindegewebe. Sie wird von der Media durch die *Membrana interna elastica* abgegrenzt (BENNINGHOFF u. DRENCKHAHN 2004). Die Endothelzellen der Intima und die glatten Muskelzellen der Media stehen in engem Kontakt. Das gesunde Endothel ist als dynamische Schnittstelle zwischen Gefäßwand und zirkulierendem Blut bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts der Gefäße durch die Produktion von Faktoren, die den Gefäßtonus, die Koagulation, die Zellproliferation, die Adhäsion und die Migration von Leukozyten regulieren, von zentraler Bedeutung (VOGEL et al. 1997; KUNSCH u. MEDFORD 1999; PRICE u. LOSCALZO 1999; TOBOREK u. KAISER 1999; PEARSON 2000; COEN et al. 2004). Wiederholte oder kontinuierliche Schädigungen des Endothels durch chemische, mechanische, immunologische oder toxische Einflüsse führen zu Dysfunktionen, unter

anderem zu einem funktionellen Ungleichgewicht zwischen vasoaktiven (gefäßerweiternd und -verengend) Substanzen, wie Eicosanoide, Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 (ET-1), und zu einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten (LEITZMANN et al. 2001; COEN et al. 2004). Die erhöhte Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten zum Ort der Endothelschädigung werden durch die Freisetzung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, deren Expressionen durch proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie den *nuclear factor-κB* (NF-κB) reguliert werden, vermittelt (PRICE u. LOSCALZO 1999; RICHTER et al. 1999; TOBOREK u. KAISER 1999; COEN et al. 2004; REITERER et al. 2004a, b).

Die Eicosanoide mit zwei Doppelbindungen, so genannte Eicosanoide der Serie 2, Prostaglandine (PG) wie PGI<sub>2</sub> (Prostacyclin), PGE<sub>2</sub> PGF<sub>2α</sub> und Thromboxane (TX) wie TXA<sub>2</sub>, sind an der Regulierung des Gefäßtonus beteiligt (TOBOREK u. KAISER 1999). Vor allem das Verhältnis zwischen dem Vasodilatator PGI<sub>2</sub> und dem Vasokonstriktor TXA<sub>2</sub> ist bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts von besonderer Bedeutung (BUNTING et al. 1983; OATES et al. 1988; LÖFFLER u. PETRIDES 1997). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass CLAs die Bildung von Eicosanoiden in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen reduzieren (LI u. WATKINS 1998; LIU u. BELURY 1998; KAVANAUGH et al. 1999; PARK et al. 2001; WIGHAM et al. 2001; COEN et al. 2004). Auch in Studien mit humanen Endothelzellen verminderten CLA-Isomere die Eicosanoid-Freisetzung konzentrations- und zeitabhängig (URQUHART et al. 2002; TORRES-DUARTE u. VANDERHOEK 2003). Ein Grund dafür ist die Reduzierung der Konzentration des Eicosanoid-Präkursors Arachidonsäure (AA) in den Membranphospholipiden durch die Behandlung von Zellen bzw. Fütterung von Tieren mit CLAs (OATES et al. 1988; BELURY u. KEMPA-STECZKO 1997; SUGANO et al. 1999; BANNI et al. 2001; PARK et al. 2001; URQUHART et al. 2002). Die AA wird durch Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) freigesetzt (TOBOREK u. KAISER 1999) und führt über den Cyclooxygenase-Weg (COX) der Enzyme COX-1 bzw. COX-2 in fast allen Körperzellen zur Bildung der Eicosanoide der Serie 2 (VOET u. VOET 1994; MIRALPEIX et al. 1997; CAMACHO et al. 1998; FORTH et al. 1998; MICHAL 1998; MARKS u. FÜRSTENBERGER 1999; URQUHART et al. 2001). Die reduzierte Aktivität der COX-1 bzw. eine Hemmung der COX-2-mRNA-Expression ist als eine mögliche Ursache für die verminderte Eicosanoidsynthese durch CLAs zu betrachten. So wurde in einigen Studien ein senkender Effekt der CLAs auf die Aktivität bzw. Genexpression der COX nachgewiesen

(BULGARELLA et al. 2001; IWAKIRI et al. 2002; YAMASAKI et al. 2002; YU et al. 2002). Jedoch fehlen bisher Untersuchungen zum Einfluss der CLAs auf die Aktivität des AA-freisetzenden Enzyms PLA<sub>2</sub> als limitierende Größe. Einen weiteren Aspekt bei der Reduzierung der Eicosanoide und der verminderten AA-Konzentration nimmt der Einfluss von CLA-Isomeren auf die Desaturierung der n-6-Fettsäuren ein. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zeigten, dass CLA-Isomere die Zusammensetzung der Lipide bzw. das Fettsäuremuster über eine veränderte Desaturaseaktivität beeinflussten (LIU u. BELURY 1997; BRETILLON et al. 1999; SUGANO et al. 1999; AGATHA et al. 2004). Aufgrund ihrer ähnlichen Struktur zur LA werden CLAs analog zu dieser n-6-Fettsäure metabolisiert, d. h. zu höher ungesättigten konjugierten Dien-Fettsäuren (CD) desaturiert und verlängert. Hierbei entstehen unter anderem konjugierte Octadecatriensäure (CD18:3), Eicosatriensäure (CD20:3) und Eicosatetraensäure (CD20:4), was in verschiedenen Untersuchungen am Tiermodell nachgewiesen wurde (SEBEDIO et al. 1997; BANNI et al. 1999a, b; SUGANO et al. 1999; BANNI et al. 2004). So konkurrieren vermutlich CLAs mit der LA als Substrat um die  $\Delta$ 5- und  $\Delta$ 6-Desaturasen und hemmen dadurch die Desaturierung der n-6-Fettsäure zu AA in den Phospholipiden (BANNI et al. 1999a; SUGANO et al. 1999). Weiterhin wiesen PARK et al. (2005) nach, dass CLA-Metabolite wie CD20:2 und CD20:3 in Zellkultur ähnlich biologisch aktiv sind wie CLAs. CLA-Isomere werden wahrscheinlich auch durch peroxisomale  $\beta$ -Oxidation zu CD-Fettsäuren wie CD12:2, CD14:2 und CD16:2 verkürzt (BANNI et al. 1999a, 2004; PARK et al. 2005). Bisher gibt es jedoch keine Studien über den Einfluss der CLAs auf die  $\Delta$ 5- und  $\Delta$ 6-Desaturierung und die Bildung von CLA-Metaboliten in arteriellen Endothelzellen.

Ein weiterer Vasodilatator, dem bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts im Endothel eine sehr bedeutende Rolle zukommt, ist das NO. Es wird durch NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet (FORTH et al. 1998; TOBOREK u. KAISER 1999; VASSALLE et al. 2003). Wie in Untersuchungen an Zellkultur- und Tiermodellen nachgewiesen wurde, hemmten CLAs die Expression der induzierbaren NOS (iNOS) und die Produktion von NO (IWAKIRI et al. 2002; YU et al. 2002; CHENG et al. 2004; SHEN et al. 2004; CORINO et al. 2005). Die Behandlung von murinen Makrophagen mit *cis*-9, *trans*-11 CLA führte hingegen zu einer erhöhten mRNA-Konzentration der iNOS (WANG et al. 2004). Keinen Einfluss hatten die CLAs auf die Freisetzung des

Nitrits als Indikator für NO und auf die Enzymaktivität der endothelialen NOS (eNOS) in bovinen Endothelzellen der Aorta (COEN et al. 2004).

Trotz zahlreicher Studien fehlen bislang systematische Untersuchungen zur Wirkung von CLAs auf die Eicosanoid- und die NO-Synthese in humanen arteriellen Endothelzellen. Der Einfluss von CLA-Isomeren auf das ET-1 wurde bisher nicht untersucht. Deshalb nahm die Untersuchung zur Wirkung der CLAs auf die genannten vasoaktiven Substanzen einen wichtigen Teilkomplex der vorliegenden Arbeit ein.

Die Schädigung des Endothels bedingt während der frühen Phase der Atherogenese die verstärkte Bildung der Adhäsionsmoleküle *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1) und E-Selektin, die Freisetzung der Chemokine *monocyte chemoattractant* bzw. *chemotactic protein-1* (MCP-1) und Interleukin (IL)-8 und die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen (DAVIES et al. 1993; PRICE u. LOSCALZO 1999; LUSIS 2000; CHEN et al. 2002; LI u. GLASS 2002; LIBBY 2002; BLANKENBERG et al. 2003; LIU et al. 2004; YANG et al. 2004). Erste Hinweise über eine mögliche antiatherogene Schutzwirkung der CLAs auf die genannten Parameter in Endothelzellen geben FARQUHARSON et al. (1999). Die Autoren berichteten über eine verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle in CLA-behandelten humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC). In humanen Magenkrebszellen wurde durch die Behandlung mit *cis-9, trans-11* CLA eine schwächere Adhäsion an eine extrazelluläre Matrix über die Reduzierung der Proteinexpression von VCAM-1 und ICAM-1 beobachtet (CHEN et al. 2004). Die mRNA-Konzentration des IL-8 war in humanen Epithelzellen der Bronchien durch die Behandlung mit *cis-9, trans-11* CLA vermindert (JAUDSZUS et al. 2005). Die Inkubation von Adipozyten mit *trans-10, cis-12* CLA führte hingegen zu einer Hypersekretion des IL-8 (BROWN et al. 2004). Die Effekte der CLAs auf proatherogene Prozesse wie die Freisetzung der Chemokine und die Expression der Adhäsionsmoleküle sind durch eine veränderte Vermittlung des NF- $\kappa$ B-Signalweges erklärbar (SONG et al. 2002a; BANNI et al. 2003; CHENG et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass CLAs ihre inhibierende Wirkung auf NF- $\kappa$ B-vermittelte Entzündungsreaktionen auch über die Aktivierung des Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR)  $\gamma$  entfalten. In Versuchen mit Mäusen und mit verschiedenen Zellmodellen, wie z.B. Makrophagen und Adipozyten, wurde eine Aktivierung des PPAR $\gamma$  durch CLAs nachgewiesen (CHOI et al. 2000; KOHNO et al.

2001; CLEMENT et al. 2002; YU et al. 2002; TOOMEY et al. 2003; CHANGHUA et al. 2005; WARGENT et al. 2005). In anderen Studien mit Makrophagen und Adipozyten wurden hingegen keine bzw. negative Effekte der CLAs auf die Aktivierung des PPAR $\gamma$  beobachtet (WELDON et al. 2004; BRANDENBOURG u. HU 2005; GARLUND et al. 2005).

Bislang gibt es jedoch keine systematischen Untersuchungen zum Einfluss der CLAs auf die Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$  und NF- $\kappa$ B sowie die Freisetzung von Chemokinen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Leukozytenadhäsion in humanen Endothelzellen. Deshalb bildete die Untersuchung zur Wirkung der CLAs auf diese proinflammatorischen Parameter einen weiteren Teilkomplex der Zielstellung der vorliegenden Arbeit.

Mehrere Studien untersuchten bereits den Einfluss der LA auf die genannten inflammatorischen Parameter in Endothelzellen. Dabei wurde beobachtet, dass diese Fettsäure in der Lage ist, die Expression der Chemokine und der Adhäsionsmoleküle sowie die Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen zu beeinflussen (PARK et al. 2001; TOBOREK et al. 2002; CHEN et al. 2003; REISSIG et al. 2003; REITERER et al. 2004b; SARASWATHI et al. 2004). Aufgrund dieser Befunde wurde die LA in diesem Teilkomplex neben den beiden CLA-Isomeren als Referenzsubstanz mitgeführt.

Obwohl *in vivo*-Studien eine Beziehung zwischen der CLA-Aufnahme und der Entstehung der Atherosklerose aufzeigen, ist bisher wenig über die Mechanismen, über die die natürlich vorkommenden CLA-Isomere auf atheroskleroserelevante Parameter im Endothel wirken, bekannt.

Aus den vorangegangenen Ausführungen ergab sich die Zielstellung der vorliegenden Arbeit:

Untersuchung des Einflusses der CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf atheroskleroserelevante Parameter in humanen arteriellen Endothelzellen.

Aus der Zielstellung wurden die beiden folgenden Teilfragen formuliert:

1. Wie beeinflussen die zwei CLA-Isomere die Bildung der vasoaktiven Substanzen Eicosanoide der Serie 2, NO und ET-1 in humanen arteriellen Endothelzellen?

Im Einzelnen sollten dabei folgende Parameter untersucht werden:

- Inkorporierung der CLA-Isomere in Abhängigkeit von der Konzentration in die Gesamtlipide und die Membranphospholipide Phosphatidylethanolamin (PE) und -cholin (PC)
  - Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide und der Phospholipide unter besonderer Berücksichtigung der LA und der AA (als Ausgangssubstanz für die Eicosanoidsynthese)
  - Ermittlung von CD-Fettsäuren als Metabolite der CLA-Isomere in den Gesamtlipiden
  - Aktivität bzw. Genexpression der für die Eicosanoidsynthese relevanten Enzyme  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Desaturase, sekretorische PLA<sub>2</sub>, COX-1 und COX-2
  - Freisetzung der Eicosanoide PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$</sub>
  - Freisetzung des NO und Genexpression des für die NO-Bildung relevanten Enzyms eNOS
  - Freisetzung des ET-1
2. Welchen Einfluss haben die beiden CLA-Isomere bzw. die LA, als Referenzsubstanz, auf proinflammatorische Parameter der frühen Entstehungsphase der Atherosklerose in humanen Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-stimulierten arteriellen Endothelzellen?

Im Einzelnen sollten dabei folgende Parameter untersucht werden:

- Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin
- Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8
- Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen
- Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und PPAR $\gamma$

Für die Durchführung der Inkubationsversuche wurden entsprechend der Zielstellung humane Endothelzellen der Aorta als Zellmodell gewählt.

## 2 Methoden und Material

### 2.1 Kultivierung der humanen Endothelzellen der Aorta (HAoEC)

Die humanen Endothelzellen der Aorta einer 28 Jahre alten Spenderin (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurden in endothelialelem Wachstumsmedium bei 37°C, einer Atmosphäre von 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Subkultivierung der HAoEC erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Die konfluenten Zellen wurden einmal mit *Hepes Buffered Salt Solution* (HepesBSS) gewaschen und zum Ablösen mit Trypsin-EDTA für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von TNS die zytotoxische Wirkung des Trypsins inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Die Kulturflasche wurde mit Medium nachgespült, um Zellverluste gering zu halten. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur und 900 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert. Es erfolgte eine Zellzählung, bei der die Zellsuspension in 0,9 %igem NaCl im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde. Aus der Verdünnung wurden 10 µl entnommen und in einer Neubauer-Zellzählkammer (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) mit vier großen Quadraten pipettiert. Die Zellen wurden pro Quadrat unter einem Lichtmikroskop gezählt und der Mittelwert aus den Zellzahlen der vier Quadrate gebildet. Die Gesamtzellzahl wurde durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 10<sup>4</sup> (Zellzahl pro ml) und dem Verdünnungsfaktor (1:10) sowie dem Suspensionvolumen ermittelt.

Zellen der 3. bis 8. Passage wurden für die Versuche verwendet. Für die nachfolgenden Versuche wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (750 000 Zellen/15 ml), 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (250 000 Zellen/5 ml), 24 Well Zellkultur-Mikroplatten (30 000 Zellen/ml) bzw. 96 Well Zellkultur-Mikroplatten (3 200 Zellen/0,25 ml) ausgesät.

## 2.2 Konjugierte Linolsäure (CLA)- und Linolsäure-Lösungen

Die CLA-Isomere (*cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA) von Cayman Chemical und die LA von Sigma-Aldrich wurden als Stammlösungen mit einem Molekulargewicht von je 100 mmol/l in absolutem Ethanol (> 99,9 %) aufbewahrt. Für die Inkubationsversuche der Zellen wurden definierte Mengen der jeweiligen Stammlösung von *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA bzw. LA entnommen und mit Stickstoff eingengt. Die Fettsäuren wurden durch Zugabe einer äquimolaren Menge an NaOH (0,01 N) in ihre Salze überführt, das heißt in eine mediumlösliche Form gebracht und mit gleicher Menge Reinstwasser gelöst.

## 2.3 Untersuchungen zum Einfluss von *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf die Bildung vasoaktiver Substanzen in HAoEC

### 2.3.1 Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>- bzw. 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät. Bei einer Konfluenz (Zelldichte) von 80–90 % wurden die Zellen 24 h mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA (siehe Kapitel 2.2) inkubiert.

Um eine Endkonzentration von 5 bzw. 50 µmol/l CLA pro Kulturflasche mit HAoEC zu erreichen, wurde das Kulturmedium entfernt und frisches Medium ohne (Kontrolle) bzw. mit der jeweiligen CLA-Lösung hinzu gegeben.

### 2.3.2 Aufarbeitung der Zellen

Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und gesammelt, die Zellen abgelöst (siehe Kapitel 2.1 auf der vorherigen Seite), zentrifugiert und mit HBSS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) aufgenommen und gezählt. Die HAoEC wurden auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml HBSS eingestellt und für 1 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5 000 U/min für 3 min zentrifugiert, der Überstand

wurde abgenommen und gesammelt. Überstände (Medium bzw. HBSS) und Zellpellets wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zu den Analysen gelagert.

### 2.3.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau

Um die Zellzahl (Zelldichte) und die Vitalität (Lebensfähigkeit) der Zellen nach der CLA-Behandlung zu bestimmen, wurden  $50\text{ }\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:10 mit 0,9%igem NaCl und unter Zugabe von Trypanblau verdünnt. Trypanblau konnte in defekte bzw. tote Zellen eindringen und diese blau färben. Durch Auszählen der Gesamtzellzahl und der blauen bzw. toten Zellen wurde der prozentuale Anteil der lebenden Zellen berechnet.

### 2.3.4 Proteinbestimmung

Neben der Zellzahl wurde als weitere Größe für die Zelldichte der Proteingehalt der Zellen nach der Methode von BRADFORD (1976) gemessen. Die gesammelten Zellpellets wurden mit 0,2 N NaOH über Nacht lysiert. Mit 1 mg bovinem Serumalbumin (BSA) pro 1 ml 0,2 N NaOH wurde eine Standardreihe ( $10\text{--}120\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) hergestellt. Die Proben sowie die Standardreihe wurden auf eine 96 Well Mikroplatte aufgetragen. Die Zugabe eines 1:5-verdünnten Protein Assay Farbstoff-Konzentrates führte aufgrund einer Proteinbindung der Probe mit dem Farbstoff zu einer Blaufärbung. Die Absorption wurde nach 5 min bei 595 nm im Plattenreader SpectroFluor Plus von TECAN gemessen.

Über die Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ wurde eine Standardkurve berechnet, die zur Ermittlung der Proteingehalte der Zellen verwendet wurde [ $\mu\text{g/ml}$ ].

### 2.3.5 Morphologie

Unmittelbar nach der 24 h-Inkubation mit den CLA-Isomeren wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop bei einer 40fachen Vergrößerung fotografiert.

### 2.3.6 Bestimmung des Fettsäuremusters in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen Phosphatidylethanolamin (PE) und -cholin (PC)

#### 2.3.6.1 Extraktion von Gesamtlipiden

Die Gesamtlipide der Zellpellets bzw. Zellen wurden nach der Methode von [HARA u. RADIN \(1978\)](#), modifiziert nach [EDER u. KIRCHGESSNER \(1994\)](#), extrahiert.

Für die Extraktion wurden 1 ml Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) zu jedem Zellpellet hinzugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei 4°C und 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das Extrakt wurde vorsichtig abgenommen, gesammelt und unter Stickstoff eingengt.

#### 2.3.6.2 Trennung der Lipidfraktionen

Um aus den Lipiden die Phospholipidfraktionen PE und PC zu erhalten, wurden die getrockneten Lipidextrakte mit der Festphasenextraktion nach der modifizierten Methode von [SUZUKI et al. \(1997\)](#) getrennt.

Die unpolare Fraktion der getrockneten Lipide wurde mit 0,2 ml Aceton extrahiert. Das Aceton wurde unter Stickstoff verdampft. Die unpolare Fraktion wurde in 0,2 ml n-Hexan:Isopropanol (4:1 v/v) gelöst und auf eine SI-Phasen Säule gegeben und vier mal mit 2 ml n-Hexan:Isopropanol (4:1 v/v) eluiert. Die polare Fraktion der getrockneten Lipide wurde mit 0,2 ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) extrahiert und auf SI-Phasen-Säule gegeben. PE wurde mit vier mal 2 ml Chloroform:Methanol (2:1 v/v) und PC wurde mit vier mal 2 ml Methanol eluiert. Die Eluate der Phospholipidfraktionen wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in n-Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) aufgenommen. Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden die Eluate auf eine mit Kieselgel beschichtete Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniak verwendet. Die Platte wurde nach der Trocknung in einer Jodkammer gefärbt, wobei die einzelnen Phospholipidfraktionen PE und PC sichtbar wurden. Die Eluate der Fraktionen wurden unter Stickstoff eingengt.

### 2.3.6.3 Analyse des Fettsäuremusters

Die Gesamtlipide und die Phospholipidfraktionen wurden nach der Methode von BUTTE (1983) mit Trimethylsulfoniumhydroxid verestert. Die Fettsäuremethylester (FAME) wurden gaschromatographisch (GC, HP 5890; Hewlett Packard, Waldbronn) mit automatischem Injektionssystem durch polare FFAP-Fused-Silicia Trennsäule (30 m×0,53 mm ID×1,0 µm, Macherey und Nagel, Düren) im Heliumstrom (Flussrate: 7,1 ml/min) getrennt. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor.

Die FAME wurden über den Vergleich der Retentionszeiten mit den individuellen reinen Standards identifiziert und deren Konzentrationen auf die Summe der Konzentrationen der enthaltenen Fettsäuren bezogen [g/100 g].

### 2.3.7 Bestimmung konjugierter Dien-Fettsäuren in den Gesamtlipiden

Für die Bestimmung der CD-Fettsäuren wurden die Zellen wie in Kapitel 2.3.1 auf Seite 9 beschrieben ausgesät und behandelt.

Nach der 24 h-Inkubation mit den CLA-Isomeren wurde das Medium abgenommen und gesammelt, die Zellen abgelöst (siehe Kapitel 2.1 auf Seite 8), zentrifugiert und gezählt. Die Zellen und das gesammelte Medium wurden zur Weiterbearbeitung und Analyse an die Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, geschickt. Die Analysen wurden von der Arbeitsgruppe Fette und Fettbegleitstoffe von Herrn Prof. H. Steinhart durchgeführt.

Die Zellen und die Überstände wurden lyophilisiert und nach der Methode von BLIGH u. DYER (1959) extrahiert. Die Lipidextrakte wurden in FAME überführt und mittels Silberionen-HPLC Diodenarray-Detektion auf Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen untersucht.

### 2.3.8 Die Bestimmung der Freisetzung der Eicosanoide PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub>

Die Eicosanoidmengen wurden im HBSS-Überstand (siehe Kapitel 2.3.2 auf Seite 9) gemessen. Für die Bestimmung der Eicosanoide PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> wurden

EIA-Kits von Cayman Chemical verwendet. Dabei wurden für das instabile  $\text{PGI}_2$  dessen stabiles Derivat 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$  und für das instabile Thromboxan  $\text{A}_2$  dessen stabiles Derivat  $\text{TXB}_2$  bestimmt.

Die Analysen wurden nach Anleitung der Kits durchgeführt. Die Kits basierten auf einer kompetitiven Methodik, das heißt die mit einem Enzym (Acetylcholinesterase) markierten Eicosanoide (Tracer) des Kits konkurrierten mit den unmarkierten Eicosanoiden der Probe um eine begrenzte Zahl an Eicosanoid-spezifischen Bindungsstellen des Kaninchen-Antiserums. Der entstandene Kaninchen-Antiserum-Eicosanoid-Komplex band an das monoklonale Maus Anti-Kaninchen Immunglobulin G (IgG) (für 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{TXB}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) bzw. an das polyklonale Ziegen Anti-Maus IgG (für  $\text{PGE}_2$ ) auf dem beschichteten Boden einer 96 Well Mikroplatte. Die mit Kaninchen-Antiserum-Eicosanoid-Komplexen behandelte 96 Well Mikroplatte wurde nach 18 h Inkubation bei Raumtemperatur (für  $\text{TXA}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) bzw.  $4^\circ\text{C}$  (für 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$ ) gewaschen, um ungebundene Reagenzien zu entfernen. Die Zugabe der Ellman's Reagenz, die sich aus Acetylthiocholin und 5,5-Dithiobis-[2-nitrobenzoesäure] (DNTB) zusammensetzte, bewirkte eine Hydrolyse des Acetylthiocholins durch die Acetylcholinesterase (AChE) des Tracers. Das entstandene Thiocholin reagierte unter Spaltung des DNTB zu einem gemischten Disulfid (RICHTER 2003). Die freie 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure zeichnet sich durch eine deutliche Gelbfärbung aus. Die Intensität der Farbe, die spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm im Plattenreader von TECAN gemessen wurde, verhielt sich proportional zur Menge der gebundenen Eicosanoide des Tracers und umgekehrt proportional zur Menge der gebundenen Eicosanoide der Probe. Die Messwerte, nach Abzug des Leerwertes, wurden prozentual zur maximalen Bindung der enzymmarkierten Eicosanoide des Tracers ins Verhältnis gesetzt (Formel 2.1).

$$\%B/B_0 = \frac{(x - NSB)}{(B_0 - NSB)} \times 100 \% \quad (2.1)$$

$\%B/B_0$	Bindung des Standards bzw. der Probe
$B_0$	Leerwert-korrigierter Messwert des Bindungsmaximums
$x$	Leerwert-korrigierter Messwert der Probe bzw. des Standards
$NSB$	Leerwert-korrigierter Messwert der nicht-spezifischen Bindung

Mit Hilfe des Standards und der Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ wurde eine Standardkurve erstellt, um die Mengen der Eicosanoide im HBSS-Überstand [pg/ml] zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden durch ihre Molekulargewichte dividiert und auf eine Million Zellen [fmol/10<sup>6</sup> Zellen] bezogen.

### 2.3.9 Aktivitätsmessung der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub>

Im HBSS-Überstand (siehe Kapitel 2.3.2 auf Seite 9) wurde die Aktivität der sekretorischen PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) mit einem Test-Kit von Cayman Chemical gemessen.

Die Analysen wurden nach Anleitung des Kits durchgeführt. Der Test basierte auf der Hydrolyse eines Phospholipids an der sn-2-Position (am C-Atom 2 des Glycerins), katalysiert durch die sPLA<sub>2</sub>, unter Entstehung einer freien Fettsäure und eines Lyso-phospholipids. Das eingesetzte Substrat Diheptanoyl Thio-Phosphatidylcholin wurde an der sn-2-Position durch sPLA<sub>2</sub> der Probe hydrolysiert, an die sich unter Spaltung des DTNB ein freies Thiol anlagerte. Während das andere freie Thiol des DNTB, wie in Kapitel 2.3.8 auf Seite 12 beschrieben, chromogen wirkt. Die Absorptionsänderung wurde in Intervallen von 10 min innerhalb 1 h bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Die Umsetzungsrate des Substrates bzw. die Aktivität der sPLA<sub>2</sub> im HBSS-Überstand wurde mit folgenden Formeln 2.2 bis 2.4 auf dieser Seite berechnet:

$$\Delta A = \frac{A(t_1) - A(t_2)}{t_1 - t_2} \quad (2.2)$$

$$A/min = \Delta A(\text{Probe}) - \Delta A(\text{Leerwert}) \quad (2.3)$$

$$sPLA_2\text{-Aktivität} = \frac{\Delta A/min}{10,035 Mm^{-1}} \times \frac{V_G}{V_P} \quad (2.4)$$

$A$	Absorption
$t$	Zeitpunkt der Messung [min]
$V_G$	Gesamtvolumen pro Kavität [ml]
$V_P$	Probenvolumen [ml]
$10,035 Mm^{-1}$	Extinktionskoeffizient für DNTB bei 405 nm (für 0,784 cm Schichtdicke der Kavität)

Die Aktivität der sPLA<sub>2</sub> wurde auf eine Million Zellen bezogen [pmol/min/10<sup>6</sup> Zellen].

### 2.3.10 Bestimmung der Freisetzung des NO

Im HBSS-Überstand (siehe Kapitel 2.3.2 auf Seite 9) wurde die Freisetzung des NO mit einem Test-Kit von Cayman Chemical gemessen. Dabei wurden für das instabile NO die Mengen der stabilen Formen Nitrat und Nitrit bestimmt.

Die Analysen wurden nach Anleitung des Kits durchgeführt. Dem Test liegt die etablierte Griess-Reaktion zugrunde, welche aus zwei Hauptschritten besteht. Zuerst wurde das Nitrat in dem HBSS-Überstand durch Nitrit-Reduktase zu Nitrit umgesetzt. Im zweiten Schritt reagierte Nitrit nach Zugabe der Reagenzien Griess 1 (Sulfanilamid) und Griess 2 (N-(1-Naphtyl)ethylendiamin) zu einem Azoprodukt, dessen Absorption nach 10 min Farbentwicklung bei einer Wellenlänge von 540 nm im Plattenreader von TECAN gemessen wurde (GREEN et al. 1982).

Mit Hilfe eines Nitratstandards (0–10 µmol/l) und der Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ konnte eine Standardkurve erstellt werden, um die Nitrat- und Nitritmengen im Überstand [nmol/ml] zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden auf eine Million Zellen bezogen [nmol/10<sup>6</sup> Zellen].

### 2.3.11 Bestimmung der relativen mRNA-Konzentrationen der Enzyme $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ -Desaturase, sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub>, Cyclooxygenase-1, -2 und endotheliale NO-Synthase

Die relativen mRNA-Konzentrationen der zu untersuchenden Enzyme wurden mit der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt. Dabei wurde zunächst die Gesamt-RNA der Zellen mit der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

### 2.3.11.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA der HAoEC wurde mit TRIzol<sup>®</sup> Reagenz nach Anleitung für Kulturzellen isoliert.

Die Zellpellets bzw. die Zellen (siehe Kapitel 2.3.2 auf Seite 9) wurden mit TRIzol<sup>®</sup> Reagenz versetzt und nach Zugabe von Chloroform bei 13 000 U/min für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der Gesamt-RNA wurde abgenommen und mit Isopropanol gemischt. Das RNA-Pellet wurde mit 75 %igen Ethanol gewaschen und anschließend in 25 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gelöst.

Die Ausbeute der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Formel 2.5). Die Reinheit der isolierten RNA wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm überprüft. Die RNA wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

$$RNA[\mu g/ml] = A_{260nm} \times 40 \times V \quad (2.5)$$

$A_{260nm}$	Absorption bei 260 nm
40	Multiplikationsfaktor ( $A_{260nm}=1$ bei RNA von 40 µg/ml)
V	Verdünnungsfaktor (V=100)

### 2.3.11.2 cDNA-Synthese

Die Ein-Strang cDNA-Synthese wurde nach Anleitung der verwendeten reversen Transkriptase von MBI Fermentas GmbH durchgeführt. Die RNA wurde entsprechend der berechneten Konzentration anhand der Absorptionen bei 260 nm mit DEPC-Wasser verdünnt (2 µg RNA/5 µl). Die verdünnte RNA wurde mit Oligo-(dT)<sub>18</sub> Primer, RevertAid<sup>™</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase in Reaktionspuffer von MBI Fermentas GmbH, dNTP-Mix von GeneCraft und DEPC-Wasser auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler bei 42°C für 1 h. Anschließend

wurde die Reaktion bei 70 °C für 10 min abgestoppt (Inaktivierung der reversen Transkriptase). Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Durchführung der PCR bei –20 °C gelagert.

### 2.3.11.3 RT-PCR

Die PCR basiert auf der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA, an deren Randbereichen des zu amplifizierenden Bereiches spezifische Oligonukleotide anlagern (*Annealing*). Durch eine thermostabile DNA-Polymerase werden die Oligonukleotide verlängert (Elongation) bis die Reaktion unterbrochen wird. Dieser Vorgang der Denaturierung, des *Annealing* und der Elongation wird so lange zyklisch wiederholt bis das gewünschte DNA-Fragment vervielfacht ist (MÜLLER 2001).

#### a. Real-time RT-PCR

Bei der real-time RT-PCR wird die Quantität der amplifizierten Matrizen direkt durch den Einsatz von fluoreszierenden Molekülen, die an sequenzspezifische Oligonukleotide endständig gekoppelt werden, gemessen (MÜLLER 2001).

**Δ5-Desaturase, Δ6-Desaturase, eNOS und COX-1:** Die mRNA-Konzentrationen für die Δ5-Desaturase, die Δ6-Desaturase, die eNOS, die COX-1 und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), als Referenzgen, der HAoEC wurden mit real-time RT-PCR im MJ Research Opticon bestimmt. Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich wie folgt nach Standardprotokoll zusammen:

Reagenzien:	in 15 µl Reaktionsansatz:
DEPC-Wasser	4 µl
Brillant <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green QPCR Master Mix	7,5 µl (1 x mit 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Primermix	1,5 µl (10 pmol/l)
cDNA	2 µl (0,096 µg)

Nach der 10-minütigen Initialisierungsphase bei 95 °C wurden in 30–35 Zyklen die Amplifikation mit der Denaturierung für 30 s bei 95 °C, dem *Annealing* für 30 s bei der dem eingesetzten Primer entsprechenden Temperatur (Tab. 2.1 auf der nächsten Seite)

und der Elongation der cDNA für 1 min bei 72°C durchgeführt. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen.

**Tab. 2.1:** Verwendete Primer<sup>1</sup> für die real-time RT-PCR im MJ Research Opticon

Enzym	PCR Primer	Temperatur	bp
GAPDH (human)	(fwd) 5' - GACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'	60°C	453
	(rev) 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3'		
COX-1 (human)	(fwd) 5' - CAGCTCCTGGCCCGCCGCTT - 3'	65°C	299
	(rev) 5' - GTGCATCAACACAGGCGCCTC - 3'		
Δ5-Desaturase (human)	(fwd) 5' - ACGTCCGCTTCTTCCTCACTTATG - 3'	60°C	448
	(rev) 5' - GGGGCTTGGACTGGTACTCTATGC - 3'		
Δ6-Desaturase (human)	(fwd) 5' - CCTACAATCACCAGCAGAA - 3'	60°C	460
	(rev) 5' - CCATGCTTGGCACATAGAGA - 3'		
eNOS (human)	(fwd) 5' - CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT - 3'	55°C	354
	(rev) 5' - GTCTCGGAGCCATACAGGATT - 3'		

<sup>1</sup>forward (fwd) und reverse (rev)

**sPLA<sub>2</sub>:** Die mRNA-Konzentrationen für die sPLA<sub>2</sub> der HAoEC wurden mit real-time RT-PCR im RotorGene 2000 system bestimmt. Der Reaktionsansatz für die PCR mit dem 10×Puffer, dem MgCl<sub>2</sub>, der Taq Polymerase von Promega und dem dNTP-Mix von Roth setzte sich wie folgt nach Standardprotokoll zusammen:

Reagenzien:	in 15 µl Reaktionsansatz:
DEPC-Wasser	6,087 µl
10×Puffer	1,5 µl (1 x)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,1 µl (3,5 mM)
dNTP-Mix (10 mM)	0,75 µl (0,125 mM pro dNTP)
Primermix	2 µl (10 pmol/l)
10×SYBR <sup>®</sup> Green I	0,375 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,188 µl (0,0625 U/µl)
cDNA	2 µl (0,2 µg)

Nach der 120-Sekunden Initialisierungsphase bei 95 °C wurden in 40–50 Zyklen (für sPLA<sub>2</sub>) bzw. 30–35 Zyklen (für GAPDH) die Amplifikation mit der Denaturierung für 20 s bei 95 °C, dem *Annealing* für 30 s bei der dem eingesetzten Primer entsprechenden Temperatur (Tab. 2.2) und der Elongation der cDNA für 40 s bei 72 °C durchgeführt. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen.

**Tab. 2.2:** Verwendete Primer für die real-time RT-PCR im RotorGene 2000

Enzyme	PCR Primer	Temperatur	bp
GAPDH (human)	(fwd) 5' - GACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'	60 °C	453
	(rev) 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3'		
sPLA <sub>2</sub> (human)	(fwd) 5' - CCAGGCCAAAGAGAACCCAGAG - 3'	59 °C	179
	(rev) 5' - GCCGCCCCAGCCGCAGTA - 3'		

Um die DNA-Fragmente der real-time RT-PCR zu identifizieren, wurden die PCR-Produkte mit Gelladepuffer gemischt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Mit Hilfe eines Leitemixes konnte die Größe (bp) der DNA-Fragmente bestimmt werden.

Die Ergebnisse wurden als Ratio des Ct-Wertes des spezifischen Zielgens zum Ct-Wert des Referenzgens (GAPDH) dargestellt.

Mit verdünnten cDNA-Proben wurde eine real-time RT-PCR durchgeführt und eine Standardreihe erstellt (Formel 2.6 auf der nächsten Seite). Der Anstieg  $m$  der Standardreihe diente als Grundlage für die Bestimmung der Effizienz der real-time RT-PCR, modifiziert nach PFAFFL (2001) (Formel 2.7 auf der nächsten Seite), die die Amplifikationsrate der cDNA darstellt.

Der Ratio des Ct-Wertes des spezifischen Zielgens und des Ct-Wertes der GAPDH bzw. die relative mRNA-Konzentration des Zielgens der HAoEC wurde mit den Formeln 2.8 bis 2.9 auf der nächsten Seite, modifiziert nach PFAFFL (2001), berechnet:

$$y = m \times \lg(x) + n \quad (2.6)$$

$$E = e^{(-1/m)} \quad (2.7)$$

$$\Delta Ct = Ct_{GAPDH} - Ct_{Zielgen} \quad (2.8)$$

$$Ratio = [E_{GAPDH} + E_{Zielgen}/2]^{\Delta Ct} \quad (2.9)$$

<i>m</i>	Steigung der Standardreihe
<i>E</i>	Effizienz des bestimmten Gens der real-time RT-PCR (optimal = 2)
<i>Ct</i>	Zyklusanzahl bis zum Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignals
<i>Ratio</i>	relative mRNA-Konzentration

Die Messwerte der behandelten Zellen wurden zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) ins Verhältnis gesetzt.

### b. Semiquantitative RT-PCR

**COX-2:** Die mRNA-Konzentrationen für die COX-2 und die GAPDH der HAoEC wurden mit semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Der Reaktionsansatz für die PCR mit dem MgCl<sub>2</sub>-Puffer und den dNTPs von GeneCraft setzte sich wie folgt nach Standardprotokoll zusammen:

Reagenzien:	in 20 µl Reaktionsansatz:
DEPC-Wasser	11,4 µl
10×MgCl <sub>2</sub> -Puffer	2 µl (1×Puffer mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTPs (100 mM)	0,4 µl (0,5 mM pro dNTP)
fwd Primer	2 µl (10 pmol/l)
rev Primer	2 µl (10 pmol/l)
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl (0,05 U/µl)
cDNA	2 µl (0,096 µg)

Die Amplifikation wurde in einem Mastercycler personal von Eppendorf durchgeführt. Der Initialisierungsphase von 10 min bei 95 °C folgte die Amplifikation von 30 Zyklen mit

der Denaturierung für 30 s bei 95 °C, dem *Annealing* für 30 s bei der dem eingesetzten Primer entsprechenden Temperatur (Tab. 2.3) und der Elongation der cDNA für 1 min bei 72 °C und dem finalen Extensionsschritt für 7 min bei 72 °C.

**Tab. 2.3:** Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR im Mastercycler personal von Eppendorf

Enzym	PCR Primer	Temperatur	bp
GAPDH (human)	(fwd) 5' - GACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'	60 °C	453
	(rev) 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3'		
COX-2 (human)	(fwd) 5' - ATGAGATTGTGGGAAAATTGCT - 3'	55 °C	300
	(rev) 5' - GATCATCTCTGCCTGAGTATC - 3'		

Nach der PCR wurden 10 µl des PCR-Reaktionsansatzes mit 2 µl Gelladepuffer gemischt und über ein 1,5%iges Agarosegel getrennt. Die Banden wurden in einen Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) mit Ethidiumbromid gefärbt, mit einer UV-Photoeinrichtung von SYNGENE identifiziert und deren Größe bestimmt. Die Größe der Bande der COX-2 wurde ins Verhältnis zur Größe der Bande der GAPDH gesetzt. Die Messwerte der behandelten Zellen wurden zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) relativiert.

### 2.3.12 Bestimmung der Freisetzung des Endothelin-1

Die ET-1-Freisetzung wurde im HBSS-Überstand (siehe Kapitel 2.3.2 auf Seite 9) gemessen. Für die Bestimmung des ET-1 wurde ein EIA-Kit von Cayman Chemical verwendet.

Die Analyse wurde nach Anleitung des Kits durchgeführt. Der verwendete Kit basierte auf einer Doppel-Antikörper »Sandwich«-Technik. Der HBSS-Überstand wurde auf 96 Well Mikroplatte, die mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen ET-1 beschichtet war, aufgetragen. Das ET-1 der Probe konnte an den Antikörper binden. Ein AChE-Fab'Konjugat, das selektiv an ein anderes Epitop des ET-1 bindet, wurde hinzugefügt. Diese zwei Antikörper formten eine Art »Sandwich« durch die Bindung an entgegengesetzte Seiten des Endothelinmoleküls. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Platte gewaschen und die Menge des ET-1 durch Messung der

Enzymaktivität der AChE bestimmt, indem Ellman's Reagenz (siehe Kapitel 2.3.8 auf Seite 12) zugegeben wurde. Das entstandene Produkt war gelb gefärbt und wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm im Plattenreader von TECAN gemessen. Die Intensität der Farbe verhielt sich direkt proportional zur Menge der gebundenen Konjugate, die mit der Menge des ET-1 korrelierte.

Mit Hilfe des Standards und der Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ wurde eine Standardkurve erstellt, um die Menge des ET-1 im HBSS-Überstand [pg/ml] zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden auf eine Million Zellen bezogen [pg/10<sup>6</sup> Zellen].

## **2.4 Untersuchungen zum Einfluss von *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA und Linolsäure auf proinflammatorische Parameter in TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC**

### **2.4.1 Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$**

Nach der 20 h-Behandlung ohne CLA und LA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA (siehe Kapitel 2.3.1 auf Seite 9) wurde ein Teil der HAoEC zusätzlich mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  für 4 h stimuliert, um bei den Zellen einen inflammatorischen Zustand hervorzurufen.

Für die Versuche wurde das Zytokin TNF $\alpha$  mit einer Ausgangskonzentration von 10  $\mu$ g in 1 ml PBS mit Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben, so dass eine Endkonzentration des Zytokins im gesamten Medium auf den Zellen von 2 ng/ml vorlag. Der unstimulierten Kontrolle wurde nur Medium zugegeben.

### **2.4.2 Bestimmung der Zellvitalität mit dem MTT-Test**

Um die Vitalität (Lebensfähigkeit) der Zellen in 96 Well Zellkultur-Mikroplatten zu bestimmen, wurde der MTT-Test nach MOSMANN (1983) und VISTICA et al. (1991) durchgeführt.

Konfluente Zellen wurden, wie in Kapitel 2.1 auf Seite 8 beschrieben, abgelöst 3 200 Zellen pro Vertiefung in 96 Well Zellkultur-Mikroplatten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80–90 % wurden die Zellen 24 h ohne (Kontrolle) oder mit den CLA-Isomeren bzw. der LA inkubiert. Dafür wurde das Kulturmedium entfernt und frisches Medium ohne bzw. mit der jeweiligen CLA-Lösung oder der LA-Lösung hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  der CLA-Isomere bzw. der LA zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurden die Zellen ohne bzw. mit 2 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  für 4 h stimuliert.

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde das Kulturmedium abgezogen und frisches Medium mit MTT (5 mg/ml PBS) zugefügt. Die Platte wurde 2,5 h bei 37°C inkubiert. Während der Inkubationszeit konnten die aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen der lebenden Zellen aus der gelben MTT-Lösung unlösliche violette Formazankristalle bilden. Nach einer deutlichen Kristallbildung wurde das MTT-Medium abgezogen und Isopropanol zugegeben, um die Kristalle zu lösen. Nach 10-minütigem Schütteln der Platte wurde die Absorption bei Wellenlänge von 595 nm im TECAN-Plattenreader gemessen.

Die Messwerte der behandelten Zellen wurden zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) ohne  $\text{TNF}\alpha$  ins Verhältnis gesetzt.

### 2.4.3 Proteinbestimmung

Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Zelldichte auf den Platten wurde die Proteinmenge der Zellen nach der Methode von BRADFORD (1976) gemessen. Dafür wurden Zellen in 96 Well Zellkultur-Mikroplatten ausgesät und behandelt (siehe Kapitel 2.4.2 auf der vorherigen Seite). Die Zellen wurden mit 0,2 N NaOH über Nacht lysiert und der Proteingehalt, wie bereits in Kapitel 2.3.4 auf Seite 10 beschrieben, durchgeführt.

Über die Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ wurde eine Standardkurve berechnet, die zur Ermittlung der Proteingehalte der Zellen verwendet wurden [ $\mu\text{g/ml}$ ].

#### 2.4.4 Bestimmung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin

Konfluente Zellen wurden wie in Kapitel 2.1 auf Seite 8 beschrieben abgelöst. Für die Bestimmung der Expression der Adhäsionsmoleküle wurden 3 200 Zellen pro Vertiefung in 96 Well Zellkultur-Mikroplatten ausgesät und wie in Kapitel 2.4.2 auf Seite 22 beschrieben behandelt.

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin der Endothelzellen wurden mit einem Zelloberflächen-ELISA, modifiziert nach ROTHLEIN *et al.* (1988) und nach LEMAIRE *et al.* (1998), bestimmt. Dieser ELISA beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der das Antigen das jeweils zu bestimmende Oberflächenmolekül darstellt und als Antikörper ein monoklonaler Antikörper gegen das jeweilige Adhäsionsmolekül verwendet wurde. Zunächst wurden die behandelten Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS für 5 min fixiert und danach für 1 h bei 37°C mit 2 % BSA in PBS inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde der entsprechende monoklonale Antikörper in 1 % BSA in PBS hinzugegeben, der spezifisch gegen das jeweilige Adhäsionsmolekül (anti-ICAM-1 1:500, anti-VCAM-1 1:300 bzw. anti-E-Selektin 1:250) war, und die Platte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit 1 % BSA in PBS wurde die Platte zusätzlich mit einer 1:10 000 Verdünnung eines sekundären monoklonalen anti-Maus-IgG in 1 % BSA in PBS, markiert mit Peroxidase (POD), für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde anschließend mit PBS gewaschen. Durch Zugabe des farblosen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurde eine Reaktion katalysiert, bei der dieses Substrat durch die POD zu einem blauen Produkt reagieren konnte. Um die Reaktion zu stoppen, wurde kommerzielle Stopp-Lösung hinzupipettiert. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes kam es zum Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption des gelb gefärbten Endprodukts wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im TECAN-Plattenreader gemessen.

Die Messwerte der behandelten Zellen wurden zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) mit TNF $\alpha$  ins Verhältnis gesetzt.

#### 2.4.5 Bestimmung der Freisetzung der Chemokine MCP-1 und Interleukin-8

Konfluente Zellen wurden, wie in Kapitel 2.1 auf Seite 8 beschrieben, abgelöst. Für die Bestimmung der Chemokinfreisetzung wurden 25 000 Zellen pro Vertiefung in 24 Well Zellkultur-Mikroplatten ausgesät und wie in Kapitel 2.4.2 auf Seite 22 beschrieben inkubiert und stimuliert. Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, gesammelt und bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Platten wurden für die Proteinbestimmung ebenfalls eingefroren.

Für die Bestimmung der Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8 im Medium-Überstand wurden kommerzielle Instant-ELISA-Kits von Bender MedSystems verwendet.

Die Analysen wurden nach Anleitung der Instant-ELISAs durchgeführt. Die verwendeten Instant-ELISAs basierten wie der ET-1-EIA-Kit auf der Doppel-Antikörper »Sandwich«-Technik, wie in Kapitel 2.3.12 auf Seite 21 beschrieben. Der Medium-Überstand wurde auf eine 96 Well Mikroplatte, die mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen das jeweilige Chemokin beschichtet war, aufgetragen. Das MCP-1 bzw. IL-8 der Probe konnte an den Antikörper binden. Ein Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugierter polyklonaler Antikörper, der selektiv an ein anderes Epitop des MCP-1 bzw. IL-8 bindet, wurde hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur wurde die Platte gewaschen, um ungebundene HRP-konjugierte monoklonale Antikörper zu entfernen. Es schloss sich nach dem Spülen mit Waschpuffer die Farbentwicklung mit dem TMB, wie in Kapitel 2.4.4 auf der vorherigen Seite beschrieben, an. Um die Reaktion zu stoppen, wurde 1 M Phosphorsäure hinzupipettiert. Die Absorption konnte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Die Intensität der Farbe verhielt sich direkt proportional zur Menge der gebundenen Konjugate, die mit der Menge des Chemokins korrelierte.

Mit Hilfe des Standards und der Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ wurde eine Standardkurve erstellt, um die Mengen der Chemokine im Medium-Überstand [pg/ml] zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden auf 1 mg Protein der Probe bezogen [ng/mg Protein].

#### 2.4.6 Bestimmung der Adhäsion der Monozyten U937 an die HAoEC

Konfluente Zellen wurden, wie bereits in Kapitel 2.1 auf Seite 8 beschrieben, abgelöst. Für die Bestimmung der Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen wurden 25 000 Zellen pro Vertiefung in 24 Well Zellkultur-Mikroplatten ausgesät und, wie bereits in Kapitel 2.4.2 auf Seite 22 beschrieben, behandelt.

Die Bestimmung der Adhäsion der Monozyten an die Endothelzellen wurde nach der Methode von VAPORCIYAN *et al.* (1993) bestimmt. Das Prinzip des Tests beruht auf der Interaktion bzw. der Adhäsion zwischen Monozyten und Endothelzellen, die unter inflammatorischen Bedingungen Oberflächenmoleküle ausbilden, die eine Anheftung der Monozyten ermöglichen.

In Vorbereitung auf die Adhäsionsmessung wurden Monozyten U937 von LGC Promochem (Wesel, Deutschland) mit 5  $\mu\text{mol/l}$  BCECF-AM in RPMI-1640 für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> markiert. Während der Inkubationszeit wurde die Esterbindung des nicht-fluoreszierenden BCECF-AM durch die intrazelluläre Esterase aufgespalten und es entstand das hoch-fluoreszierende BCECF, das von lebenden Monozyten aufgenommen werden konnte.

Die markierten Monozyten wurden mit 1% BSA in PBS gewaschen und anschließend in endotheliale Wachstumsmilieu bei einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/10 ml resuspendiert.

Nach der 24-stündigen Inkubationszeit wurde das Kulturmedium von den HAoEC abgezogen und die BCECF-markierten U937-Zellen ( $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Well) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die nicht-adhärenen Monozyten entfernt, die Endothelzellen mit 1% BSA in PBS gewaschen und anschließend mit Lysispuffer (50 mM Tris mit 0,1% SDS, pH 7,6) lysiert. Das Zelllysate wurde in eine 96 Well Mikroplatte für Fluoreszenzmessungen überführt und die Extinktion bei 495 nm sowie die Emission bei 535 nm gemessen.

Die Messwerte der behandelten Zellen wurden zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) mit TNF $\alpha$  ins Verhältnis gesetzt.

### 2.4.7 Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionfaktoren NF- $\kappa$ B und PPAR $\gamma$

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und PPAR $\gamma$  wurden im Nuklear-extrakt gemessen. Für die Gewinnung der Zellkernfraktion und die Bestimmung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren wurden kommerzielle Kits (Nuclear Extract Kit und TransAM™ Kits) von Active Motif verwendet.

Konfluente Zellen wurden, wie in Kapitel 2.1 auf Seite 8 beschrieben, abgelöst. Für die Bestimmung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren wurden 250 000 Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät und, wie in Kapitel 2.4.2 auf Seite 22 beschrieben, behandelt. Als Positivkontrolle für die Messung der PPAR $\gamma$ -Aktivität wurde je Versuch zusätzlich eine Kulturflasche mit 10  $\mu$ mol/l Troglitazon, ein synthetischer PPAR $\gamma$ -Ligand, behandelt.

#### 2.4.7.1 Nuklearextraktion

Nach der 24-stündigen Inkubation wurde die Zellkernextraktion der Zellen nach Anleitung des Kits durchgeführt.

Bei der Methode des Kits wurden auf einfachem Weg die Proteine des Zytoplasma und des Zellkern gewonnen. Zuerst wurden die Zellen in eiskaltem PBS mit Phosphatase-Inhibitoren gesammelt, um weitere Veränderungen der Proteine (Expression, Proteolyse, Dephosphorylierung etc.) zu begrenzen. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen in hypotonischem Puffer resuspendiert, damit die Zellmembranen anschwellen und brüchig werden konnten. Die Zugabe des Detergenten Nonidet P-40 führte zu einem Austreten der Zytoplasmaproteine in den Überstand. Nach dem Sammeln der Zytoplasmafraktion wurde der Zellkern lysiert und die Nuklearproteine im Lysispuffer mit Protease-Inhibitoren gelöst. Der Lysispuffer mit den Proteinen wurde zentrifugiert und der Überstand (Zellkernextrakt) wurde abgenommen. Die Zellkernextrakte wurden bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.4.7.2 Proteinbestimmung des Nuklearextrakts

Der Proteingehalt der Nuklearextrakte wurde mit der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt. Da einige Detergenzien zu Interferenzen bei der Proteinmessung führen konnten, wurde die Standardreihe mit BSA in einer 1:100-Verdünnung des Lysispuffers mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Zellkernfraktionen wurden ebenfalls mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Proteinbestimmung wurde, wie bereits in Kapitel 2.3.4 auf Seite 10 beschrieben, durchgeführt.

Über die Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ wurde eine Standardkurve berechnet, die zur Ermittlung der Proteingehalte der Zellkernextrakte verwendet wurde [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ].

#### 2.4.7.3 DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren p50 und p65 der NF- $\kappa$ B-Familie und PPAR $\gamma$

Die DNA-Bindungsaktivitäten der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und PPAR $\gamma$  wurden im Nuklearextrakt gemessen. Für die Bestimmung der Aktivität von PPAR $\gamma$  und von p50 und p65 der NF- $\kappa$ B-Familie wurden TransAM™ Kits (ELISA) von Active Motif verwendet.

Die Analysen wurden nach Anleitung der Kits durchgeführt. Grundlage der ELISAs war die Antigen-Antikörper-Reaktion, die spezifische Bindung eines zu bestimmenden Moleküls durch Antikörper. Die Kits enthielten eine 96 Well Mikroplatte, die mit einem immobilisierten Oligonukleotid mit entsprechender Promotorstelle beschichtet war. Eine definierte Proteinmenge Nuklearextrakt je Probe wurde auf die Platte aufgetragen und die aktive Form des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors konnte an das immobilisierte Oligonukleotid binden. Danach wurde die Platte mit dem primären Antikörper, der spezifisch gegen die aktive Form des gebundenen Transkriptionsfaktors der Probe gerichtet war, inkubiert. Die Zugabe eines HRP-konjugierten, sekundären Antikörpers ermöglichte über eine Farbentwicklung, wie in Kapitel 2.4.5 auf Seite 25 beschrieben, ein photometrisches Auslesen der Platte bei einer Wellenlänge von 450 nm im Plattenreader von TECAN.

Die Messwerte der behandelten Zellen wurden zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) mit  $\text{TNF}\alpha$  ins Verhältnis gesetzt.

## 2.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Studien sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde die Software MINITAB Release 13 für Windows (MINITAB Ltd., Coventry, UK) verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der einfaktoriellen (*one-way*) Varianzanalyse (ANOVA). Die Prüfung der signifikanten Unterschiede der Mittelwerte wurde mit dem Fisher-Test durchgeführt. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant voneinander verschieden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$ .

## 2.6 Geräte und Hilfsmittel

24 mm Transwell <sup>®</sup> mit 0,4 $\mu\text{m}$ Poren Polycarbonat Membran Insert, 6 Wells mit 6 Inserts	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
Cellstar <sup>®</sup> Gewebekulturflaschen, 25 $\text{cm}^2$ , steril, mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar <sup>®</sup> Gewebekulturflaschen, 75 $\text{cm}^2$ , steril, mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar <sup>®</sup> Zellkultur Mikroplatten, 24 Well, steril, mit Abdeckpl.	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar <sup>®</sup> Zellkultur Mikroplatten, 96 Well, F-Form, TC, steril, mit Abdeckpl.	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Elektrophoresekammer (für Agarosegele)	Owl Separation Systems, Inc., Portsmouth (NH), USA
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

---

FFAP fused Siliziumkapillarsäule (30 m × 0,53 mm i.d.)	Macharey und Nagel, Düren, Deutschland
Gaschromatograph HP 5890	Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland
GeneGenius Gel Documentation	Analysis systems SYNGENE, Cambridge, Großbritannien
HPTLC-Platten 5 cm×5 cm, Kieselgel 60	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Inkubator (Heraeus Heracell)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
PS-Mikroplatten, 96 Well, Kaminform, schwarz, transp. Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PS-Mikroplatten, 96 Well, F-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Göttingen, Deutschland
MJ Research Opticon™ system	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland
0,1 ml Tubes/4er Strips mit Deckel für RotorGene	-lft- Labortechnik GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
SpectroFluor Plus Plattenreader	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
RotorGene 2000 system	Corbett Research, Mortlake, Australien
SI-Phasen Säule, Supelclean™, LC-Si SPE-Tubes 3 ml	Supelco, Bellfonte (PA), USA
Sterilwerkbank (Heraeus Herasafe)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland

Thermocycler (Mastercycler <sup>®</sup> personal)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
UVStar <sup>®</sup> Mikroplatten, 96 Well, F-Form, TC, µClear <sup>®</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Waagen	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad Julabo Shake Temp SW 22	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach/Schwarzwald, Deutschland
Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0R)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland

## 2.7 Chemikalien und Lösungen

10×SYBR <sup>®</sup> Green I	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
100 bp-DNA-Leiter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
200 U RevertAid <sup>™</sup> M-MuLV Reverse Transcriptase in 5×Reaktionspuffer	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
5 U Taq Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

---

Agarose Serva Premium	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BCECF, AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein), B1170	Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Brillant SYBR <sup>®</sup> Green QPCR Master Mix	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA (> 96 %)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid) Hybri Max <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
dNTPs	GeneCraft, Münster, Deutschland
dNTP-Mix Roti <sup>®</sup> -Mix	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Endotheliales Zellwachstumsmedium MV mit SupplementMix	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland

---

Formaldehyd-Lösung 35 %	Heidinger Chemikalien-Lehrmittel, Stuttgart, Deutschland
Fötales Bovines Serum	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Gelladepuffer Roti <sup>®</sup> -Load DNA, (mit Saccharose) DNase-frei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Gibco <sup>®</sup> Gentamicin, 10 mg/ml, flüssig	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gibco <sup>®</sup> Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS); ohne Phenolrot	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gibco <sup>®</sup> RPMI 1640-Medium mit 25 mM HEPES Buffer, L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPESBSS	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hexan	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Linolsäure (99 %)	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
MTT	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
SDS (Natriumdodesulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

---

Stop Reagenz	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
TMB	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
TNF $\alpha$ , human, recombinant	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
TNS (Trypsin-Neutralisierungslösung)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA (> 98 %)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Tris, > 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
TRIzol <sup>®</sup> Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Troglitazon	Calbiochem/Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA 2	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Kits</b>	
6-keto Prostaglandin F <sub>1<math>\alpha</math></sub> EIA Kit (515211)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Endothelin-1 EIA Kit (583151)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
human IL-8 Instant ELISA (BMS204INST)	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich
human MCP-1 Instant ELISA (BMS281INST)	Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich

---

MinElute Gel Extraktion Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Nitrat/Nitrit Colorimetric Assay Kit (780001)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Nuclear Extract Kit (40010)	Active Motif, Rixensart, Belgien
Prostaglandin E <sub>2</sub> EIA Kit (514010)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Prostaglandin F <sub>2α</sub> EIA Kit (516011)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
sPLA <sub>2</sub> Assay Kit (765001)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Thromboxane B <sub>2</sub> EIA Kit (519031)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
TransAM™ NF-κB Family Kit (43296)	Active Motif, Rixensart, Belgien
TransAM™ PPAR <sub>γ</sub> Kit (47496)	Active Motif, Rixensart, Belgien
<b>Primer</b>	
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
fwd und rev Primer für COX-1, COX-2, Δ5- und Δ6-Desaturase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
fwd und rev Primer für eNOS	metabion GmbH Martinsried, Deutschland

fwd und rev Primer für GAPDH und sPLA<sub>2</sub>

Carl Roth GmbH  
Karlsruhe, Deutschland

### **Antikörper**

Anti-human E-Selektin

Bender MedSystems GmbH,  
Wien, Österreich

Anti-ICAM-1 (Anti-CD54, human (mouse))

Calbiochem/Merck,  
Darmstadt, Deutschland

Anti-mouse IgG mit POD

Calbiochem/Merck,  
Darmstadt, Deutschland

Anti-VCAM-1 (Anti-CD106, human (mouse))

Calbiochem/Merck,  
Darmstadt, Deutschland

### **Zusammensetzung der Puffer**

PBS

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> für 1l, pH 7,4

Agarose Gel

0,6 g Agarose, 30 ml 0,5×TBE

5×Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer

54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure,  
3,72 g EDTA für 1l

Lysispuffer (50 mM Tris mit 0,1 % SDS)

0,6057 g Tris und 0,1 g SDS für 100 ml,  
pH 7,6 einstellen

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss von *cis-9*, *trans-11* CLA und *trans-10*, *cis-12* CLA auf die Bildung vasoaktiver Substanzen in HAoEC

#### 3.1.1 Zellzahl und Zellvitalität

Die 24 h Inkubation der Endothelzellen mit den CLA-Isomeren, wie in Tabelle 3.1 dargestellt, hatte keinen Einfluss sowohl auf die Zellzahl als auch auf die Zellvitalität, die sich aus der Gesamtzellzahl und der Anzahl der blauen bzw. toten Zellen ergab.

Tab. 3.1: Zellzahl und Zellvitalität der HAoEC.<sup>1,2</sup>

	Kontrolle	<i>cis-9</i> , <i>trans-11</i> CLA		<i>trans-10</i> , <i>cis-12</i> CLA	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>10<sup>6</sup> Zellen/Flasche</i>					
Zellzahl	2,45 ± 0,47	2,44 ± 0,24	2,85 ± 0,49	2,55 ± 0,39	2,48 ± 0,35
%					
Zellvitalität	96 ± 3	95 ± 1	98 ± 1	95 ± 2	97 ± 2

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis-9*, *trans-11* CLA oder *trans-10*, *cis-12* CLA für 24 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens sechs unabhängige Experimente.

#### 3.1.2 Proteingehalt

In Tabelle 3.2 auf der nächsten Seite ist der Einfluss von *cis-9*, *trans-11* CLA und *trans-10*, *cis-12* CLA auf den Proteingehalt der Endothelzellen dargestellt.

Durch die Behandlung mit 5 bzw. 50 µmol/l der CLA-Isomere kam es zu keiner signifikanten Veränderung des Proteingehaltes in den Zellen.

Tab. 3.2: Proteingehalt der HAoEC.<sup>1,2</sup>

	Kontrolle	<i>cis-9, trans-11 CLA</i>		<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>mg/10<sup>6</sup> Zellen</i>					
Proteingehalt	0,50 ± 0,14	0,48 ± 0,11	0,55 ± 0,21	0,52 ± 0,14	0,63 ± 0,21

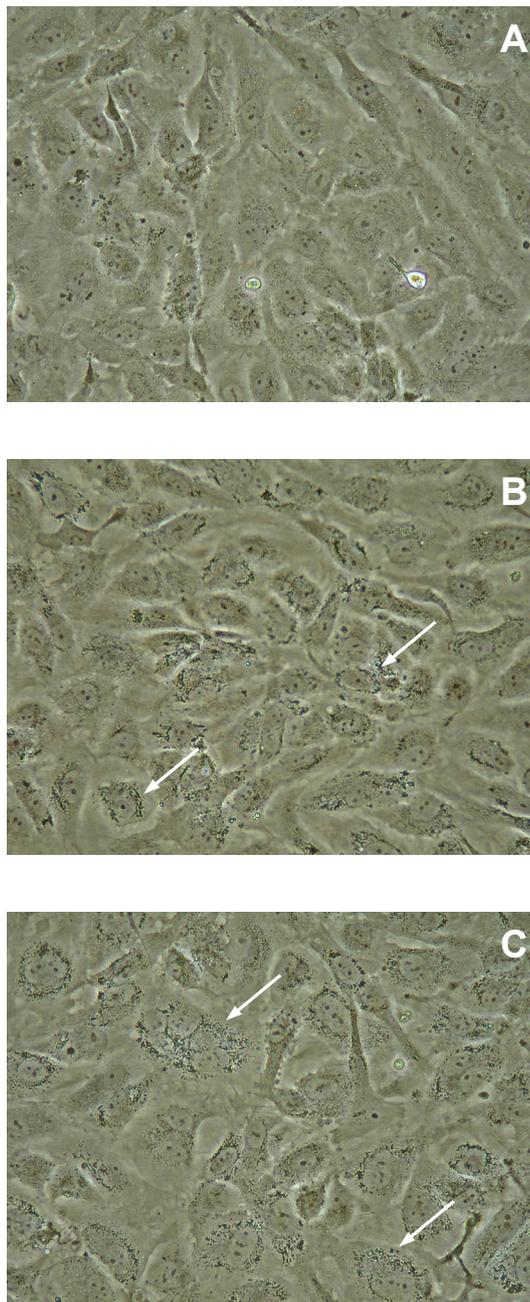
<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* oder *trans-10, cis-12 CLA* für 24 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens sechs unabhängige Experimente.

### 3.1.3 Morphologie der Zellen

Die Abbildungen 3.1 auf der nächsten Seite (A–C) zeigen die unbehandelten Endothelzellen (Kontrolle) und die mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* bzw. *trans-10, cis-12 CLA* behandelten Endothelzellen.

Die Zellen wurden nach der 24 h-Inkubation in ihren Kulturgefäßen mit dem Lichtmikroskop bei einer 40fachen Vergrößerung fotografiert. Dabei waren in den Endothelzellen, die mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* bzw. *trans-10, cis-12 CLA* inkubiert wurden, verglichen mit den unbehandelten Endothelzellen viele Punkte (Pfeile Abbildung 3.1 B und C auf der nächsten Seite), kleinen Körnchen ähnlich, zu erkennen. Es waren keine weiteren morphologischen Veränderungen bei den mit 50 µmol/l der CLA-Isomeren behandelten HAoEC sichtbar. Die Endothelzellen (nicht abgebildet), die mit 5 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* bzw. *trans-10, cis-12 CLA* inkubiert wurden, unterschieden sich morphologisch nicht von den unbehandelten Zellen.



**Abb. 3.1:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der HAoEC mit 40facher Vergrößerung. Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (A), mit 50 μmol *cis-9 trans-11* CLA (B) oder mit 50 μmol *trans-10 cis-12* CLA (C) für 24 h inkubiert.

### 3.1.4 Anteile der verwendeten CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC

Die Anteile der verwendeten CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen der Endothelzellen sind in Tabelle 3.3 auf der nächsten Seite dargestellt.

Die Inkubation der HAoEC mit *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA führte in Abhängigkeit von deren Konzentrationen im Medium zu einer Inkorporierung des jeweiligen CLA-Isomers in die Gesamtlipide der Zellen. In den Gesamtlipiden der Zellen, die mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h inkubiert wurden, waren die Anteile des jeweiligen Isomers, verglichen mit den Gesamtlipiden der Zellen, die mit 5  $\mu\text{mol/l}$  der CLA-Isomere behandelt wurden, um ein vielfaches höher.

Beide CLA-Isomere wurden ebenfalls dosisabhängig in die Phospholipidfraktionen PE und PC der Endothelzellen inkorporiert. Nach der Inkubation der Zellen mit 5  $\mu\text{mol/l}$  beider CLA-Isomere waren die Konzentrationen der jeweiligen CLA in beiden Phospholipidfraktionen annähernd gleich. Nach Behandlung der HAoEC mit 50  $\mu\text{mol/l}$  der CLA-Isomere war die Konzentration von *cis*-9, *trans*-11 CLA in der PC-Fraktion doppelt so hoch und die Konzentration von *trans*-10, *cis*-12 CLA sogar dreifach höher als in der PE-Fraktion.

**Tab. 3.3:** Anteile der verwendeten CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC der HAoEC.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis-9, trans-11 CLA</i>		<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>g/100 g Gesamtfettsäuren</i>					
<b>Gesamtlipide</b>					
<i>cis-9, trans-11 CLA</i>	< 0,1	5,33 ± 0,42 <sup>b</sup>	35,24 ± 0,80 <sup>a</sup>	< 0,1	< 0,1
<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	7,35 ± 1,05 <sup>b</sup>	47,03 ± 0,73 <sup>a</sup>
<b>PE</b>					
<i>cis-9, trans-11 CLA</i>	< 0,1	1,82 ± 0,90 <sup>b</sup>	10,35 ± 2,81 <sup>a</sup>	< 0,1	< 0,1
<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,46 ± 1,21 <sup>b</sup>	9,74 ± 5,34 <sup>a</sup>
<b>PC</b>					
<i>cis-9, trans-11 CLA</i>	< 0,1	2,10 ± 1,37 <sup>b</sup>	20,17 ± 6,96 <sup>a</sup>	< 0,1	< 0,1
<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	< 0,1	< 0,1	< 0,1	1,56 ± 0,88 <sup>b</sup>	29,09 ± 4,51 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* oder *trans-10, cis-12 CLA* für 24 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.5 Anteile der Linolsäure und Arachidonsäure in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC

Die Anteile der n-6-Fettsäuren LA und AA in den Gesamtlipiden und Phospholipidfraktionen der Endothelzellen ist in Tabelle 3.4 auf der nächsten Seite abgebildet.

In den Gesamtlipiden der Zellen, die mit 50 µmol/l *trans-10, cis-12 CLA* inkubiert wurden, war die Konzentration an LA niedriger, während die Anteile dieser Fettsäure in den Gesamtlipiden der mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* bzw. 5 µmol/l *trans-10, cis-12 CLA* behandelten Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen höher waren. Die Konzentrationen der AA waren in den Gesamtlipiden der CLA-behandelten Zellen, verglichen mit der Konzentration der AA in den Gesamtlipiden der unbehandelten Zellen, dosisabhängig vermindert.

Die Konzentrationen an LA und AA in der PC-Fraktion waren generell niedriger als in der PE-Fraktion. Die Konzentrationen der LA in der PE-Fraktion der mit 50 µmol/l *cis-*

9, *trans*-11 CLA inkubierten Zellen waren signifikant höher als jene Konzentrationen in den unbehandelten Endothelzellen. In beiden Phospholipidfraktionen waren die Anteile der AA in den Endothelzellen, die mit 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubiert wurden, im Vergleich zu jenem Anteil in den unbehandelten Zellen signifikant kleiner. In der PE-Fraktion der CLA-behandelten HAoEC waren die Anteile der AA gegenüber dem Anteil in der PE-Fraktion der Kontrollzellen sogar konzentrationsabhängig vermindert.

**Tab. 3.4:** Anteile der Linolsäure (LA) und der Arachidonsäure (AA) in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC der HAoEC.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA		<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>g/100 g Gesamtfettsäuren</i>					
<b>Gesamtlipide</b>					
LA	1,56 ± 0,15 <sup>c</sup>	1,61 ± 0,06 <sup>bc</sup>	1,76 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,85 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,04 <sup>d</sup>
AA	6,37 ± 0,19 <sup>a</sup>	5,89 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,42 ± 0,06 <sup>c</sup>	5,75 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,41 ± 0,07 <sup>c</sup>
<b>PE</b>					
LA	1,76 ± 0,61 <sup>b</sup>	1,90 ± 0,33 <sup>ab</sup>	2,38 ± 1,08 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,16 <sup>ab</sup>	1,90 ± 0,26 <sup>ab</sup>
AA	7,88 ± 1,67 <sup>a</sup>	5,30 ± 1,70 <sup>b</sup>	4,32 ± 1,39 <sup>b</sup>	5,54 ± 2,16 <sup>b</sup>	3,82 ± 0,93 <sup>b</sup>
<b>PC</b>					
LA	1,41 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,27 <sup>b</sup>	1,58 ± 0,28 <sup>ab</sup>	1,81 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,24 <sup>b</sup>
AA	2,14 ± 0,71 <sup>a</sup>	2,30 ± 0,64 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,28 <sup>b</sup>	1,58 ± 0,53 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,13 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

Da für die Zielstellung der vorliegenden Arbeit nicht das gesamte gemessene Fettsäurespektrum relevant war, sind die Anteile der anderen bestimmten Fettsäuren in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen der Endothelzellen ergänzend im Anhang aufgeführt. Vor allem die Konzentrationen der gesättigten Fettsäuren (SFA) und der einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) waren konzentrationsabhängig durch die Behandlung mit den CLA-Isomeren im Vergleich zu denen der unbehandelten Zellen signifikant vermindert.

### 3.1.6 Arachidonsäure/Linolsäure-Quotient und relative mRNA-Konzentrationen der $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturase

Der Quotient aus den Anteilen der AA und LA, Indikator für die  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Desaturierung, ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Der AA/LA-Quotient in den Gesamtlipiden der Endothelzellen, die mit 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis-9, trans-11* CLA oder 5  $\mu\text{mol/l}$  *trans-10, cis-12* CLA inkubiert wurden, war im Vergleich zum AA/LA-Quotienten in den Gesamtlipiden der Kontrollzellen vermindert. Lediglich der AA/LA-Quotient den Gesamtlipiden der mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *trans-10, cis-12* CLA behandelten Zellen war verglichen mit dem AA/LA-Quotient in den Gesamtlipiden der Kontrollzellen erhöht. Der Quotient aus AA und LA war ebenfalls in beiden Phospholipidfraktionen der CLA-behandelten Endothelzellen geringer als in den Phospholipidfraktionen der unbehandelten Zellen.

**Tab. 3.5:** Quotient aus den Anteilen der Arachidonsäure (AA) und Linolsäure (LA) in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC der HAoEC.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis-9, trans-11</i> CLA		<i>trans-10, cis-12</i> CLA	
		5 $\mu\text{mol/l}$	50 $\mu\text{mol/l}$	5 $\mu\text{mol/l}$	50 $\mu\text{mol/l}$
<b>Gesamtlipide</b>	4,12 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	3,67 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	1,94 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	3,11 $\pm$ 0,16 <sup>d</sup>	4,85 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
<b>PE</b>	4,60 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	2,88 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	2,12 $\pm$ 1,07 <sup>b</sup>	2,69 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	2,08 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>
<b>PC</b>	1,50 $\pm$ 0,30 <sup>ab</sup>	1,65 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	0,92 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>	1,10 $\pm$ 0,58 <sup>bc</sup>

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis-9, trans-11* CLA oder *trans-10, cis-12* CLA für 24 h inkubiert.

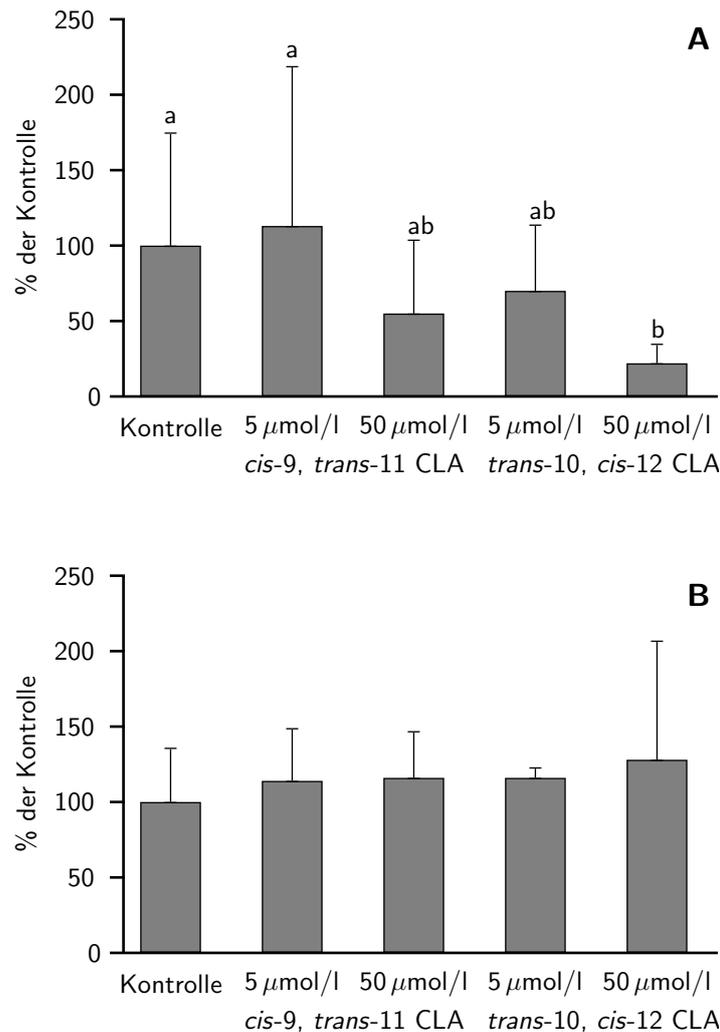
<sup>2</sup>Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

In den Abbildungen 3.2 auf der nächsten Seite sind die relativen mRNA-Konzentrationen der  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Desaturase dargestellt.

Die mRNA-Konzentration der  $\Delta 6$ -Desaturase war signifikant geringer in den Zellen, die mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *trans-10, cis-12* CLA behandelt wurden, als die mRNA-Konzentration in den unbehandelten Zellen. Eine ähnliche Tendenz war bei den Zellen, die mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis-9, trans-11* CLA inkubiert wurden, zu beobachten ( $P < 0,1$ ). Die relative

mRNA-Konzentration der  $\Delta 6$ -Desaturase in den mit  $5 \mu\text{mol/l}$  *cis-9, trans-11* bzw. *trans-10, cis-12* CLA inkubierten Zellen war nicht signifikant verschieden von der Konzentration der mRNA in den Kontrollzellen. Zwischen den Kontrollzellen und den mit CLA-Isomeren behandelten Zellen gab es keinen Unterschied in den relativen mRNA-Konzentrationen der  $\Delta 5$ -Desaturase.



**Abb. 3.2:** Relative mRNA-Konzentrationen der  $\Delta 6$ -Desaturase (A) und  $\Delta 5$ -Desaturase (B) in den HAoEC.

Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) bzw. mit 5 oder  $50 \mu\text{mol/l}$  *cis-9, trans-11* CLA bzw. *trans-10, cis-12* CLA für 24 h in HBSS für 1 h inkubiert. Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens sechs unabhängige Experimente. Kontrolle = 100 %. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.7 Anteile konjugierter Dien-Fettsäuren in den Gesamtlipiden

Die Konzentrationen von CD-Fettsäuren in den Gesamtlipiden der Endothelzellen sind in Tabelle 3.6 abgebildet.

Durch die Behandlung der Endothelzellen mit *cis*-9, *trans*-11 CLA waren in Abhängigkeit von deren Konzentration die Anteile der *cis*-7, *trans*-9 CD16:2, der *cis*-11, *trans*-13 CD20:2 und der *trans*-11, *trans*-13 CD20:2 in den Gesamtlipiden, verglichen mit den Anteilen dieser konjugierten Fettsäuren in den Gesamtlipiden der unbehandelten Zellen, erhöht. In den Gesamtlipiden der HAoEC, die mit *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubiert wurden, waren hingegen die Anteile der CD-Fettsäuren *trans*-8, *cis*-10 CD16:2, *cis*-7, *trans*-9 CD16:2, *trans*-12, *cis*-14 CD20:2 und *trans*-11, *trans*-13 CD20:2 gegenüber den Gesamtlipiden der Kontrollzellen erhöht. In den Gesamtlipiden der mit 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA behandelten Endothelzellen war der Anteil der *trans*-7, *trans*-9 CD16:2 höher als in den unbehandelten Endothelzellen.

**Tab. 3.6:** Anteile konjugierter Dien-Fettsäuren in den Gesamtlipiden der HAoEC.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA		<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>g/100 g Gesamtfettsäuren</i>					
<b>CD16:2</b>					
<i>cis</i> -7, <i>trans</i> -9	< 0,1	0,61 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,29 ± 0,08 <sup>a</sup>	< 0,1	0,29 ± 0,03 <sup>c</sup>
<i>trans</i> -8, <i>cis</i> -10	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,29 ± 0,25 <sup>b</sup>	1,77 ± 0,17 <sup>a</sup>
<i>trans</i> -7, <i>trans</i> -9	< 0,1	< 0,1	0,37 ± 0,05 <sup>a</sup>	< 0,1	0,17 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>CD20:2</b>					
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13	< 0,1	0,10 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,13 <sup>a</sup>	< 0,1	< 0,1
<i>trans</i> -12, <i>cis</i> -14	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,04 ± 0,13 <sup>a</sup>
<i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13	0,11 ± 0,19 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,14 <sup>bc</sup>	0,97 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,09 <sup>bc</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h inkubiert.

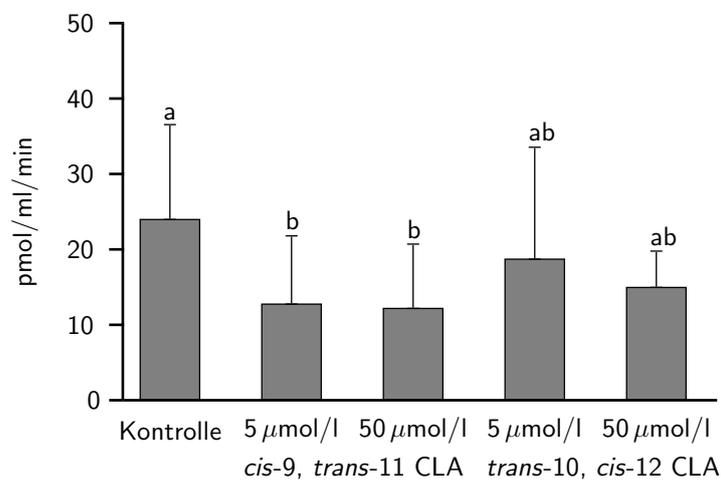
<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.8 Aktivität und relative mRNA-Konzentration der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub>

In der Abbildung 3.3 ist die Aktivität der sPLA<sub>2</sub> und in der Abbildung 3.4 auf der nächsten Seite ist die relative mRNA-Konzentration der sPLA<sub>2</sub> dargestellt.

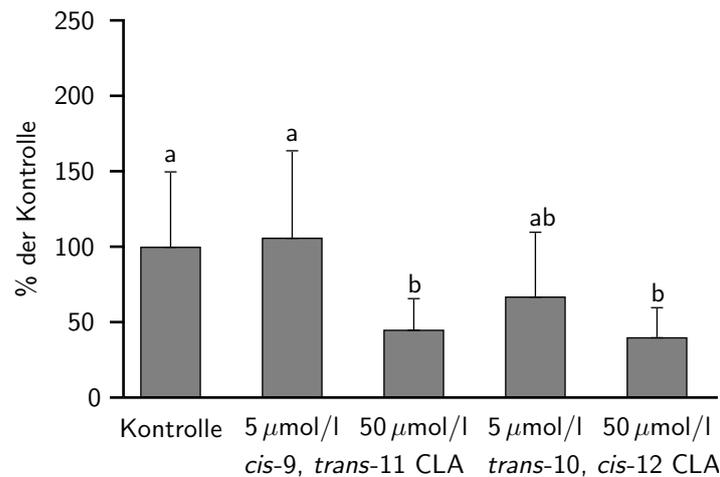
Die sPLA<sub>2</sub>-Aktivität der Zellen, die 24 h mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA inkubiert wurden, war signifikant niedriger als die sPLA<sub>2</sub>-Aktivität der Kontrollzellen. Die Aktivität der sPLA<sub>2</sub> der mit 50 µmol/l *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubierten Endothelzellen war tendenziell ( $P < 0,1$ ) niedriger als die sPLA<sub>2</sub>-Aktivität der unbehandelten Zellen.



**Abb. 3.3:** Aktivität der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub> in den HAoEC.

Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) bzw. mit 5 oder 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h in HBSS für 1 h inkubiert. Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens sechs unabhängige Experimente. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

Die Zellen, die mit 50 µmol/l der CLA-Isomere behandelt wurden, hatten im Vergleich zu den Kontrollzellen eine geringere relative mRNA-Konzentration der sPLA<sub>2</sub>. Die mit 5 µmol/l der CLA-Isomere behandelten Zellen unterschieden sich in der mRNA-Konzentration der sPLA<sub>2</sub> nicht signifikant von den unbehandelten Endothelzellen.



**Abb. 3.4:** Relative mRNA-Konzentration der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub> in den HAoEC. Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) bzw. mit 5 oder 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h in HBSS für 1 h inkubiert. Mittelwerte ± SD für mindestens sechs unabhängige Experimente. Kontrolle = 100 %. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.9 Eicosanoidbildung

#### 3.1.9.1 Freisetzung der Eicosanoide 6-keto PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub>

In Tabelle 3.7 auf der nächsten Seite sind die Mengen der Eicosanoide 6-keto PGF<sub>1α</sub> (Index für PGI<sub>2</sub>), TXB<sub>2</sub> (Index für TXA<sub>2</sub>), PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2α</sub> im HBSS-Überstand abgebildet.

Die Zellen, die mit 5 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA behandelt wurden, unterschieden sich in den Mengen der gemessenen Eicosanoide nicht von den Kontrollzellen. Nur die Menge des 6-keto PGF<sub>1α</sub> war im Überstand der mit 5 µmol/l *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubierten Zellen etwas geringer als im Überstand der unbehandelten Zellen. Die mit 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubierten Zellen zeigten gegenüber den Kontrollzellen eine verminderte Bildung aller gemessenen Eicosanoide.

Es kam jedoch zu keiner signifikanten Veränderung des Verhältnisses von 6-keto PGF<sub>1α</sub> zu TXB<sub>2</sub> bzw. PGI<sub>2</sub> zu TXA<sub>2</sub>.

**Tab. 3.7:** Mengen der freigesetzten Eicosanoide aus den HAOEC in HBSS.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis-9, trans-11 CLA</i>		<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>fmol/10<sup>6</sup> Zellen</i>					
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	227 ± 99 <sup>a</sup>	216 ± 88 <sup>a</sup>	48 ± 19 <sup>b</sup>	99 ± 50 <sup>b</sup>	60 ± 17 <sup>b</sup>
TXB <sub>2</sub>	241 ± 137 <sup>a</sup>	275 ± 132 <sup>a</sup>	53 ± 23 <sup>b</sup>	176 ± 89 <sup>ab</sup>	100 ± 49 <sup>b</sup>
PGE <sub>2</sub>	1218 ± 446 <sup>a</sup>	1022 ± 465 <sup>a</sup>	312 ± 101 <sup>c</sup>	862 ± 563 <sup>ab</sup>	489 ± 227 <sup>bc</sup>
PGF <sub>2α</sub>	1342 ± 236 <sup>a</sup>	1363 ± 409 <sup>a</sup>	654 ± 296 <sup>c</sup>	1111 ± 501 <sup>ab</sup>	694 ± 331 <sup>bc</sup>
6-keto-PGF <sub>1α</sub> /TXB <sub>2</sub>	0,92 ± 0,40	0,82 ± 0,30	1,05 ± 0,51	0,60 ± 0,35	0,86 ± 0,11

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA*- bzw. *trans-10, cis-12 CLA* für 24 h in HBSS für 1 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens vier unabhängige Experimente.

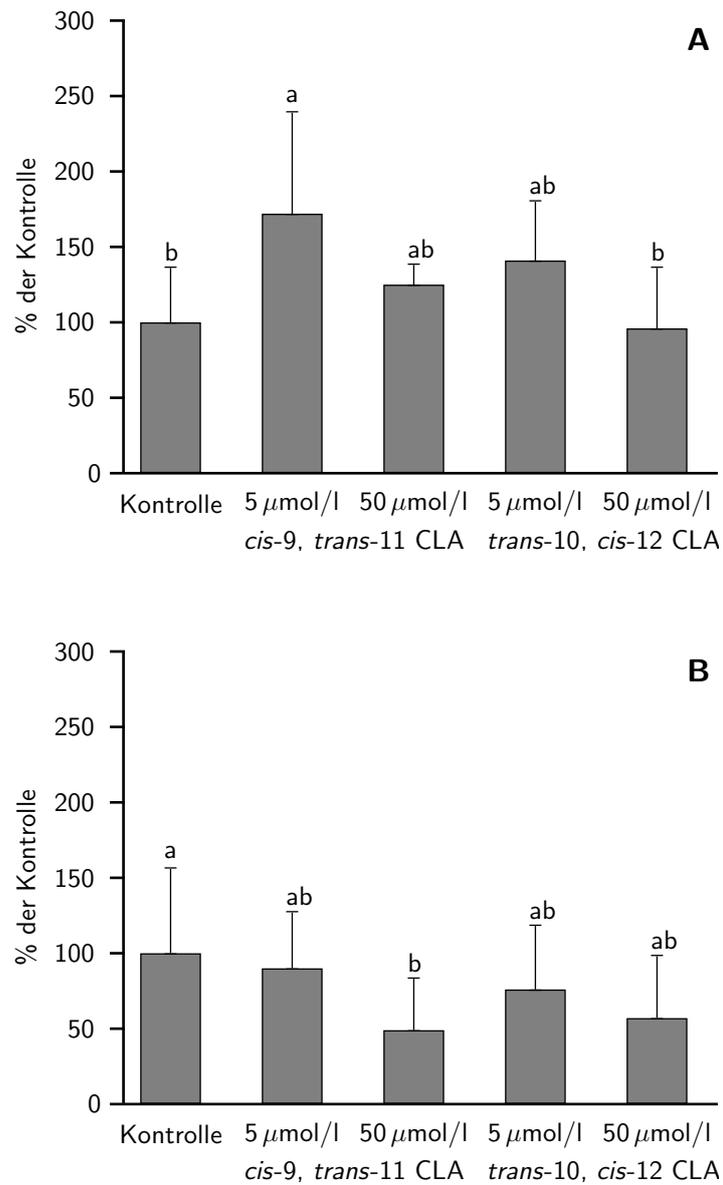
<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.9.2 Relative mRNA-Konzentrationen der Cyclooxygenase-1 und -2

In den Abbildungen 3.5 auf der nächsten Seite sind die mRNA-Konzentrationen der COX-1 und COX-2 dargestellt.

Die Zellen, die mit 5 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* behandelt wurden, hatten eine signifikant höhere relative mRNA-Konzentration der COX-1 als die Kontrollzellen. Die relative mRNA-Konzentration dieses Enzyms war in den Endothelzellen, die mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA*, 5 und 50 µmol/l *trans-10, cis-12 CLA* inkubiert wurden, nicht signifikant verschieden von der mRNA-Konzentration in den unbehandelten Zellen.

Die relative mRNA-Konzentration der COX-2 der Endothelzellen, die mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* behandelt wurden, waren signifikant niedriger als jene in den unbehandelten Zellen. Eine ähnliche Tendenz war bei den Zellen, die mit 50 µmol/l *trans-10, cis-12 CLA* behandelt wurden, zu beobachten ( $P < 0,1$ ). Keine Unterschiede in der mRNA-Konzentration des Enzyms zeigten sich zwischen den mit 5 µmol/l der CLA-Isomere inkubierten Zellen und den Kontrollzellen.



**Abb. 3.5:** Relative mRNA-Konzentrationen der Cyclooxygenase-1 (A) und Cyclooxygenase-2 (B) in den HAoEC.

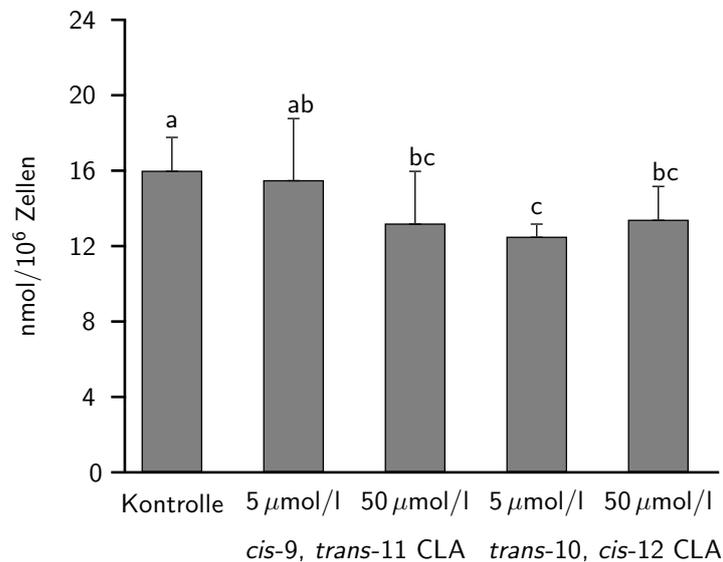
Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) bzw. mit 5 oder 50 µmol/l *cis-9, trans-11* CLA bzw. *trans-10, cis-12* CLA für 24 h in HBSS für 1 h inkubiert. Mittelwerte ± SD für mindestens sechs unabhängige Experimente. Kontrolle = 100 %. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.10 Bildung des NO

#### 3.1.10.1 Freisetzung von Nitrat und Nitrit

In Abbildung 3.6 ist die Menge von Nitrat und Nitrit, die für das NO gemessen wurden, dargestellt.

Die Zellen, die 24 h mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA, 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  *trans*-10, *cis*-12 CLA behandelt wurden, setzten während einer 1 h Inkubation weniger Nitrat und Nitrit in HBSS frei als die Kontrollzellen. Kein Unterschied der Nitrat- und Nitritmenge zeigte sich zwischen den mit 5  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA inkubierten Zellen und den unbehandelten Zellen.



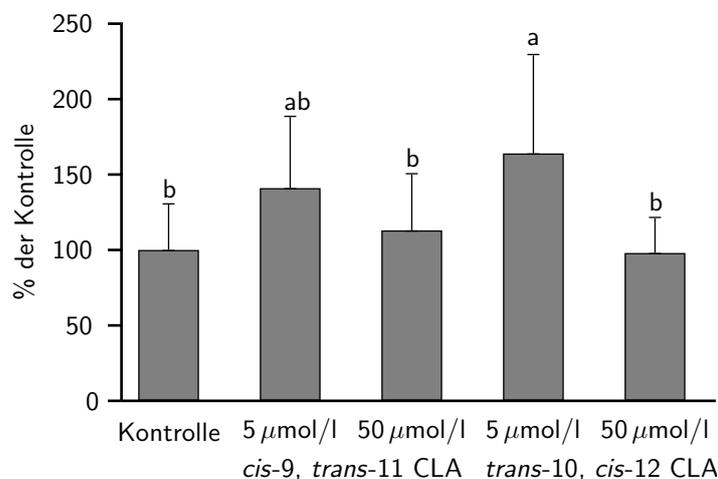
**Abb. 3.6:** Menge des freigesetzten Nitrat und Nitrit aus den HAoEC in HBSS.

Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) bzw. mit 5 oder 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA für 1 h in HBSS inkubiert. Mittelwerte  $\pm$  SD für sechs unabhängige Experimente. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.10.2 Relative mRNA-Konzentration der endothelialen NO-Synthase

In Abbildung 3.7 ist die relative mRNA-Konzentration der eNOS dargestellt.

Zwischen den Kontrollzellen und den mit 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA oder 50  $\mu\text{mol/l}$  *trans*-10, *cis*-12 CLA behandelten Zellen gab es keinen signifikanten Unterschied in der relativen mRNA-Konzentration der eNOS. Lediglich in den Endothelzellen, die mit 5  $\mu\text{mol/l}$  *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubiert wurden, war die relative mRNA-Konzentration der eNOS höher als in den unbehandelten Endothelzellen.

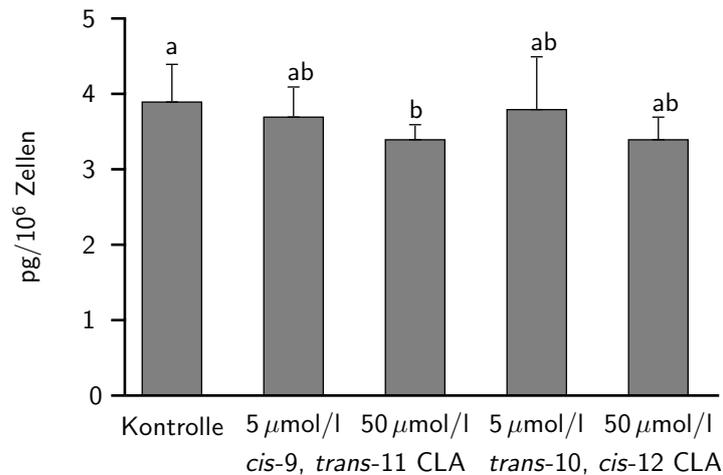


**Abb. 3.7:** Relative mRNA-Konzentration der endothelialen NO-Synthase in den HAoEC. Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) bzw. mit 5 oder 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h in HBSS für 1 h inkubiert. Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens sechs unabhängige Experimente, Kontrolle = 100 %. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.1.11 Freisetzung des Endothelin-1

Die Menge des ET-1 im HBSS der HAoEC ist in Abbildung 3.8 auf der nächsten Seite dargestellt.

Generell waren die Mengen des freigesetzten ET-1 aus den HAoEC in HBSS nach einer 1-stündigen Inkubation sehr gering. Die Zellen, die mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA behandelt wurden, setzten signifikant weniger ET-1 als die Kontrollzellen frei; eine ähnliche Tendenz wurde für die mit *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubierten Zellen beobachtet ( $P < 0,1$ ).



**Abb. 3.8:** Menge des freigesetzten Endothelin-1 aus den HAoEC in HBSS.

Die Endothelzellen wurden nach der Behandlung in Medium ohne CLA (Kontrolle) bzw. mit 5 oder 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h in HBSS für 1 h inkubiert. Mittelwerte ± SD für sechs unabhängige Experimente. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

## 3.2 Einfluss von *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA und Linolsäure auf proinflammatorische Parameter in TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC

### 3.2.1 Zellvitalität und Proteingehalt

In Tabelle 3.8 auf der nächsten Seite ist der Einfluss der CLA-Isomere, der LA und des TNF $\alpha$  auf die Vitalität und den Proteingehalt der Endothelzellen abgebildet.

Die 24-stündige Inkubation der Endothelzellen mit *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA sowie LA und die 4 h-Stimulation mit TNF $\alpha$  hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität, die mit dem MTT-Test bestimmt wurde.

Für die Untersuchung der PPAR $\gamma$ -DNA-Bindungsaktivität wurde die Zellvitalität der mit Troglitazon behandelten Endothelzellen gemessen. Die Vitalität der HAoEC, die mit 10 µmol/l Troglitazon für 24 h inkubiert wurden, unterschied sich nicht von den Kontrollzellen und der Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO).

Zwischen den HAoEC, die in Medium ohne (Kontrolle mit TNF $\alpha$ ) bzw. mit *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA inkubiert und anschließend mit TNF $\alpha$  stimuliert wurden, und den nicht behandelten Zellen (Kontrolle ohne TNF $\alpha$ ) gab es keinen Unterschied im Proteingehalt.

**Tab. 3.8:** Zellvitalität und Proteingehalt der TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC.<sup>1,2</sup>

	Kontrolle	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA		<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA		LA	
		5 $\mu$ mol/l	50 $\mu$ mol/l	5 $\mu$ mol/l	50 $\mu$ mol/l	5 $\mu$ mol/l	50 $\mu$ mol/l
	% der unstimulierten Kontrolle						
Zellvitalität <sup>3</sup>	112 $\pm$ 13	94 $\pm$ 7	98 $\pm$ 23	102 $\pm$ 7	95 $\pm$ 2	107 $\pm$ 16	103 $\pm$ 13
Proteingehalt <sup>3</sup>	112 $\pm$ 10	104 $\pm$ 8	111 $\pm$ 6	113 $\pm$ 11	111 $\pm$ 9	110 $\pm$ 16	102 $\pm$ 10

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA und LA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA und LA für 20 h inkubiert und für 4 h ohne (Kontrolle ohne TNF $\alpha$ ) bzw. mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert.

<sup>2</sup>Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

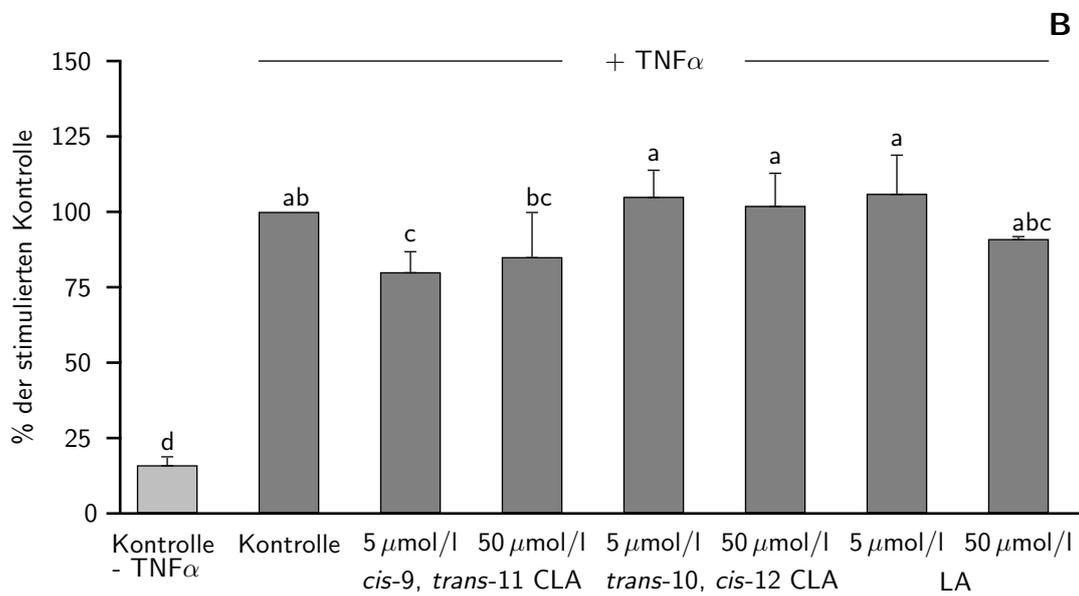
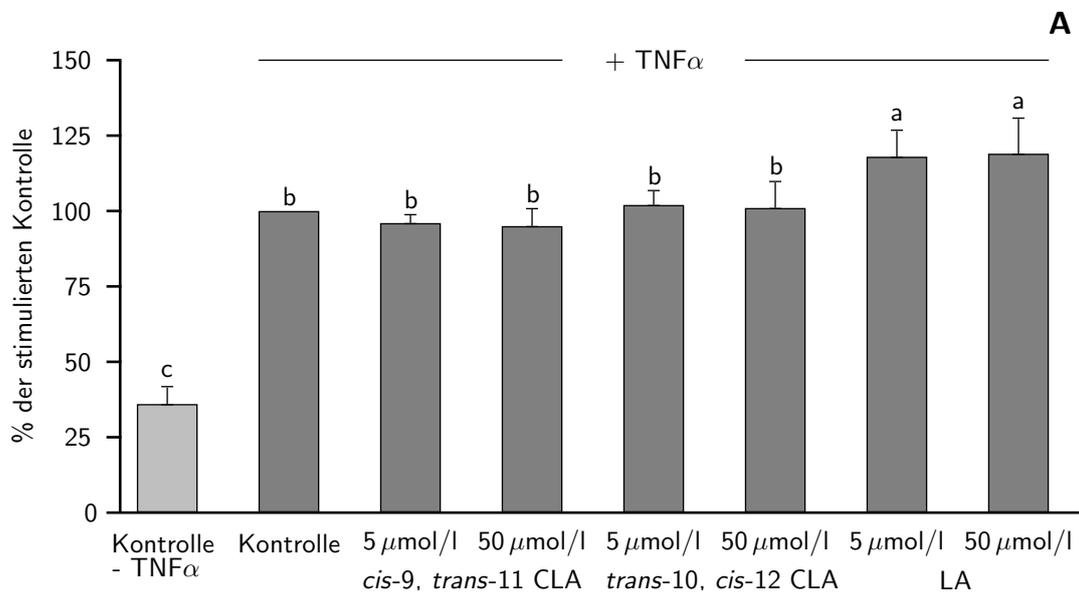
<sup>3</sup>Kontrolle ohne TNF $\alpha$  = 100  $\pm$  0 %

### 3.2.2 Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin

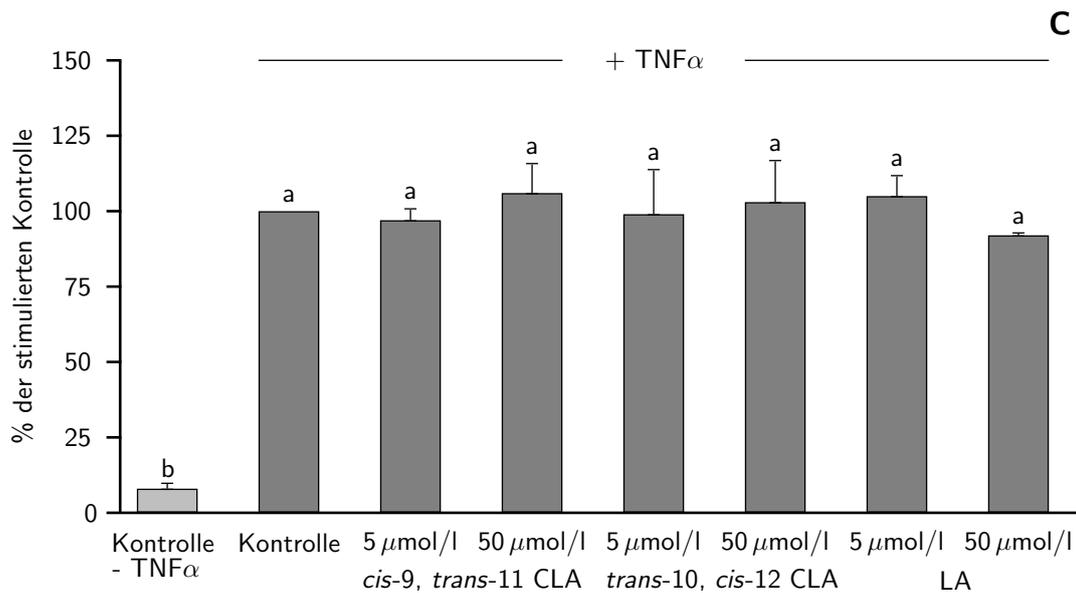
Die Wirkung von TNF $\alpha$  und den verwendeten Fettsäuren auf die Oberflächenexpression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin ist in den Abbildungen 3.9 auf Seite 55 (A–C) dargestellt.

Die Stimulation der HAoEC mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  für 4 h bewirkte im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen einen Anstieg der Expression aller gemessenen Adhäsionsmoleküle. Zwischen den stimulierten Endothelzellen, die mit 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, 5 oder 50  $\mu$ mol/l *trans*-10, *cis*-12 CLA behandelt wurden, gab es im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen keinen Unterschied in der Expression von ICAM-1 und VCAM-1. Die Expression des ICAM-1 war bei den TNF $\alpha$ -stimulierten Zellen, die mit 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l LA inkubiert wurden, signifikant höher als die Expression dieses Adhäsionsmoleküls in den TNF $\alpha$ -stimulierten Kontrollzellen. Die Zytokin-stimulierten Endothelzellen, die mit 5  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA behandelt wurden, exprimierten im Vergleich zu den Zytokin-stimulierten Kontrollzellen signifikant weniger VCAM-1. Die TNF $\alpha$ -stimulierten Kontrollzellen unterschieden sich nicht signifikant in der

Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin von den  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten CLA- bzw. LA-behandelten HAoEC.



(Fortsetzung Abbildungen 3.9 auf der nächsten Seite)



**Abb. 3.9:** Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1(A), VCAM-1 (B) und E-Selektin (C) auf den HAoEC.

Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA und LA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA für 20 h inkubiert und anschließend ohne (Kontrolle ohne TNF $\alpha$ ) bzw. mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  für 4 h stimuliert. Mittelwerte  $\pm$  SD für vier unabhängige Experimente. Kontrolle (+TNF $\alpha$ ) = 100  $\pm$  0 %. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

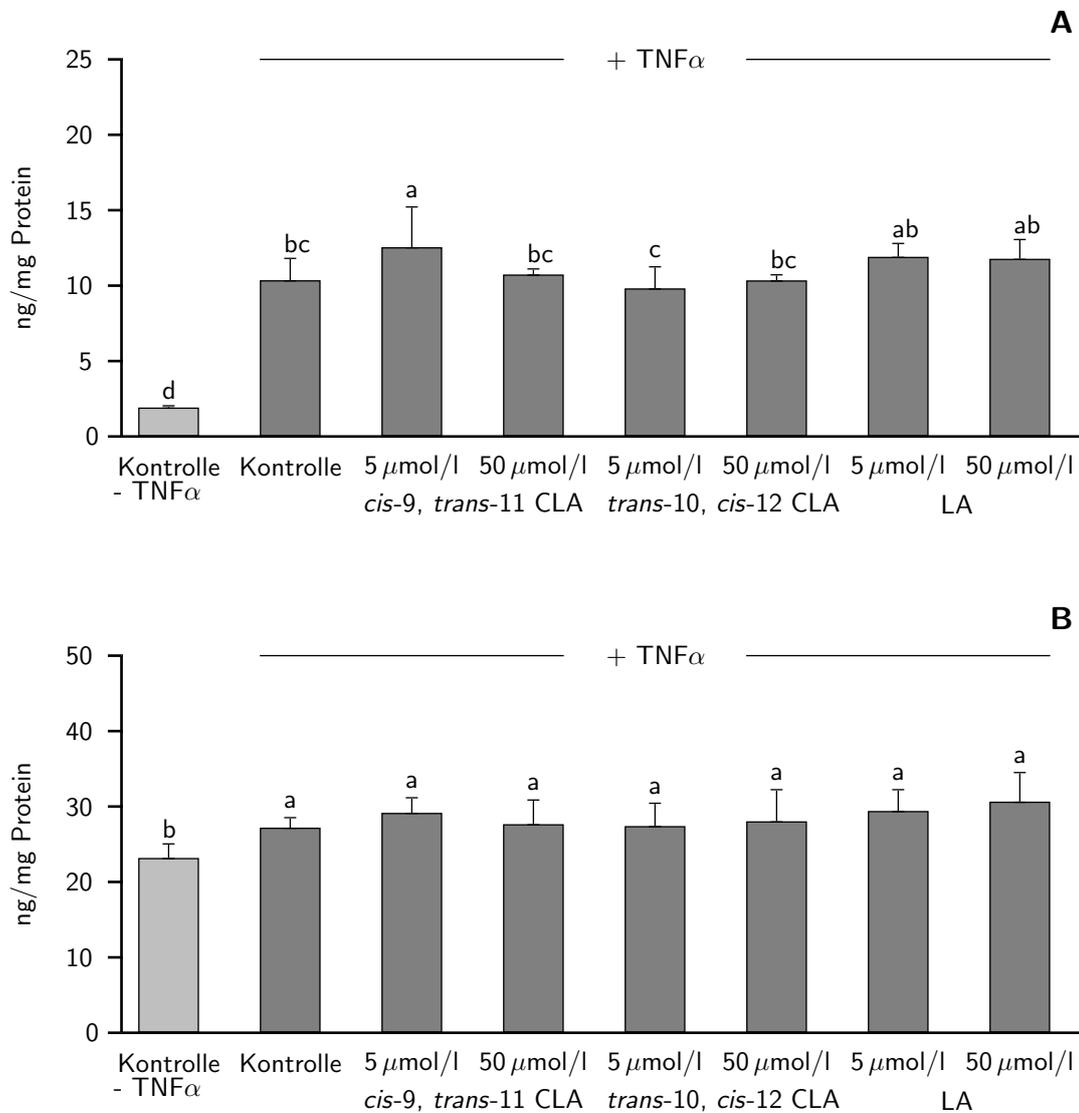
### 3.2.3 Freisetzung der Chemokine MCP-1 und Interleukin-8

Die Wirkung von TNF $\alpha$  und den Fettsäuren auf die Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8 ist in den Abbildungen 3.10 auf der nächsten Seite (A und B) dargestellt.

Die Zellen, die mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  für 4 h behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen eine signifikant höhere Freisetzung von MCP-1 und IL-8. Die Menge des aus den HAoEC freigesetzten IL-8 war allgemein höher als die Menge des aus den HAoEC freigesetzten MCP-1.

Die stimulierten Endothelzellen, die mit 5 oder 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA bzw. LA behandelt wurden, unterschieden sich in der Freisetzung der beiden Chemokine kaum von den stimulierten Kontrollzellen. Lediglich die Menge an freigesetztem MCP-1 aus den Zellen, die mit 5  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA behandelt wurden, war im Vergleich zu jener Menge der TNF $\alpha$ -stimulierten Kontrollzellen erhöht.

Die TNF $\alpha$ -stimulierten CLA- bzw. LA-behandelten Zellen unterschieden sich nicht signifikant in der IL-8-Freisetzung von den Zytokin-stimulierten Kontrollzellen.



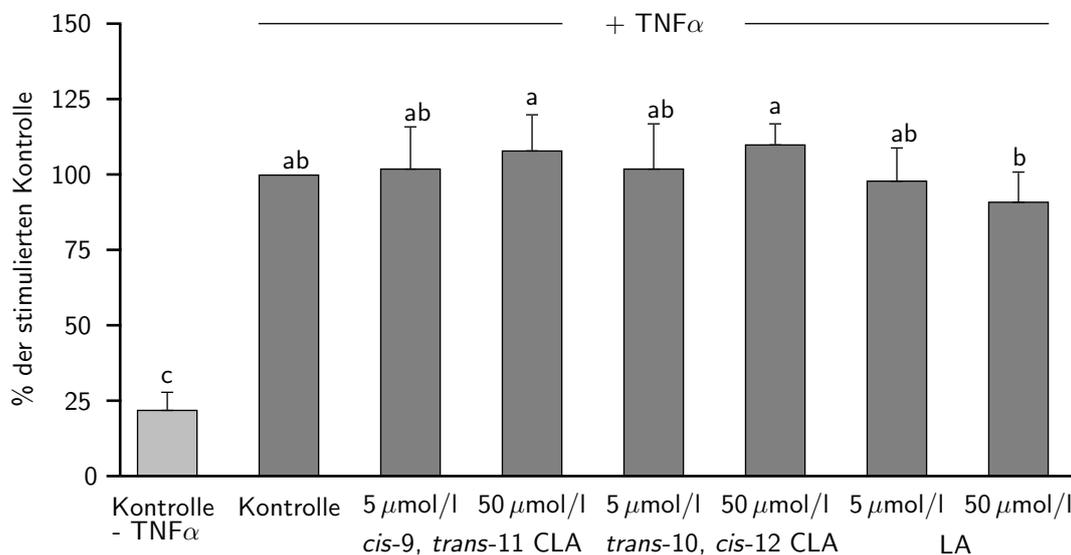
**Abb. 3.10:** Mengen der freigesetzten Chemokine MCP-1 (A) und Interleukin-8 (B) aus den HAoEC.

Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA und LA (Kontrolle) oder mit 5 bzw 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA für 20 h inkubiert und anschließend ohne (Kontrolle ohne TNF $\alpha$ ) bzw. mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  für 4 h stimuliert. Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens vier unabhängige Experimente. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.2.4 Adhäsion der Monozyten U937 an die HAoEC

Der Effekt von  $\text{TNF}\alpha$  und den verschiedenen Fettsäuren auf die Adhäsion von U937 Monozyten an die HAoEC ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

Die Adhäsion der Monozyten an die Zellen, die mit 2 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  für 4 h behandelt wurden, war höher als die Monozytenadhäsion an die unstimulierten Kontrollzellen. Es gab jedoch zwischen den stimulierten Kontrollzellen und den stimulierten Zellen, die mit 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA behandelt wurden, keinen signifikanten Unterschied in der Monozytenadhäsion.



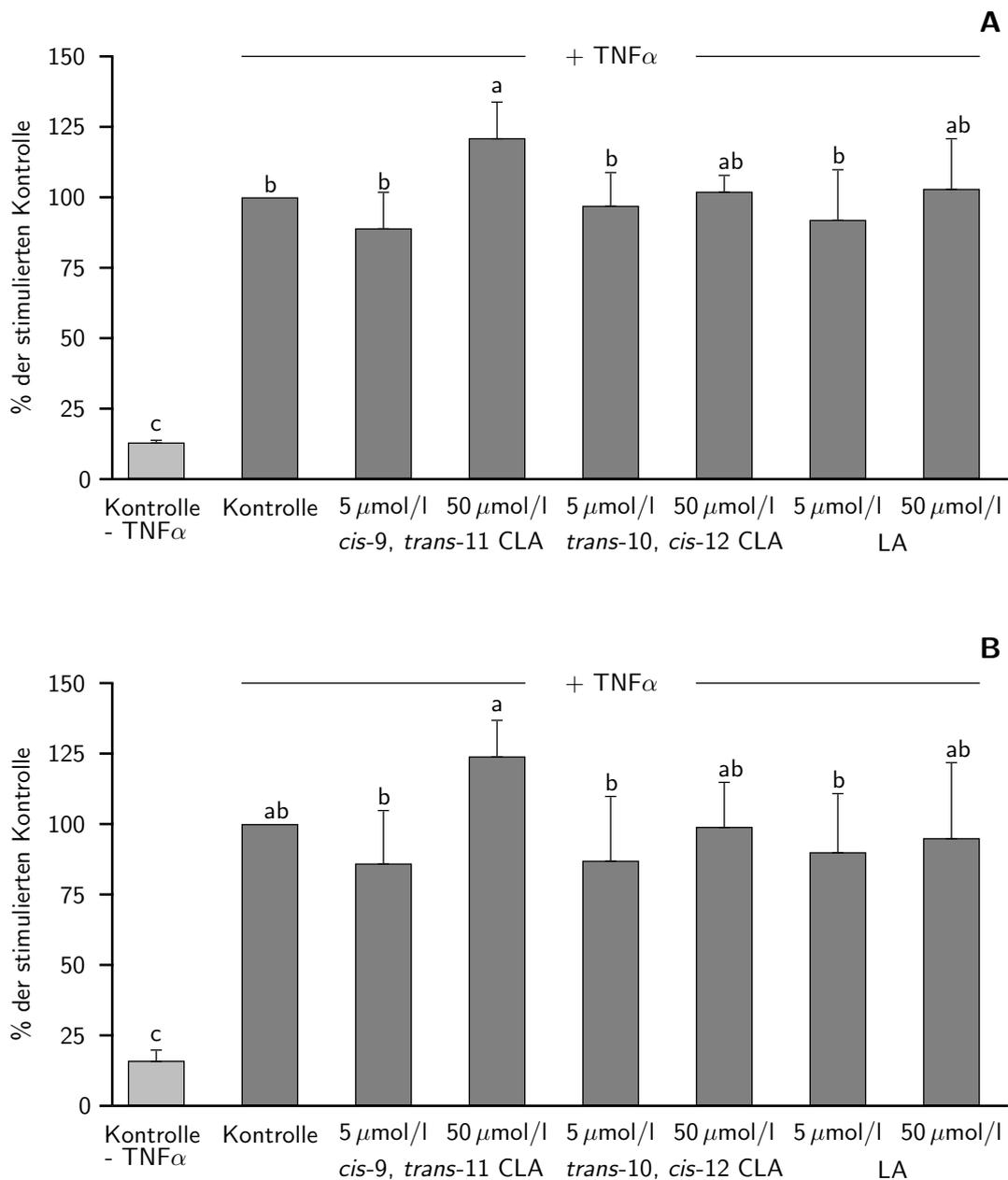
**Abb. 3.11:** Adhäsion der Monozyten U937 an die HAoEC.

Die Endothelzellen wurden im Medium ohne CLA und LA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA für 20 h inkubiert und anschließend ohne (Kontrolle ohne  $\text{TNF}\alpha$ ) bzw. mit 2 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  für 4 h stimuliert. Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens vier unabhängige Experimente. Kontrolle (+ $\text{TNF}\alpha$ ) =  $100 \pm 0\%$ . Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

### 3.2.5 DNA-Bindungsaktivität der Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B

In den Abbildungen 3.12 auf der nächsten Seite (A und B) ist der Effekt von TNF $\alpha$  und den verschiedenen Fettsäuren auf die DNA-Bindungsaktivität von p50 und p65 der NF- $\kappa$ B-Familie in den HAoEC dargestellt.

Die Aktivitäten der Untereinheiten p50 und p65 waren durch die Behandlung der Zellen mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  im Vergleich zu den Aktivitäten der unstimulierten Kontrollzellen erhöht. Jedoch unterschieden sich die TNF $\alpha$ -stimulierten Kontrollzellen in der Aktivität der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p50 und p65, mit einer Ausnahme, nicht von der Aktivität der Zellen, die mit 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA behandelt wurden. Nur die Aktivität des p50 der Zellen, die mit 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA inkubiert wurden, war signifikant höher als die Aktivität dieser NF- $\kappa$ B-Untereinheit der stimulierten Kontrollzellen.



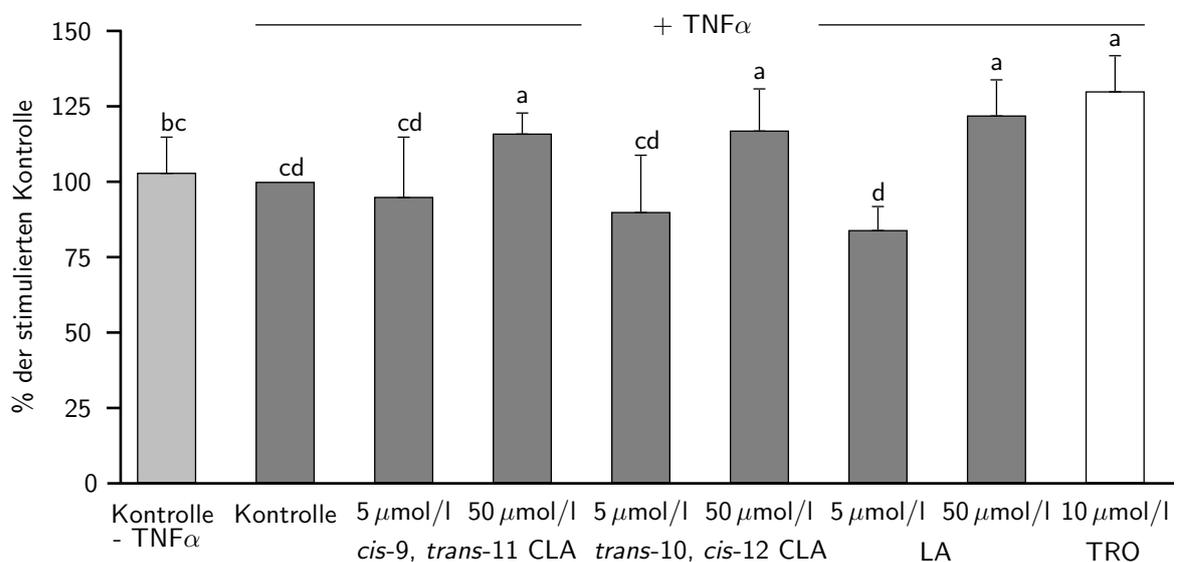
**Abb. 3.12:** DNA-Bindungsaktivität des p50 (A) und des p65 (B) der NF- $\kappa$ B-Familie in den HAoEC.

Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA und LA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA oder LA für 20 h inkubiert und anschließend ohne (Kontrolle ohne TNF $\alpha$ ) bzw. mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  für 4 h stimuliert. Mittelwerte  $\pm$  SD für vier unabhängige Experimente. Kontrolle (+TNF $\alpha$ ) = 100  $\pm$  0 %. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit P < 0,05.

### 3.2.6 DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionfaktors PPAR $\gamma$

In Abbildung 3.13 ist der Effekt von TNF $\alpha$  und den verschiedenen Fettsäuren auf die DNA-Bindungsaktivität von PPAR $\gamma$  in den HAoEC dargestellt.

Die Behandlung der HAoEC mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA, LA bzw. 10  $\mu\text{mol/l}$  des PPAR $\gamma$ -Liganden Troglitazon führte im Vergleich zu den unstimulierten und den TNF $\alpha$ -stimulierten Kontrollzellen zu einer leichten, aber signifikanten, Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität des PPAR $\gamma$ .



**Abb. 3.13:** DNA-Bindungsaktivität des PPAR $\gamma$  in den HAoEC.

Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA und LA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA, LA oder 10  $\mu\text{mol/l}$  Troglitazon (TRO) für 20 h inkubiert und anschließend ohne (Kontrolle ohne TNF $\alpha$ ) bzw. mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  für 4 h stimuliert. Mittelwerte  $\pm$  SD für mindestens drei unabhängige Experimente. Kontrolle (+TNF $\alpha$ ) = 100  $\pm$  0%. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

## 4 Diskussion

Den CLAs werden viele physiologisch positive Eigenschaften zugesprochen, unter anderem dass sie Prozesse, die im Zusammenhang mit Atherosklerose stehen, beeinflussen (LEE et al. 1994; NICOLOSI et al. 1997; KRITCHEVSKY et al. 2000; STANGL 2000a, b; SHER et al. 2003; TOOMEY et al. 2003). Die Atherosklerose ist die grundlegende Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen, derzeit die Haupttodesursachen in den meisten Industrieländern. Die Entstehung der Atherosklerose-Risikofaktoren Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck und Diabetes mellitus werden durch die Ernährung entscheidend beeinflusst (BIESALSKI u. GRIMM 1999; LEITZMANN et al. 2001; LIBBY 2002; MONACO u. PALEOLOG 2004).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf atheroskleroserelevante Parameter, vasoaktive Substanzen und proinflammatorische Parameter, in humanen arteriellen Endothellzellen zu untersuchen.

Für die Untersuchungen der Wirkung der CLAs auf die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wurden die HAoEC mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h bei 37°C inkubiert. Zellzahl, Zellvitalität und Proteingehalt wurden bestimmt, um Aussagen über den Einfluss der CLA-Isomere auf die Lebensfähigkeit und das Wachstumsverhalten der Endothelzellen treffen zu können. Zudem wurden die unbehandelten und die CLA-behandelten Zellen mikroskopisch miteinander nach Form und Größe verglichen. Für die Untersuchungen der proinflammatorischen Parameter wurden die Endothelzellen mit 5 bzw. 50 µmol/l der beiden CLA-Isomere bzw. der LA für 20 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ng/ml TNFα für 4 h bei 37°C stimuliert, um eine inflammatorische Situation hervorzurufen. Auch hier wurden die Zellvitalität und der Proteingehalt gemessen, um neben dem Einfluss der beiden CLA-Isomere und der LA auch einen möglichen Einfluss des TNFα, das in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirken kann, zu untersuchen.

Bei beiden untersuchten Teilfragen wurden keine signifikanten Veränderungen der Lebensfähigkeit und des Wachstumsverhaltens (Zellvitalität, Zellzahl und Proteingehalt) zwischen Kontrollzellen und den mit CLA-, LA- und bzw. oder TNF $\alpha$ -behandelten Endothelzellen beobachtet. Bezüglich der morphologischen Eigenschaften (Form, Größe) unterschieden sich die unbehandelten nicht von den Fettsäure- und bzw. oder Zytokin-behandelten HAoEC. Es wurde aber festgestellt, dass in den Endothelzellen, die mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollzellen vermehrt kleine Einschlüsse, dunklen Körnchen ähnlich, erkennbar waren. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in Studien mit verschiedenen Zellmodellen, die mit unterschiedlichen Fettsäuren behandelt wurden, gemacht (SCHNEEBERGER et al. 1971; SPECTOR et al. 1981; SIMON et al. 1982). In bovinen Endothelzellen der Aorta (BAEC) wurden kleine Einschlüsse nachgewiesen, nachdem die Zellen mit AA inkubiert wurden. Bei diesen Einschlüssen handelte es sich möglicherweise um Triglyceridtröpfchen im Zytoplasma, in denen die zugegebene Fettsäure akkumulierte. Denn nach dem Entfernen des fettsäurereichen Mediums sank die zelluläre Triglyceridkonzentration und die Tröpfchen im Zytoplasma waren zurückgebildet. Wie in der vorliegenden Studie beobachteten die Autoren keine weiteren Veränderungen der morphologischen Eigenschaften, des Zellwachstums und der Zellvitalität der Fettsäure-behandelten Endothelzellen (DENNING et al. 1983).

Daher lässt sich schlussfolgern, dass die im Folgenden diskutierten Effekte der Fettsäure- und bzw. oder Zytokin-Behandlung auf die atheroskleroserelevanten Parameter nicht Folge einer veränderten Zellvitalität bzw. eines veränderten Zellwachstums waren.

#### **4.1 Einfluss der *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf die Bildung vasoaktiver Substanzen in HAoEC**

Der Endothelschicht, als dynamische Schnittstelle zwischen Gefäßwand und zirkulierendem Blut, kommt bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts der Gefäße aufgrund der Produktion und der Freisetzung von Vasodilatoren bzw. -konstriktoren wie den Eicosanoiden, dem NO und dem ET-1 eine bedeutende Rolle zu (VOGEL et al. 1997; KUNSCH u. MEDFORD 1999; PRICE u. LOSCALZO 1999; TOBOREK u. KAISER 1999; PEARSON 2000; COEN et al. 2004). Im gesunden Endothel überwiegt die Vasodi-

lation gegenüber der Vasokonstriktion (TOBOREK u. KAISER 1999). Störungen der vaskulären Homöostase sind stark verbunden mit der Pathogenese der Atherosklerose. Zum einen kann eine verstärkte Vasokonstriktion, als ein bedeutender Faktor bei der Entstehung von Atherosklerose, zu einer erhöhten Beanspruchung und dadurch zu Verletzungen der Gefäßwand führen. Zum anderen kommt es während der Entwicklung der Atherosklerose durch die Inaktivierung der vasodilatatorischen Substanzen zu einer Abschwächung der endothelialen Relaxation der Gefäßwand (LÜSCHER u. NOLL 1995; PEARSON 2000).

#### 4.1.1 Anteile der verwendeten CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen PE und PC

Die Bestimmung der Anteile der beiden CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipidfraktionen gab Aufschluss über das Ausmaß der Inkorporierung des jeweiligen CLA-Isomeres in die Lipide der Endothelzellen.

Bei Fütterungsversuchen mit Ratten und Mäusen wurde nachgewiesen, dass durch eine CLA-angereicherte Diät die CLAs konzentrationsabhängig in die Gesamtlipide verschiedener Gewebe eingebaut wurden (BANNI et al. 1999b; KAVANAUGH et al. 1999). Auch *in vitro*-Studien mit HepG2-Zellen und RAW264.7 Makrophagen zeigten eine dosisabhängige Inkorporierung an CLAs in die Lipide der Zellen (EDER et al. 2002; CHENG et al. 2004).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit führte die Inkubation der HAoEC für 24 h mit beiden CLA-Isomeren auch zu einer konzentrationsabhängigen Inkorporierung des jeweiligen CLA-Isomers in die Gesamtlipide und die beiden Phospholipidfraktionen PC und PE. Dabei waren die Konzentrationen der CLAs in den beiden Phospholipidfraktionen der Endothelzellen, die mit 5  $\mu\text{mol/l}$  beider CLA-Isomere für 24 h inkubiert wurden, annähernd gleich. Die nachgewiesenen CLA-Konzentrationen in den Gesamtlipiden sowie in den Phospholipiden der mit 5  $\mu\text{mol/l}$  CLA-behandelten Endothelzellen lagen in einem Bereich, wie er auch in Gesamtlipiden bzw. Phospholipiden von verschiedenen Tiergeweben nach CLA-Fütterung nachgewiesen wurde (zwischen 0,7 und 2 g/100 g Gesamtfettsäuren) (BANNI et al. 1999a, b; HAYEK et al. 1999; KAVANAUGH et al. 1999; POULOS et al. 2001; LIN et al. 2004).

Die Inkubation der HAoEC mit 50  $\mu\text{mol/l}$  beider CLA-Isomere für 24 h führte zu sehr hohen Konzentrationen der CLAs in den Gesamtlipiden der Zellen, die jenen Anteilen in den Gesamtlipiden muriner Makrophagen nach der Behandlung mit 200  $\mu\text{mol/l}$  CLA entsprach (CHENG et al. 2004). Jedoch zeigten Studien mit anderen Zellmodellen trotz höherer Inkubationskonzentrationen an *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA, im Vergleich zu den Ergebnissen der eigenen Untersuchung, geringere Aufnahmen des jeweiligen CLA-Isomeres in die Gesamtlipide der Zellen (EDER et al. 2002; WELDON et al. 2004). So ist zu vermuten, dass die Inkorporierung der CLA-Isomere zelltypspezifisch ist und HAoEC effektiv mehr CLAs in ihre Zelllipide einbauen können als andere Zellen. Durch die Behandlung der HAoEC mit 50  $\mu\text{mol/l}$  beider CLA-Isomere kam es weiterhin zu hohen Konzentrationen an *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA in der PC-Fraktion, die doppelt so hoch bzw. dreifach höher waren als in der PE-Fraktion. Dies geht mit den Beobachtungen der Studie von BANNI et al. (2001) konform, bei der Ratten eine Diät mit CLA-angereicherter Butter erhielten. Dabei wurden in der PC-Fraktion der Leber 2,5 mal höhere CLA-Konzentrationen als in der PE-Fraktion der Leber nachgewiesen. Die bevorzugte Aufnahme der CLAs in PC zeigen, dass die Höhe der Inkorporierung der CLAs von den einzelnen Phospholipiden abhängig ist. Darüber wurde bereits in verschiedenen Studien berichtet (DU et al. 1999; STANGL 2000b; LEE et al. 2005). Weiterhin ist das Ausmaß der Aufnahme der CLAs in die Zelllipide, neben deren Konzentration und der Inkubationszeit, möglicherweise auch von dem eingesetzten CLA-Isomer bzw. -Gemisch und der Darreichungsform der CLAs (Albumin-gebunden oder als  $\text{Na}^+$ -Salz, frei oder verestert) abhängig (EDER et al. 2002; CHENG et al. 2004).

Zudem ist anzumerken, dass solch hohe CLA-Konzentrationen, wie sie in den Zelllipiden der HAoEC der vorliegenden Arbeit gemessen wurde, bisher nicht in Human- und Tierstudien nachgewiesen wurden. Zum Beispiel lagen im Fettgewebe und im Serum von Männern, die als *cis*-9, *trans*-11 CLA-Quelle eine milchfetteiche Kost erhielten, die mittleren Konzentrationen dieses CLA-Isomers bei 0,5 g bzw. 0,25 g pro 100 g Gesamtfettsäuren (JIANG et al. 1999). In den Lebern von Mäusen, deren Diät 10 g CLAs pro kg enthielt, waren die CLA-Konzentrationen in den Neutrallipiden und Phospholipiden kleiner als 2 g pro 100 g der Gesamtfettsäuren (HAYEK et al. 1999).

Die Literaturbefunde und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Inkubation der Endothelzellen mit 5  $\mu\text{mol/l}$  beider CLA-Isomere zu phy-

siologisch relevanten CLA-Konzentrationen in Gewebelipiden führt, die auch durch CLA-Supplementierung bzw. -angereicherte Diäten in *in vivo*-Studien erreicht werden können. Die Anteile der beiden CLA-Isomere in den Gesamtlipiden und den Phospholipiden durch die Behandlung der HAoEC mit 50  $\mu\text{mol/l}$  waren sehr viel höher als bisher im Gewebe bei *in vivo*-Versuchen nachgewiesen wurde. Jedoch können im Blut von Nicht-Vegetariern durchaus CLA-Konzentrationen von 20–70  $\mu\text{mol/l}$  erreicht werden (FORGERTY et al. 1988). Dies zeigt, dass auch die verwendete CLA-Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  in einem physiologisch relevanten Bereich liegt.

#### 4.1.2 Die Eicosanoidsynthese

Untersuchungen deuten darauf hin, dass CLAs durch die Inkorporierung in die Zelllipide senkend auf die AA-Konzentration wirken, was zu einer Verminderung der Eicosanoidsynthese führt (AGATHA et al. 2004; CHENG et al. 2004). Die vorliegende Studie zeigte erstmalig, dass die CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA in HAoEC auf verschiedene Faktoren, die für die Eicosanoidsynthese bedeutend sind, wirken. Welchen Einfluss die Aufnahme der CLA-Isomere in die Zelllipide der Endothelzellen auf diese Faktoren im Einzelnen ausübte, wird in diesem Kapitel diskutiert.

Die Endothelzellen regulieren den Gefäßtonus durch die Produktion und die Freisetzung von Relaxations- und Konstriktionsfaktoren, z. B. den Eicosanoiden. Eicosanoide sind biologische Signalmoleküle, die als lokale Botenstoffe in unmittelbarer Umgebung der sie erzeugenden Zellen wirken. Sie sind Derivate mehrfach ungesättigter C20-Fettsäuren, insbesondere von AA (C20:4 n-6). Durch hormonelle und andere Signale wird AA durch PLA<sub>2</sub> aus den Membranphospholipiden freigesetzt. AA wird unter dem Einfluss von COX zu Prostaglandinen und Thromboxanen der Serie 2 metabolisiert (KOOLMAN u. RÖHM 1998; LEHNINGER et al. 1998; TOBOREK u. KAISER 1999; REHNER u. DANIEL 2002; KASPER 2004) (siehe Abb. 4.1 auf Seite 77).

Im Endothel wirken die Eicosanoide PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> bei der Regulierung des Gefäßtonus als Antagonisten. PGI<sub>2</sub> ist einer der wichtigsten Vasodilatoren, dessen bedeutendster Gegenspieler das TXA<sub>2</sub>, ein Vasokonstriktor, ist. Weiterhin hemmt PGI<sub>2</sub> die Blutplättchenaggregation, während TXA<sub>2</sub> diese fördert. Auch die Eicosanoide PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  wurden bereits in verschiedenen Endothelzelltypen nachgewiesen

(SCHRÖR 1985; KARLSON et al. 1994; LÖFFLER u. PETRIDES 1997; URQUHART et al. 2001). PGE<sub>2</sub> ist ein schwächerer Vasodilatator des Endothels (MONCADA u. VANE 1984; MACLOUF et al. 1998). PGF<sub>2α</sub> hingegen ist ein schwacher Vasokonstriktor, der nur in höheren Dosen wirksam ist und teilweise antagonistisch auf PGE<sub>2</sub> wirkt (FORTH et al. 1998).

Diverse Studien an Zellsystemen, wie murinen Makrophagen, Hepatomazellen von Ratten und mononukleäre Zellen des peripheren Bluts vom Schwein, die mit einzelnen CLA-Isomeren bzw. CLA-Gemischen inkubiert wurden, setzten gegenüber den unbehandelten Zellen weniger PGE<sub>2</sub> frei (IWAKIRI et al. 2002; YAMASAKI et al. 2002; YU et al. 2002; CHENG et al. 2004; CHANGHUA et al. 2005). Aber auch in tierexperimentellen Studien mit Ratten, Schweinen und Mäusen, die CLA-Diäten erhielten, wurde eine Reduzierung der PGE<sub>2</sub>- bzw. PGF<sub>2α</sub>-Freisetzung nachgewiesen (SUGANO et al. 1998; HAYEK et al. 1999; KAVANAUGH et al. 1999; HARRIS et al. 2001; YAMASAKI et al. 2002; CHANGHUA et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der beiden CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf die Freisetzung der Eicosanoide PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und TXA<sub>2</sub> aus den HAoEC untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Endothelzellen, die mit 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubiert wurden, deutlich weniger Eicosanoide freisetzten als die unbehandelten Endothelzellen. In früheren Studien mit CLA behandelten humanen venösen Endothelzellen wurde bereits ein Effekt dieser konjugierten Fettsäuren auf die Freisetzung verschiedener Eicosanoide aus den Zellen beobachtet (URQUHART et al. 2002; TORRES-DUARTE u. VANDERHOEK 2003). Der Versuch von TORRES-DUARTE u. VANDERHOEK (2003) zeigte eine Reduzierung der Thrombin-stimulierten Freisetzung von PGI<sub>2</sub> aus den Endothelzellen durch die Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA, während die Zellen, die nicht mit Thrombin stimuliert wurden, mehr PGI<sub>2</sub> freisetzten. Dies lässt vermuten, dass die Effekte der CLAs für stimulierte und unstimulierte Zellen verschieden sein können. Jedoch verminderte die Behandlung mit 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA sowohl die mit Calcium-Ionophor A23187 stimulierte als auch die basale Bildung verschiedener Eicosanoide in humanen venösen Endothelzellen (URQUHART et al. 2002). Auch in einer Studie mit BAEC hatten CLAs einen senkenden Effekt auf die 6-keto PGF<sub>1α</sub>-Menge im Medium (COEN et al. 2004). Die Ergebnisse dieser

beiden Studien sind mit den Befunden der eigenen Arbeit vergleichbar (URQUHART et al. 2002; COEN et al. 2004).

Wie bereits beschrieben, sind  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und  $\text{TXA}_2$  Mitglieder der Eicosanoidfamilie der Serie 2 und werden aus der AA in den Endothelzellen gebildet (VOET u. VOET 1994; MICHAL 1998). Studien mit verschiedenen Zellsystemen und Tiermodellen zeigen, dass CLAs senkend auf die AA-Konzentration in Zell- und Gewebelipiden wirken (STANGL 2000a; POULOS et al. 2001; RAES et al. 2002; YANG et al. 2002; AGATHA et al. 2004; CHENG et al. 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit war die AA-Konzentration in den Phospholipiden und den Gesamtlipiden der CLA-behandelten Endothelzellen dosisabhängig vermindert. URQUHART et al. (2002) fanden heraus, dass die CLA-Isomere die AA-Inkorporierung in die Phospholipide von humanen Endothelzellen reduzierten. Dies lässt darauf schließen, dass die verminderte Bildung der Eicosanoide auf eine geringere Verfügbarkeit der AA, als Vorstufe der Eicosanoide, aus den Phospholipiden der Endothelzellen zurückgeführt werden kann.

Die AA wird, wie bereits erwähnt, für die Eicosanoidsynthese aus den Membranphospholipiden durch  $\text{PLA}_2$  freigesetzt (TOBOREK u. KAISER 1999).  $\text{PLA}_2$  katalysieren die Hydrolyse von Esterbindungen an der sn-2-Position der Membranphospholipide (DENNIS 1994; YUAN et al. 1995; CUPILLARD et al. 1997; ÖST et al. 1998; RIZZO et al. 2000). Abhängig von ihrem Molekulargewicht werden die  $\text{PLA}_2$  in zwei Gruppen untergliedert, die niedermolekulare Form, die hier untersuchte  $\text{sPLA}_2$ , und die hochmolekulare Form bzw. zytosolische  $\text{PLA}_2$  ( $\text{cPLA}_2$ ), welche kooperativ die AA-Freisetzung regulieren können (HOULISTON u. WHEELER-JONES 2001). Die  $\text{sPLA}_2$  wird konstitutiv in humanem Gewebe, unter anderem im kardiovaskulären System sowie in Endothelzellen, exprimiert. Durch proinflammatorische Stimuli kann die Expression des Enzyms verstärkt induziert werden (LYONS-GIORDANO et al. 1989; OKA u. ARITA 1991; BALSINDE et al. 1999; BERNATCHEZ et al. 2001; MURAKAMI u. KUDO 2002; NIESSEN et al. 2003).

Studien über den Einfluss der CLAs auf die  $\text{sPLA}_2$ -Aktivität bzw. -Genexpression gibt es bisher nicht. Frühere Untersuchungen zeigten aber, dass ungesättigten Fettsäuren hemmend auf die Aktivität der  $\text{sPLA}_2$  wirken (LISTER et al. 1988; RAGHUPATHI u. FRANSON 1992; ALAOU-EL-AZHER et al. 2000). So führte die Behandlung von

Alveolarmakrophagen von Meerschweinchen mit AA, Ölsäure (OA) bzw. Eicosapentaensäure (EPA) zu einer Verminderung der sPLA<sub>2</sub>-Aktivität und -Genexpression (ALAOUI-EL-AZHER et al. 2000).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikant verminderte sPLA<sub>2</sub>-Aktivität im Überstand der HAoEC, die mit 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA behandelt wurden, sowie eine tendenzielle Inhibierung ( $P < 0,1$ ) der Aktivität des Enzyms in den mit *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubierten Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse wurden durch verminderte mRNA-Konzentrationen der sPLA<sub>2</sub> in den mit 50 µmol/l CLA behandelten Zellen bestätigt. Die Ergebnisse der eigenen Studie zeigen, dass die CLA-Isomere in der Lage sind, wie nicht-konjugierte Fettsäuren, die Aktivität und die mRNA-Konzentration der sPLA<sub>2</sub> zu vermindern. Dies deutet darauf hin, dass der hemmende Effekt auf die sPLA<sub>2</sub>-Aktivität nicht CLA-spezifisch ist.

Es wird berichtet, dass die ungesättigten Fettsäuren die sPLA<sub>2</sub>-Genexpression durch eine veränderte Aktivität der Transkriptionsfaktoren bzw. Stabilität der mRNA beeinflussen (LONG u. PEKALA 1996; RACLOT et al. 1997). Zudem kann die Expression des induzierbaren sPLA<sub>2</sub>-Gens in Abhängigkeit von der Spezies über verschiedene Transkriptionsfaktoren wie PPARs, NF- $\kappa$ B und CCAAT/Enhancer-Bindungsprotein (C/EBP) reguliert werden (TOUQUI u. ALAOUI-EL-AZHER 2001; MURAKAMI u. KUDO 2002; NIESSEN et al. 2003). Vermutlich lässt sich die in der eigenen Studie beobachtete hemmende Wirkung der CLAs auf die Genexpression der sPLA<sub>2</sub> und deren Aktivität durch eine Veränderung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren, wie PPARs, NF- $\kappa$ B und C/EBP, in den HAoEC erklären.

Aus der freigesetzten AA werden, wie bereits erwähnt, über den COX-Weg die Eicosanoide gebildet. Dabei wird die AA durch COX (COX-1, COX-2) zu PGH<sub>2</sub> als so genannte Muttersubstanz umgesetzt, aus der anschließend organspezifisch durch die Reduktion und Isomerisierung unter dem Einfluss verschiedener Synthasen und Isomerasen die PGs und TXs gebildet werden (MIRALPEIX et al. 1997; CAMACHO et al. 1998; MARKS u. FÜRSTENBERGER 1999). Die COX-1 gilt als konstitutiv exprimiertes Enzym, das ein konstantes Expressionsniveau aufweist. Die COX-2 hingegen wird unter basalen Bedingungen in den meisten Geweben nur in sehr geringen Mengen exprimiert und durch viele endogene und exogene Stimuli einschließlich proinflammatorischer Stimuli verstärkt induziert (KARIM et al. 1996; MIRALPEIX et al. 1997; CAMACHO

et al. 1998; MARKS u. FÜRSTENBERGER 1999; CAUGHEY et al. 2001; URQUHART et al. 2001). Jedoch wurde die COX-2 bereits auch in unstimulierten Endothelzellen nachgewiesen (CAMACHO et al. 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten diese Befunde, denn in den un-behandelten HAoEC (Kontrolle) war die mRNA der COX-2 meßbar. In den HAoEC, die mit 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA behandelt wurden, war die Genexpression des induzierbaren Enzyms COX-2 vermindert. Die mit 50 µmol/l *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubierten HAoEC zeigten eine ähnliche Tendenz ( $P < 0,1$ ). Bereits in früheren Studien an murinen Makrophagen und Hepatomazellen wurde eine reduzierte Genexpression der COX-2 durch die Behandlung mit verschiedenen CLA-Isomeren beobachtet (YAMASAKI et al. 2002; YU et al. 2002; CHENG et al. 2004). Die beiden Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA hatten aber keinen Einfluss auf die Genexpression der COX-1.

Im Gegensatz zum COX-1-Gen, als so genanntes Haushaltsgen, besitzt der Promotor des induzierbaren COX-2-Gens eine TATA-Box und Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- $\kappa$ B, Ets und C/EBP. Deshalb wird die Genexpression der COX-2 durch ein breites Spektrum von zellulären Signalen reguliert (HINZ u. BRUNE 2002). Vermutlich wirken die CLA-Isomere in höheren Konzentrationen inhibierend auf Transkriptionsfaktoren, die an Promotorstellen des COX-2-Gens binden können (MARKS u. FÜRSTENBERGER 1999; HINZ u. BRUNE 2002). YU et al. (2002), die nicht nur eine Verminderung der Genexpression der COX-2 sondern auch eine geringere COX-2 Promotoraktivität in CLA-behandelten Makrophagen beobachteten, erklärten dies sogar mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$ , der inhibierend auf die Aktivität von NF- $\kappa$ B, AP-1 und STAT wirkt (NUGTEREN u. CHRIST-HAZELHOF 1987; BELURY 2002; YU et al. 2002). Die Autoren stellten darüber hinaus eine direkte Korrelation zwischen der Genexpression der COX und der Bildung der Eicosanoide in Zellen, die mit CLAs behandelt wurden, fest (IWAKIRI et al. 2002; YAMASAKI et al. 2002; YU et al. 2002).

Die Literaturbefunde und die eigenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die CLA-Isomere auf die Genexpression der COX-2 über die Aktivierung des PPAR $\gamma$  und dadurch senkend auf die Aktivität des Isoenzym bzw. die Umsetzung von AA zu PGH $_2$  wirken.

Die AA wird durch  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Desaturierung aus LA in den Endothelzellen gebildet (ROSENTHAL u. WHITEHURST 1983). Dabei ist die  $\Delta 6$ -Desaturase bei der Bildung von AA aus LA das limitierende Enzym. Vermutlich können geringere Konzentrationen an AA in den Phospholipiden und den Gesamtlipiden der CLA-behandelten Endothelzellen, neben der verminderten Inkorporierung dieser n-6-Fettsäure, auch auf eine reduzierte Aktivität der  $\Delta 6$ -Desaturase zurückgeführt werden (SUGANO et al. 1999; LIN et al. 2004). Die Ergebnisse der eigenen Studie bestätigten diese Hypothese. Der Quotient aus AA und LA, ein Index für die  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivitäten, war durch die Behandlung der Endothelzellen mit den CLA-Isomeren in den Phospholipiden konzentrationsabhängig reduziert. *In vitro*- und *in vivo*-Studien zeigten ebenfalls, dass verschiedene CLA-Isomere die  $\Delta 6$ -Desaturierung von LA unterdrückten, was zu einer verminderten AA-Konzentration in Zell- oder Gewebelipiden führte (BRETILLON et al. 1999; CHUANG et al. 2001; EDER et al. 2002; AGATHA et al. 2004). Als eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen ist die Konkurrenz zwischen CLAs und LA um die  $\Delta 6$ -Desaturase zu nennen. Aufgrund ihrer ähnlichen Struktur zu LA werden CLAs, analog zu LA, über das gleiche Enzymsystem metabolisiert. Sie werden zu höher ungesättigten Molekülen, wie konjugierte Octadecatriensäure (CD18:3), Eicosatriensäure (CD20:3) und Eicosatetraensäure (CD20:4), desaturiert und verlängert (SEBEDIO et al. 1997; BANNI et al. 1999a, b; SUGANO et al. 1999; LEE et al. 2001; RAES et al. 2002; BANNI et al. 2004). Die verschiedenen CLA-Metabolite haben an Bedeutung gewonnen, seit gezeigt wurde, dass sie wie CLA-Isomere selbst biologisch aktiv sind (SEBEDIO et al. 1997; BULGARELLA et al. 2001; SEBEDIO et al. 2001). So wirkte CD20:2, wie CLAs, reduzierend auf den Körperfettanteil in Ratten (PARK et al. 2005). In einer anderen Studie hemmten CD18- und CD20-Fettsäuren die Aktivität der COX (NUGTEREN u. CHRIST-HAZELHOF 1987).

Auch in der eigenen Studie waren die Anteile bestimmter CD-Fettsäuren, verglichen mit denen der unbehandelten Zellen, durch die Inkubation der Zellen mit den CLA-Isomeren konzentrationsabhängig erhöht. Jedoch wurden nur CD16:2- und CD20:2-Fettsäuren in den CLA-behandelten HAoEC nachgewiesen. Durch peroxisomale  $\beta$ -Oxidation können CLA-Isomere zu CD-Fettsäuren wie CD12:2, CD14:2 und CD16:2 metabolisiert bzw. verkürzt werden (BANNI et al. 1999a, 2004; PARK et al. 2005). CD16-Fettsäuren repräsentieren in den meisten Geweben etwa 20 % der gesamten CLA-Metabolite (COOK et al. 2000). Die Elongation der CLA-Isomere zu CD20:2 Fettsäuren erfolgt vermutlich

enzymatisch (PARK et al. 2005). Andere CD-Fettsäuren wie CD20:3 und CD20:4, typische Elongation-Desaturationsprodukte der CLAs, waren in den Endothelzellen nicht meßbar. In verschiedenen CLA-behandelten Leukämie-Zelllinien und im Lebergewebe von CLA-gefütterten Ratten wurden hingegen Elongation-Desaturationsprodukte der CLAs nachgewiesen (BANNI et al. 2001; SEBEDIO et al. 2001; AGATHA et al. 2004; BANNI et al. 2004). Dieser Gegensatz ist durch die Tatsache zu erklären, dass vaskuläre Endothelzellen, verglichen mit anderen Zell- und Gewebetypen, möglicherweise eine geringere Kapazität haben, Fettsäuren zu elongieren und zu desaturieren.

Es darf auch nicht außer Acht gelassen werden, dass in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Konzentration der  $\Delta 6$ -Desaturase durch die Behandlung mit den CLA-Isomeren vermindert wurde; wobei es in den mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *trans*-10, *cis*-12 CLA behandelten HAoEC zu einer stärkeren Reduzierung der mRNA-Konzentration des Enzyms (signifikant) als in den mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA inkubierten HAoEC (tendenziell mit  $P < 0,1$ ) kam. Unverändert blieb jedoch die mRNA-Konzentration der  $\Delta 5$ -Desaturase durch die CLA-Inkubation. So scheint die verminderte mRNA-Konzentration der  $\Delta 6$ -Desaturase eine weitere mögliche Erklärung zu sein, weshalb in der eigenen Studie in den Lipiden der CLA-behandelten Endothelzellen auf der einen Seite keine Elongation-Desaturationsprodukte der CLA-Isomere, wie CD20:3 und CD20:4, und auf der anderen Seite geringere AA-Konzentrationen nachgewiesen wurden. Hinweise über die Regulierung dieses Enzyms geben Untersuchungen an Zellsystemen wie HepG2-Zellen. Hier wurde die Expression der  $\Delta 6$ -Desaturasen durch n-6- und n-3-Fettsäuren transkriptionell über einen Feedback-Mechanismus gehemmt (NAKAMURA u. NARA 2002; NARA et al. 2002; SONG et al. 2002b; TANG et al. 2003). In der eigenen Studie könnten die CLA-Isomere möglicherweise auf die gleiche Weise wie n-6- und n-3-Fettsäuren auf die Expression und die Aktivität der  $\Delta 6$ -Desaturase in den Endothelzellen gewirkt haben.

Die Literaturbefunde und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass HAoEC in der Lage sind, CLA-Isomere durch Elongation bzw. Verkürzung in geringem Umfang zu metabolisieren. Der verminderte AA/LA-Quotient und die reduzierte mRNA-Konzentration der  $\Delta 6$ -Desaturase durch die CLAs deuten darauf hin, dass die CLA-Isomere in den Endothelzellen nicht nur mit der LA um dieses Enzym konkurrierten, sondern dessen Expression und Aktivität sogar hemmten. Denn auch

typische Elongation-Desaturationsprodukte der CLA-Isomere wurden in den HAoEC nicht nachgewiesen.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist zu vermuten, dass die akkumulierten CLA-Isomere in den HAoEC die AA-Inkorporierung reduzierten und die Metabolisierung der LA zu AA hemmten, da es zu einer verminderten Konzentration der AA in den Gesamtlipiden und den Phospholipiden kam. Die reduzierte AA-Konzentration, die verminderte mRNA-Konzentration der sPLA<sub>2</sub> und deren Aktivität in den mit 50 µmol/l CLA behandelten Endothelzellen führten wahrscheinlich zu einer verminderten Verfügbarkeit der AA, als Substrat für die Synthese der Eicosanoide, aus den Phospholipiden. Daraus folgend lässt sich die verminderte Freisetzung aller untersuchten Eicosanoide der Endothelzellen erklären, die wahrscheinlich zum Teil transkriptionell durch die reduzierte mRNA-Expression der COX-2 blockiert wurde. An dieser Stelle sei angemerkt, dass durch die Behandlung der HAoEC mit den CLA-Isomeren nur die Genexpressionen der durch proinflammatorische Stimuli-induzierbaren Enzyme sPLA<sub>2</sub> und COX-2, nicht aber die Genexpression des konstitutiven Isoenzym COX-1, negativ beeinflusst waren. Auch RINGSEIS et al. (2006) weisen auf einen senkenden Effekt der CLA-Isomere auf die Expression proinflammatorischer Gene, wie die der COX-2 oder cPLA<sub>2</sub>, hin. Die Autoren konnten ebenfalls keinen Einfluss der beiden CLA-Isomere auf die COX-1 nachweisen.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen un- und behandelten und den mit CLA behandelten Endothelzellen im Verhältnis von PGI<sub>2</sub> zu TXA<sub>2</sub> bzw. 6-keto PGF<sub>1α</sub> zu TXB<sub>2</sub>, das für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase entscheidend ist, gab. Ein Verschieben des Verhältnisses zwischen PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> zugunsten des TXA<sub>2</sub> führt zu einer verstärkten Vasokonstriktion, die, wie in Kapitel 4.1 auf Seite 62 beschrieben, ein bedeutender Faktor bei der Entstehung der Atherosklerose ist (BUNTING et al. 1983; OATES et al. 1988; LÖFFLER u. PETRIDES 1997). Die Befunde der eigenen Studie zeigen, dass die beiden CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf das Verhältnis zwischen PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> in den HAoEC weder einen positiven noch einen negativen Effekt hatten.

### 4.1.3 Die NO-Synthese

Der Vasodilatator NO des Endothels, auch bekannt als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF), trägt ebenfalls entscheidend zur Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts bei (FORTH et al. 1998; TOBOREK u. KAISER 1999; VASSALLE et al. 2003). Weiterhin verhindert NO die Neutrophilen- bzw. Blutplättchenadhäsion zu den Endothelzellen und deren Aggregation, kontrolliert die Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen, hält die Endothelzellbarrierefunktion aufrecht und reguliert den programmierten Zelltod (WANG et al. 2003). Es ist ein lokal wirkender Mediator und das kleinste endogen gebildete bioaktive Molekül – ein freies Radikal, das innerhalb von Sekunden ( $t_{1/2} = 5\text{--}30\text{ sec}$ ) in seine stabilen Oxidationsprodukte Nitrat und Nitrit umgewandelt wird (KNOWLES u. MONCADA 1992; BUTLER et al. 1995; SOINI et al. 2001).

Studien an Makrophagen zeigten, dass CLAs die NO-Bildung beeinflussen. Hier wurde eine verminderte Nitritmenge in CLA-behandelten murinen Makrophagen nachgewiesen (IWAKIRI et al. 2002; YU et al. 2002; CHENG et al. 2004). Systematische Untersuchungen zur Wirkung von CLAs auf die NO-Synthese in humanen vaskulären Endothelzellen fehlen bislang. In der vorliegenden Studie wurde erstmals dieser Einfluss der CLAs auf die Bildung des NO über die Mengenbestimmung an freigesetzten Nitrat und Nitrit aus humanen arteriellen Endothelzellen untersucht. Es zeigte sich, dass die HAoEC, die mit  $50\text{ }\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. mit 5 oder  $50\text{ }\mu\text{mol/l}$  *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubiert wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Endothelzellen weniger Nitrat und Nitrit freisetzen. In einer neueren Studie mit BAEC wurden hingegen keine Veränderungen der Nitritbildung durch die Behandlung mit CLAs beobachtet, was möglicherweise mit den geringeren Konzentrationen ( $< 4\text{ }\mu\text{mol/l}$ ) der verwendeten CLAs zu erklären ist (COEN et al. 2004).

Für die NO-Synthese werden viele Cofaktoren, wie molekularer Sauerstoff, NADPH, Flavin-Mononucleotid, Flavin-Adeninnucleotid, Tetrahydrobiopterin und Calmodulin, benötigt. Zudem hängt die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin von der Aktivität der NOS ab (siehe Abb. 4.1 auf Seite 77), von denen bisher 3 Isoformen identifiziert wurden. Die eNOS und die neuronale (nNOS) sind konstitutiv exprimierte NOS. Die Synthese der iNOS wird von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst (FORTH et al. 1998; TOBOREK u. KAISER 1999; SOINI et al. 2001; NOH et al. 2002;

WANG et al. 2003). Es ist bekannt, dass auch die Expression der eNOS und der nNOS durch verschiedene Stimuli (z. B. Östrogene, Glukokortikoide) induziert werden kann. Für die Regulierung der endothelialen NO-Synthese unter natürlichen physiologischen Bedingungen ist die eNOS das entscheidende Enzym. Als so genanntes konstitutiv exprimiertes (Haushaltsgen) Enzym wird die Expression der eNOS vor allem über posttranskriptionelle Modifikationen reguliert (HARRISON et al. 1996; FLEMING u. BUSSE 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Konzentration der eNOS in den Endothelzellen bestimmt, um möglicherweise Rückschlüsse auf die verminderte NO-Freisetzung ziehen zu können. Dabei zeigte sich in der relativen mRNA-Konzentration der eNOS zwischen den Kontrollzellen und den CLA-behandelten Zellen kein signifikanter Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass die Inkubation der Endothelzellen mit CLA-Isomeren zu keiner Veränderung der Transkriptionsrate des eNOS-Gens führte. Vermutlich hemmten die CLAs die NO-Produktion durch Modifikationen der Aktivität der eNOS auf co- und/oder posttranslationaler Ebene. Denn die NO-Synthese wird, wie bereits beschrieben, durch eine Reihe von Cofaktoren und Ereignissen, wie dem intrazellulären Calciumspiegel, deren Phosphorylierung, der intrazellulären Lokalisation der eNOS sowie verschiedenen Interaktionen des eNOS-Proteins mit anderen Proteinen bestimmt (RÖSEN 2002; CHISAKI et al. 2003; SARASWATHI et al. 2004). Jedoch muss ebenfalls ein möglicher Einfluss der iNOS auf die NO-Produktion berücksichtigt werden, da auch dieses Isoenzym in unstimulierten Endothelzellen nachgewiesen wurde (IWASHINA et al. 1996; BINION et al. 1998; HOFFMANN et al. 1999). In verschiedenen Studien wurde durch die Behandlung von murinen Makrophagen mit CLAs eine Verminderung der Expression der iNOS (mRNA, Protein) beobachtet (IWAKIRI et al. 2002; YU et al. 2002; CHENG et al. 2004). Deshalb ist zu vermuten, dass der hemmende Effekt der CLA-Isomere auf die NO-Freisetzung auch auf einer Veränderung der iNOS-Genexpression bzw. -Aktivität zurückzuführen ist.

Die eigenen Beobachtungen und die Befunde aus der Literatur lassen darauf schließen, dass die CLA-Isomere nicht über eine veränderte Genexpression der eNOS auf die NO-Freisetzung, vermutlich aber auf eine modifizierte Expression und Aktivität des Enzyms wirken, die von posttranskriptionellen und einer Vielzahl von posttranslationalen Ereignissen abhängig ist. Eine transkriptionelle Regulation der iNOS durch die CLA-Isomere auf die Endothelzellen ist ebenfalls nicht auszuschließen.

#### 4.1.4 Die Endothelin-1-Freisetzung

Neben den Eicosanoiden und dem NO ist auch das vasokonstriktorische Peptid ET-1 an der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts beteiligt. ET-1 gehört zur Gruppe der Endotheline. Nur ET-1 wird in Endothelzellen aus dem Präkursor *bigET-1* durch das *endothelin-converting-enzyme-1* (ECE-1) synthetisiert. Das aus 21 Aminosäuren und zwei Disulfidbindungen bestehende Peptid ist an der Regulation des Gefäßtonus und der Proliferation der glatten Muskelzellen beteiligt (YANAGISAWA et al. 1988; BOULANGER et al. 1992; MASAKI 1995; WARNER u. KLEMM 1996; DELERIVE et al. 1999; WARNER 1999; HAUG et al. 2000; TCHEKNEVA et al. 2000; OREM et al. 2001; ROSSI et al. 2001; SCHIFFRIN 2001; GORACA 2002; DANCU et al. 2004; HAI et al. 2004; IHLING et al. 2004; MARTIN-NIZARD et al. 2004). ET-1 agiert durch die Stimulation spezifischer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, den so genannten A (ET<sub>A</sub>) und B (ET<sub>B</sub>) Rezeptoren. Es wirkt über die ET<sub>A</sub>-Rezeptoren auf die glatte Gefäßmuskulatur vasokontrahierend, während die ET<sub>B</sub>-Rezeptoren auf dem Gefäßendothel zur Freisetzung von Vasodilatoren, wie NO und PGI<sub>2</sub>, führen. Im Plasma eines normalen gesunden Organismus ist ET-1 in geringen Konzentrationen verfügbar und wirkt vasodilatatorisch (HAYNES et al. 1995; GELLAI et al. 1996; LÜSCHER u. NOLL 1996) (siehe Abb. 4.1 auf Seite 77). Die Vasodilatoren NO und PGI<sub>2</sub> sind aber auch in der Lage, die Synthese von ET-1 zu hemmen (LERMAN et al. 1995; HALCOX et al. 2001; GORACA 2002).

Literaturdaten bzw. Untersuchungen zum Einfluss der CLAs auf die ET-1-Produktion gibt es bislang nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, wie CLA-Isomere auf die ET-1-Freisetzung wirken. Generell setzten die HAOEC während einer Stunde Inkubationszeit in HBSS wenig ET-1 frei. Es zeigte sich, dass die Zellen, die mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11* CLA behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrollzellen, weniger ET-1 freisetzten. Eine ähnliche Tendenz ( $P < 0,1$ ) wiesen die mit *trans-10, cis-12* CLA inkubierten Zellen auf. In einer Studie mit BAEC, bei der die Zellen mit der n-6-Fettsäure AA behandelt wurden, wurde eine Erhöhung der Konzentration des ET-1 über die Induzierung der ET-1-Genexpression nachgewiesen (RIZZO u. YU 1999). Die Autoren vermuteten, dass die gestiegene ET-1-Produktion durch die AA auf eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 zurückzuführen ist. AA kann AP-1 und somit auch dessen Zielgene, die wie ET-1 ein AP-1-Motiv in ihrer Promotorregion aufweisen, aktivieren (DELERIVE et al. 1999; RIZZO u. YU 1999; BECUWE et al. 2003;

HSU et al. 2004). Die Behandlung von HUVEC mit der n-3-Fettsäure EPA führte hingegen zu einer Verminderung der ET-1-Bildung sowie deren mRNA-Konzentration (CHISAKI et al. 2003). In einem anderen Versuch an humanen Endothelzellen reduzierte EPA die AA-Konzentration (OKUDA et al. 1997). Dies deutet darauf hin, dass die verminderte ET-1-Freisetzung möglicherweise durch eine reduzierte AA-Konzentration erklärt werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstreichen diese Hypothese, da die ET-1-Freisetzung und die AA-Konzentration in den CLA-behandelten Endothelzellen vermindert waren. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass CLAs als potente Inhibitoren proinflammatorischer oxidativer Prozesse auf den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor AP-1 wirken (RICOTE et al. 1998; IWAKIRI et al. 2002). In Enterozyten verminderte *cis*-9, *trans*-11 CLA die Aktivität des AP-1 (LAMPEN et al. 2005). DELERIVE et al. (1999) berichteten davon, dass PPAR-Liganden wie CLAs auf transkriptioneller Ebene agierten und den AP-1-Signaltransduktionsweg hemmten, was dadurch zur Inhibierung der Promotoraktivität des ET-1-Gens führte. So lässt sich vermutlich eine verminderte ET-1-Freisetzung auch mit einem direkten hemmenden Einfluss der CLAs auf die Aktivität des AP-1 erklären. Da ET-1 in gesunden Endothelzellen die NO-Freisetzung über den ET<sub>B</sub>-Rezeptor vermittelt (DEMUTH et al. 1999), lassen sich die reduzierten Nitrat- und Nitritmengen der eigenen Studie möglicherweise auch auf die verminderte ET-1-Freisetzung zurückführen.

Die Literaturdaten und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass die CLA-Isomere vermutlich durch eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 senkend auf die Bildung und dadurch auf die Freisetzung des ET-1 aus den Endothelzellen wirken.

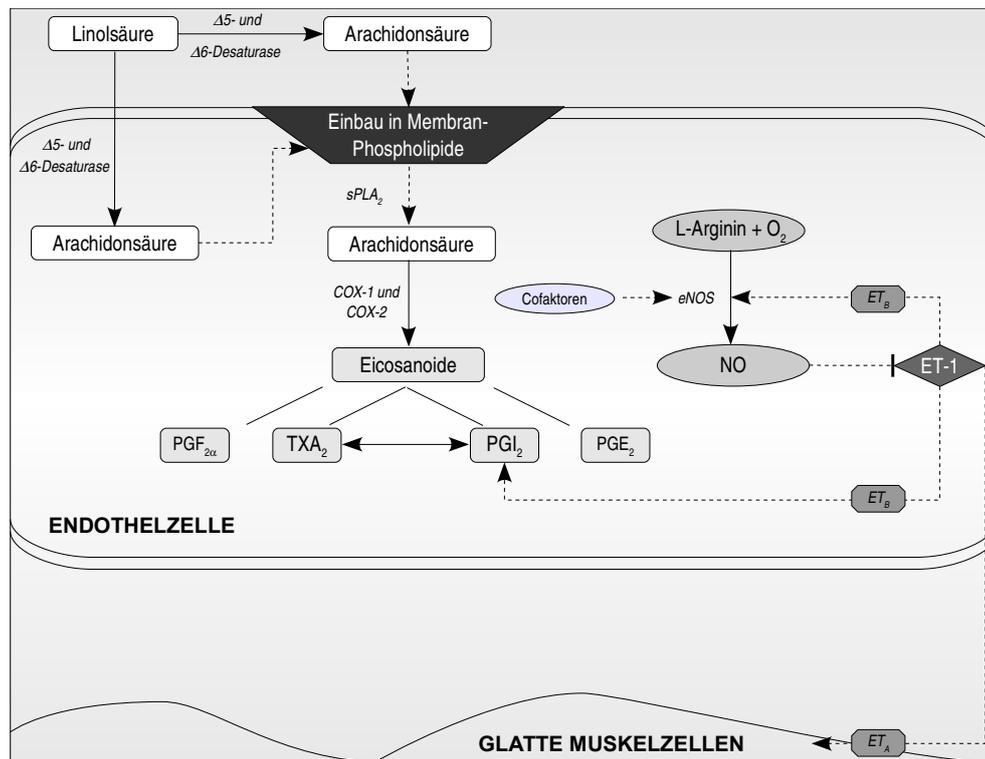


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Bildung der vasoaktiven Substanzen Eicosanoide, NO und Endothelin-1 in einer Endothelzelle.

## 4.2 Einfluss von *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA und Linolsäure auf proinflammatorische Parameter in HAoEC

Wiederholte oder kontinuierliche Schädigungen des Endothels durch Einflüsse bzw. Faktoren, wie Gefäßtrauma, Hypertonie, Chemotherapeutika, erhöhtes Serumcholesterin, freie Radikale und Sauerstoffmangel, können zu Endothelschädigungen führen (LEITZMANN et al. 2001; COEN et al. 2004). Die Verletzung des Endothels steht bei der Entstehung der Atherosklerose nach der »Response-to-injury«-Theorie bzw. Verletzungstheorie von Ross im Vordergrund (ROSS u. GLOMSET 1973; ROSS 1993, 1999). Die Adhäsion der Monozyten zur Arterienwand, deren Transmigration in den subendothelialen Raum und die Akkumulation von Lipiden sind Folgeprozesse von Dysfunktionen des Endothels und frühe Schritte der Atherogenese (DUSTIN et al. 1986; COLLINS

1993; LEITZMANN et al. 2001; COEN et al. 2004). Der Verlust der endothelialen Barrierefunktion begünstigt eine verstärkte Bildung von Schaumzellen und somit die Entstehung von Läsionen im subendothelialen Raum. Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle in atherosklerotischen Läsionen und Plaques die Monozyten-Endothelzellen-Interaktion fördert (DAVIES et al. 1993; PRICE u. LOSCALZO 1999). Durch Chemokine wie MCP-1 und IL-8, die zirkulierende Monozyten rekrutieren, und Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin, die auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert werden, wird die Interaktion zwischen Monozyten und Arterienwand vermittelt (DAVIES et al. 1993; KOCH et al. 1993; BROWN et al. 1994; BERKHOUT et al. 1997; TERKELTAUB et al. 1998; GERSZTEN et al. 1999; KRISHNASWAMY et al. 1999; PRICE u. LOSCALZO 1999; SHIN et al. 2002; YANG et al. 2004) (siehe Abb. 4.2 auf Seite 86).

In verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien wurden bereits antiinflammatorische und antiatherogene Wirkungen der CLAs nachgewiesen (KRITCHEVSKY et al. 2000; YU et al. 2002; TOOMEY et al. 2003; CHENG et al. 2004). Über keine bzw. fördernde Effekte der CLAs auf die Fettstreifenbildung wurde in wenigen Untersuchungen an Mäusen, Hamstern und Kaninchen berichtet (LEE et al. 1994; NICOLosi et al. 1997; MUNDAY et al. 1999). Im Vergleich dazu zeigte die vorliegende Studie erstmalig umfassend, wie die CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf Parameter der frühen Atherogenese in Zytokin-stimulierten humanen arteriellen Endothelzellen wirken. Um den Einfluss der CLA-Isomere auf inflammatorische atherogene Parameter zu untersuchen, wurden die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, die Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8 sowie die Monozytenadhäsion von HAoEC untersucht. Da proinflammatorische Parameter durch Zytokine, wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 und Interferon $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ), induziert werden können, wurden die Endothelzellen mit  $\text{TNF}\alpha$  behandelt (DAVIES et al. 1993; PRICE u. LOSCALZO 1999). Die nachgewiesenen  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Effekte auf die proinflammatorischen Parameter der HAoEC sind mit Beobachtungen anderer Versuche vergleichbar (KOGA et al. 2002; LIU et al. 2004). Zwischen den Zytokin-stimulierten Kontrollzellen und den Zellen, die mit *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA behandelt wurden, gab es fast keine Unterschiede in der Freisetzung der Chemokine MCP-1 und IL-8. Lediglich die mit  $5\ \mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA inkubierten HAoEC setzten im Vergleich zu den Kontrollzellen mehr MCP-1 frei. In einer Studie von BROWN et al. (2004) führte die Inkubation von Adipozyten

mit *trans*-10, *cis*-12 CLA hingegen zu einer IL-8-Hypersekretion. Jedoch war durch die Behandlung humaner Epithelzellen der Bronchien mit *cis*-9, *trans*-11 CLA die mRNA-Konzentration und die Freisetzung des IL-8 konzentrationsabhängig vermindert (JAUDSZUS et al. 2005). Während in wenigen widersprüchlichen Untersuchungen über den Einfluss von CLAs auf die Freisetzung des IL-8 bereits berichtet wurde, fehlen bislang Literaturbefunde über die Wirkung dieser konjugierten Fettsäuren auf die MCP-1-Freisetzung.

In der vorliegenden Arbeit hatten die CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA keine Wirkung auf die TNF $\alpha$ -induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle und Monozyten-Endothelzellen-Interaktion. Diese Ergebnisse unterstreichen die Befunde der untersuchten Chemokinfreisetzung. Im Gegensatz dazu reduzierten CLAs die Expressionen der ICAM-1 und VCAM-1 in humanen Magenkrebszelllinien (CHEN et al. 2004). Studien zum Einfluss von CLAs auf die Interaktion zwischen Monozyten und Endothelzellen sind bisher nicht bekannt.

Die Wirkung der LA, Referenzsubstanz in der vorliegenden Arbeit, auf die proinflammatorischen Parameter wurde bereits häufiger untersucht. Der Effekt der LA auf Entzündungsparameter wird aber in der Literatur kontrovers diskutiert. So beobachteten TOBOREK et al. (2002) eine Erhöhung der mRNA-Expression des MCP-1 in HUVEC, die mit LA behandelt wurden. In Studien mit verschiedenen unstimulierten und Zytokin stimulierten Endothelzelltypen, die mit LA behandelt wurden, wurde hingegen eine erhöhte Produktion bzw. mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle nachgewiesen (PARK et al. 2001; DICHTL et al. 2002; TOBOREK et al. 2002; CHEN et al. 2003; REITERER et al. 2004b; SARASWATHI et al. 2004). REISSIG et al. (2003) berichteten sogar von einer Verminderung der Expression der Adhäsionsmoleküle und einer Abschwächung der Adhäsion von Monozyten an IL-1 $\alpha$ -stimulierte Endothelzellen durch die Behandlung mit LA.

In der eigenen Studie hatte die Behandlung der TNF $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen mit LA jedoch weder einen Einfluss auf die Freisetzung der Chemokine noch auf die Expression der Adhäsionsmoleküle und die Monozyten-Endothelzellen-Interaktion. Diese Ergebnisse sind mit den Befunden von HOLTHE et al. (2005) vergleichbar. Hier beobachteten die Autoren ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 sowie E-Selektin in Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten HU-

VEC, die mit LA inkubiert wurden. Auch die Behandlung von Thrombin-stimulierten HUVEC mit einem Fettsäure-Gemisch mit 20% LA hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion von Leukozyten (VOSSEN et al. 1991). Die Befunde einer Studie, in denen zwei verschiedene humane Endothelzelltypen verwendet wurden, deuten darauf hin, dass der Einfluss der LA auf die Expression der Adhäsionsmoleküle vom Zelltyp und vom Gewebsursprung abhängig ist. Während in den mit LA behandelten humanen Endothelzellen der Retinagefäße die Produktion von ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Adhäsion der Monozyten erhöht waren, hatte die n-6-Fettsäure keinen Einfluss auf die Adhäsionsmolekülexpression in HUVEC (CHEN et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit waren die Effekte der CLA-Isomere und der LA auf die proinflammatorischen Parameter der Endothelzellen vergleichbar. So ist aus den Ergebnissen der eigenen Studie und den Literaturbefunden zu schließen, dass die CLA-Isomere und die LA wahrscheinlich keinen signifikanten Einfluss auf die inflammatorischen Parameter in makrovaskulären humanen Endothelzellen (HAoEC, HUVEC) ausüben können. Auch TOBOREK u. KAISER (1999) berichten davon, dass sich Endothelzellen, die von verschiedenen Geweben und Gefäßen stammen, in Struktur und Funktion unterscheiden können. Weiterhin weisen die teilweise heterogenen Literaturdaten darauf hin, dass die Wirkungen der CLA-Isomere und der LA auch von Faktoren, wie den Versuchsbedingungen (Zeit, Konzentration oder Einsatz von Stimuli), abhängig sind (YOUNG et al. 1998; CHEN et al. 2002; HOLTHE et al. 2005). So wurden unterschiedliche Effekte auf die Expression des ICAM-1 und des IL-8 in Endothelzellen, die mit  $\text{TNF}\alpha$ , LA oder beiden inkubiert wurden, nachgewiesen. LA allein wirkte im Vergleich mit den  $\text{TNF}\alpha$  stimulierten Zellen steigend und in Kombination mit  $\text{TNF}\alpha$  senkend auf die Expression von ICAM-1 und IL-8. Die Autoren beobachteten auch, dass die Effekte der LA in Kombination mit  $\text{TNF}\alpha$  von der Inkubationszeit abhängig waren; nach 12 h war die ICAM-1-Expression erhöht und nach 24 h reduziert (YOUNG et al. 1998).

Die Befunde der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass weder die CLA-Isomere noch die LA einen signifikanten Einfluss auf die proinflammatorischen Parameter in den  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten HAoEC ausübten. Vergleichbare Ergebnisse wurden von NUGENT et al. (2005) beschrieben, die in einer Humanstudie ebenfalls keinen Effekt der CLAs und der LA auf inflammatorische Marker wie die Konzentration von löslichen Adhäsionsmolekülen im Serum von gesunden Probanden beobachteten.

In vielen Studien, in denen durch die Behandlung von Endothelzellen mit LA die Expression der Adhäsionsmoleküle erhöht war, wurde auch eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beobachtet (HENNIG et al. 1996; PARK et al. 2001; DICHTL et al. 2002; TOBOREK et al. 2002; MEERARANI et al. 2003; REITERER et al. 2004b; SARASWATHI et al. 2004). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird als einer der entscheidenden Faktoren für die transkriptionelle Induktion der Adhäsionsmoleküle in den Endothelzellen angesehen (COLLINS et al. 1995; PRICE u. LOSCALZO 1999; RICHTER et al. 1999; TOBOREK u. KAISER 1999; COEN et al. 2004). Verschiedene Faktoren wie TNF $\alpha$ , LPS oder IL-1 sowie oxidativer und mechanischer Stress aktivieren durch die Phosphorylierung des Inhibitorproteins  $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) den NF- $\kappa$ B in den Endothelzellen (COLLINS et al. 1995; KRISHNASWAMY et al. 1999; DE CATERINA et al. 2000; HAJRA et al. 2000; YANG et al. 2004). Das freigesetzte NF- $\kappa$ B transloziert aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Dort bindet es an spezifische Promotorbindungsstellen der DNA, stimuliert so die Transkription der Zielgene und regt in deren Folge die Synthese verschiedener proinflammatorischer Substanzen wie die der Adhäsionsmoleküle und der Chemokine an, da deren Gene NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen in ihren Promotorregionen aufweisen (TERKELTAUB et al. 1998; BANNI et al. 1999a; KRISHNASWAMY et al. 1999; DE CATERINA et al. 2000; HAJRA et al. 2000; COLLINS u. CYBULSKY 2001; LUCAS u. GREAVES 2001; SHIN et al. 2002; YANG et al. 2004) (siehe Abb. 4.2 auf Seite 86). Dabei binden im Zellkern von Zytokin-stimulierten Endothelzellen überwiegend die Subeinheiten des NF- $\kappa$ B p50 und p65 an die  $\kappa$ B-Stelle der genannten Gene (COLLINS et al. 1995; BRAND et al. 1997).

Um den Einfluss der CLA-Isomere und der LA auf die Aktivität des NF- $\kappa$ B in den TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC zu untersuchen, wurde die DNA-Bindungsaktivität der Untereinheiten p50 und p65 bestimmt. Die Stimulierung der HAoEC mit TNF $\alpha$  führte zu einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität der beiden NF- $\kappa$ B-Subeinheiten. Jedoch wurden keine bzw. nur geringfügige Unterschiede zwischen den TNF $\alpha$ -stimulierten Gruppen, den mit CLA bzw. LA behandelten Zellen und den Kontrollzellen, beobachtet. Die Ergebnisse der Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität des NF- $\kappa$ B erklären vermutlich, weshalb die Freisetzung der Chemokine, die Expression der Adhäsionsmoleküle und deshalb die Adhäsion der Monozyten an die Endothelzellen durch die Behandlung der HAoEC mit CLA-Isomeren bzw. LA nicht beeinflusst waren. Studien an humanen glatten Muskelzellen der Koronararterie und murinen Makrophagen zeigten hingegen,

dass die Behandlung mit CLA-Isomeren die Zytokin- bzw. LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität verminderte (CHENG et al. 2004; RINGSEIS et al. 2006). Ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B (die I $\kappa$ B-Phosphorylierung sowie die Translokation des NF- $\kappa$ B in den Zellkern) übte *trans*-10, *cis*-12 CLA in Prostatakrebszellen aus, während *cis*-9, *trans*-11 CLA keinen Effekt auf die Translokation des NF- $\kappa$ B hatte (SONG et al. 2002a). Da in den erwähnten Studien und der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Zellsysteme verwendet wurden, sind die Wirkungen der CLA-Isomere und der LA auf die Aktivität des NF- $\kappa$ B vermutlich zelltypspezifisch. Auch unterschiedliche Konzentrationen der verwendeten CLA-Isomere können für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung entscheidend sein. So beobachteten LEUNG u. LIU (2000) gegensätzliche Effekte der Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf den Oxidationsstatus, der sich auf die Aktivität des redoxsensitiven NF- $\kappa$ B auswirkt (BARNES u. KARIN 1997). Während geringe Konzentrationen (2 und 20  $\mu$ mol/l) an *cis*-9, *trans*-11 CLA antioxidativ wirkten, verhielt sich das Isomer bei einer Konzentration von 200  $\mu$ mol/l prooxidativ. Die *trans*-10, *cis*-12 CLA war hingegen bei allen Konzentrationen zwischen 2 und 200  $\mu$ mol/l antioxidativ (LEUNG u. LIU 2000).

Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivität durch den Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  über die Regulierung des I $\kappa$ B $\alpha$  in Endothelzellen gehemmt wird (CHEN u. HAN 2001; WANG et al. 2002; MEERARANI et al. 2003; REITERER et al. 2004a, b). PPAR $\gamma$  reduziert, zum Teil durch seinen hemmenden Einfluss auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg, die Freisetzung von Chemokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen und vermindert dadurch vaskuläre Entzündungsreaktionen (MARX et al. 1999; COLLINS u. CYBULSKY 2001; XU et al. 2001; WANG et al. 2002; MONACO u. PAEOLOG 2004; REITERER et al. 2004a) (siehe Abb. 4.2 auf Seite 86).

PPAR $\gamma$  wird durch natürliche Liganden wie Fettsäuren und Eicosanoide und durch synthetische Liganden wie Glitazone (Troglitazon) aktiviert. Dabei bildet dieser Transkriptionsfaktor mit dem Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) einen heterodimeren Komplex, der an ein *PPAR response element* (PPRE) in den Promotorregionen spezifischer Zielgene im Zellkern bindet (LEHMANN et al. 1995; FORMAN et al. 1997; IJPENBERG et al. 1997; COLLINS u. CYBULSKY 2001; PLUTZKY 2001; DUVAL et al. 2002). Es wird angenommen, dass auch CLAs als natürliche Liganden des PPAR $\gamma$  über die PPAR $\gamma$ -Aktivierung inhibierend auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription proinflammatorischer Gene wirken (MARX et al. 1999; MOYA-CAMERENA et al. 1999; COLLINS u. CYBULSKY

2001; XU et al. 2001; YU et al. 2002; MONACO u. PALEOLOG 2004; REITERER et al. 2004a, b).

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Bindungsaktivität des PPAR $\gamma$  bestimmt, um den Einfluss der CLA-Isomere und der LA auf die Aktivität des PPAR $\gamma$  in den TNF $\alpha$ -stimulierten HAoEC zu untersuchen. In den TNF $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen, die mit 50  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-10, *cis*-12 CLA bzw. LA inkubiert wurden, wurde eine leicht erhöhte DNA-Bindungsaktivität des PPAR $\gamma$  nachgewiesen. Ebenfalls zu einer leicht erhöhten PPAR $\gamma$ -Aktivierung kam es in den Endothelzellen, die mit dem synthetischen PPAR $\gamma$ -Liganden Troglitazon behandelt wurden. In Studien mit anderen makrovaskulären Endothelzellen war das Ausmaß der PPAR $\gamma$ -Aktivierung nach der Behandlung mit PPAR $\gamma$ -Liganden mit jenem der eigenen Studie vergleichbar (REITERER et al. 2004a, b). Die relativ schwache Aktivierung des PPAR $\gamma$  durch die CLA-Isomere in der vorliegenden Arbeit liegt vermutlich darin begründet, dass humane Endothelzellen generell ein niedrigeres PPAR $\gamma$ -Expressionsniveau aufweisen als andere humane Zellkulturtypen wie Monozyten, Makrophagen, Prä-Adipozyten und Adipozyten (JACKSON et al. 1999; MARX et al. 1999). Selbst bei den vaskulären Endothelzellen ist das PPAR $\gamma$ -Expressionsniveau davon abhängig, aus welchem Blutgefäß oder Blutgefäßabschnitt die Zellen stammen. Dies erklärt vermutlich auch die unterschiedlich starke Expression des PPAR $\gamma$  (Protein, mRNA) und die unterschiedliche Reaktion auf die Behandlung mit PPAR $\gamma$ -Liganden in Abhängigkeit von der Lokalisation des Blutgefäßes (Mikrovaskulatur, Makrovaskulatur) (DELERIVE et al. 1999; JACKSON et al. 1999; PASCERI et al. 2001).

Die nur leichte Erhöhung der PPAR $\gamma$ -Aktivität durch Troglitazon sowie CLA und LA lässt darauf schließen, dass die in der eigenen Studie verwendeten HAoEC relativ schwach auf die Behandlung mit PPAR $\gamma$ -Agonisten reagieren. Dadurch lässt sich erklären, weshalb möglicherweise die Zytokin-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivität und Monozytenadhäsion durch die Behandlung der Endothelzellen mit den CLA-Isomeren nicht inhibiert wurden. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von humanen glatten Muskelzellen der Koronararterie mit den CLA-Isomeren *cis*-9, *trans*-11 CLA bzw. *trans*-10, *cis*-12 CLA zu einer PPAR $\gamma$ -abhängigen Inhibierung der TNF $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivität (RINGSEIS et al. 2006). Auch in anderen Zelltypen wie murinen Makrophagen, Monozyten oder mononukleären Zellen des peripheren Bluts von Schweinen verminderten CLAs durch die PPAR $\gamma$ -Aktivierung NF- $\kappa$ B-vermittelte Entzündungs-

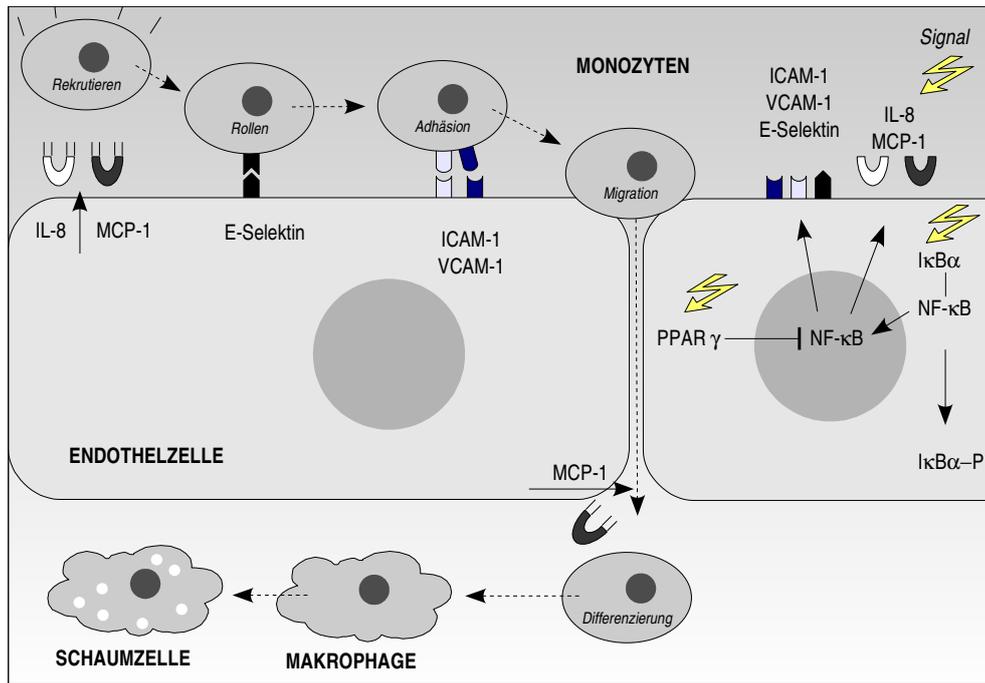
prozesse (YU et al. 2002; CHENG et al. 2004; CHANGHUA et al. 2005). Zudem wurde die in der Literatur beschriebene hemmende Wirkung des  $\text{TNF}\alpha$  auf die Genexpression bzw. Aktivität des  $\text{PPAR}\gamma$  (ZHANG et al. 1996; KAJITA et al. 2004; SUNG et al. 2004) in der eigenen Studie nicht beobachtet. Die Literaturbefunde und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich durch zelltypspezifische und spezieabhängige Effekte der CLAs, über die bereits BROWN u. MCINTOSH (2003) und MCNEEL u. MERSMANN (2003) berichteten, auf die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors, erklären.

Wie die  $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden auf die Genexpression und die Aktivität des  $\text{PPAR}\gamma$  wirken, kann aber auch von den experimentellen Bedingungen, wie dem verwendeten CLA-Isomer, dessen Konzentration, der Inkubations- bzw. Fütterungszeit und dem Einsatz von Zytokinen ( $\text{TNF}\alpha$ ) abhängen (CHANGHUA et al. 2005; WARGENT et al. 2005). So führte die Inkubation von Cos7-Zellen mit 50 und 100  $\mu\text{mol/l}$  *trans*-10, *cis*-12 CLA zu einer konzentrationsabhängigen  $\text{PPAR}\gamma$ -Aktivierung, aber deren Behandlung mit bis zu 100  $\mu\text{mol/l}$  *cis*-9, *trans*-11 CLA zu keiner veränderten  $\text{PPAR}\gamma$ -Aktivität (WARGENT et al. 2005). Durch die Fütterung von LPS-injizierten Schweinen mit einer CLA-angereicherten Diät waren die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine im Plasma über die  $\text{PPAR}\gamma$ -Aktivierung in Abhängigkeit von der Zeit vermindert (CHANGHUA et al. 2005).

Einen weiteren Erklärungsansatz für den fehlenden Effekt einer  $\text{PPAR}\gamma$ -Aktivierung durch die CLA-Isomere auf die  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -induzierte Monozytenadhäsion in der vorliegenden Studie liefern CHACKO et al. (2005). Sie bestimmten die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Adhäsion von Monozyten an humane Endothelzellen, die mit bzw. ohne  $\text{TNF}\alpha$  und dem synthetischen  $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden Rosiglitazon unter statischen und unter Flussbedingungen gemessen wurden. Unter statischen Bedingungen hemmte Rosiglitazon die  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Adhäsion der Monozyten nicht, allerdings unter Flussbedingungen (CHACKO et al. 2005). Ähnliche Beobachtungen machten auch DE CATERINA u. LIBBY (1996) mit LA als  $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden. Wie in der vorliegenden Arbeit wiesen sie unter statischen Bedingungen keinen Effekt der LA auf die Adhäsion der Leukozyten an HUVEC nach (DE CATERINA u. LIBBY 1996; BISHOP-BAILEY 2000; BEISIEGEL et al. 2003). Dagegen zeigte die Behandlung mit LA unter Flussbedingungen eine erhöhte Monozytenadhäsion an die Endothelzellen (RINKER et al. 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen dennoch deutlich, dass sowohl die beiden CLA-Isomere als auch die LA, als Referenzsubstanz, keinen Einfluss auf die untersuchten proinflammatorischen Parameter in HAoEC ausübten. So war die Aktivierung des PPAR $\gamma$  vermutlich nicht ausreichend, um die NF- $\kappa$ B-Aktivität zu hemmen und in deren Folge die Freisetzung der Chemokine, die Expression der Adhäsionsmoleküle und die Monozytenadhäsion zu senken. Bezüglich der diskutierten Effekte der CLAs, aber auch der LA, können die heterogenen Literaturbefunde vermutlich auf Unterschiede zwischen den verwendeten Zelltypen, dem Gewebsursprung der Zellen und den Versuchsbedingungen (statische oder Flussbedingungen, Konzentration und Zeit) zurückgeführt werden.

Ähnlich der eigenen Studie wurden in zwei früheren tierexperimentellen Studien keine signifikanten Wirkungen der CLAs auf die Fettstreifenbildung, Merkmal atherosklerotischer Läsionen, in der Aorta von Hamstern bzw. von Kaninchen beobachtet (LEE et al. 1994; NICOLOSI et al. 1997). Trotz der leicht proatherogenen Effekte der CLAs in einer Studie mit c57BL/6-Mäusen (MUNDAY et al. 1999) überwiegen bisher zell- und tierexperimentelle Studien, die antiatherogene Eigenschaften der CLAs nachgewiesen haben (KRITCHEVSKY et al. 2000; STANGL 2000a, b; YU et al. 2002; SHER et al. 2003; TOOMEY et al. 2003; CHENG et al. 2004; RINGSEIS et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass der antiatherogene Einfluss der CLA-Isomere nicht durch eine reduzierte Adhäsion der Monozyten zum Endothel, als ein entscheidender Schritt bei der frühen Phase der Atherogenese, erklärbar ist. Dies führt wiederum zu dem Schluss, dass die beiden CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA bzw. deren Metabolite möglicherweise den Prozess der Atherosklerose während einer späteren Phase der Atherogenese (z. B. Migration und Differenzierung von Leukozyten, Thrombozytenaggregation, Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen, Bildung von Schaumzellen und extrazellulärer Matrix aus Kollagen, Elastin und Proteoglykanen) oder durch andere Faktoren (z. B. Permeabilität für Plasmalipoproteine, Thrombozytenadhäsion, Freisetzung von Wachstumsfaktoren) als jene, die in dieser Studie untersucht wurden, beeinflussen.



**Abb. 4.2:** Schematische Darstellung proinflammatorischer Prozesse der frühen Entstehungsphase der Atherosklerose.

## 5 Schlussfolgerungen

Die vasoaktiven Substanzen – die Eicosanoide, das NO und das ET-1 – nehmen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts ein. Die proinflammatorischen Parameter, die Chemokine (MCP-1, IL-8) und die Adhäsionsmoleküle sowie die Leukozyten-Endothelzellen-Interaktion, sind maßgeblich an der frühen Phase der Atherogenese beteiligt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA auf atheroskleroserelevante Parameter – vasoaktive Substanzen und proinflammatorische Parameter – zu untersuchen.

Basierend auf dem Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Befunden der Literatur wurden die nachfolgenden Schlussfolgerungen gezogen.

1. Die Studie zeigte erstmalig, dass die Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA in HAoEC auf verschiedene Faktoren, die für die Eicosanoidsynthese bedeutend sind, wirken. Aufgrund der verminderten AA-Konzentration in den Phospholipiden und der Reduzierung der sPLA<sub>2</sub>-Aktivität der Endothelzellen, die mit 50 µmol/l der beiden CLA-Isomere behandelt wurden, kam es zu einer deutlichen Abnahme der Eicosanoidbildung. Das Verhältnis zwischen PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> bzw. 6-keto PGF<sub>1α</sub> und TXB<sub>2</sub> blieb dabei unverändert. Weiterhin führte die Inkubation der HAoEC mit den CLA-Isomeren zu einer verminderten NO-Freisetzung, die sich nicht durch eine Veränderung der Genexpression der eNOS erklären lässt, und einer geringeren ET-1-Freisetzung. Zusammenfassend kann aus den Beobachtungen abgeleitet werden, dass die CLA-Isomere weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf das Verhältnis zwischen Relaxations- und Konstriktionsfaktoren in den Endothelzellen hatten. Es darf jedoch nicht vernachlässigt werden, dass die Regulierung des vaskulären Gleichgewichts komplexer ist und auch durch andere Zellen, wie Thrombozyten und glatte Muskelzellen, beeinflusst wird. Außerdem ist zu vermuten, dass die Effekte der beiden CLA-Isomere *cis*-9,

*trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA auf deren ebenfalls biologisch aktive Metabolite zurückgeführt werden können.

2. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen über den Einfluss von CLAs auf inflammatorische Faktoren zeigte die vorliegende Studie zum ersten Mal umfassend, wie die CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 und *trans*-10, *cis*-12 auf Parameter der frühen Atherogenese (Freisetzung von Chemokinen, Expression der Adhäsionsmoleküle und Monozytenadhäsion) in Zytokin-stimulierten HAoEC wirken. Dabei hatten die CLA-Isomere sowie die LA, als Referenzsubstanz, keinen bzw. nur einen geringfügigen Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und nur einen leicht erhöhenden Effekt auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  in den Zytokin-stimulierten HAoEC. Dies erklärt vermutlich, warum die Freisetzung der Chemokine, die Expression der Adhäsionsmoleküle und die Monozyten-Endothelzellen-Interaktion durch die Behandlung der TNF $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen mit den CLA-Isomeren bzw. der LA nicht beeinflusst wurden. Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass die CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA und die LA keinen Effekt auf die untersuchten Parameter der frühen Phase der Atherogenese in den HAoEC hatten. Die in der Literatur beschriebene antiatherogene Wirkung der CLAs lässt sich möglicherweise durch einen Einfluss auf Prozesse einer späteren Phase der Atherogenese oder auf andere Faktoren als jene, die in dieser Studie untersucht wurden, erklären.

Es kann resümiert werden, dass die beiden CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA keinen Einfluss auf atheroskleroserelevante Parameter in humanen arteriellen Endothelzellen ausübten.

Da für die Untersuchung der Wirkung der beiden CLA-Isomere auf atheroskleroserelevante Parameter in HAoEC CLA-Konzentrationen verwendet wurden, die im Blut von Nicht-Vegetariern erreicht werden können, ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf den Menschen möglich. Dennoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Studien am Zellmodell durchgeführt wurden und lediglich als richtungsweisend für weiterführende Untersuchungen erachtet werden können.

## 6 Zusammenfassung

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die in Milch und Fleisch von Wiederkäuern vorkommenden konjugierten Linolsäure (CLA)-Isomere, atherosklerotische Prozesse beeinflussen. Die Atherosklerose ist die grundlegende Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen; derzeit Haupttodesursachen in den meisten Industrieländern. Dabei trägt die Ernährung zur Entstehung der Atherosklerose-Risikofaktoren, wie Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck und Diabetes mellitus, entscheidend bei.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der CLA-Isomere *cis-9, trans-11* CLA und *trans-10, cis-12* CLA auf atheroskleroserelevante Parameter – vasoaktive Substanzen und proinflammatorische Parameter – in humanen arteriellen Endothelzellen zu untersuchen.

Für die Untersuchung der Wirkung von CLA-Isomeren auf die Freisetzung der vasoaktiven Substanzen Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1 (ET-1) und die Eicosanoide Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), Thromboxan (TX) A<sub>2</sub>, Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> und F<sub>2α</sub> wurden humane Endothelzellen der Aorta (HAoEC) mit 5 bzw. 50 µmol/l der beiden CLA-Isomere für 24 h bei 37°C inkubiert. Folgende Parameter wurden bestimmt: die Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide und der Phospholipide Phosphatidylethanolamin und -cholin, die Bildung konjugierter Dien (CD)-Fettsäuren in den Gesamtlipiden, Parameter der Eicosanoid- und der NO-Synthese sowie die Freisetzung des ET-1. Die Anteile des jeweiligen CLA-Isomers und die Anteile der CD-Fettsäuren CD16:2 und CD20:2, Metabolite der CLAs, waren in den Lipiden der CLA-behandelten Endothelzellen, verglichen mit denen in den Lipiden der unbehandelten Endothelzellen, konzentrationsabhängig erhöht. Die HAoEC, die mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11* CLA oder *trans-10, cis-12* CLA inkubiert wurden, setzten weniger Eicosanoide, NO und ET-1 als die unbehandelten HAoEC frei. Es kam jedoch zu keiner signifikanten Veränderung des Verhältnisses von PGI<sub>2</sub> zu TXA<sub>2</sub> bzw. 6-keto PGF<sub>1α</sub> zu TXB<sub>2</sub> zwischen Kontrollzellen und den CLA-behandelten Zellen. Weiterhin wiesen die Zellen, die mit 50 µmol/l *cis-9, trans-11*

CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA inkubiert wurden, geringere Anteile an Arachidonsäure (AA) in ihren Phospholipidfraktionen und eine niedrigere mRNA-Konzentration und Aktivität der sekretorischen Phospholipase A<sub>2</sub> als die Kontrollzellen auf. Auch der Quotient aus AA und Linolsäure (LA), als Index für die  $\Delta$ 5- und  $\Delta$ 6-Desaturierung, war verglichen mit jenem Quotienten der Kontrollzellen in den Phospholipidfraktionen der CLA-inkubierten Endothelzellen vermindert. Zusammenfassend kann aus den Beobachtungen abgeleitet werden, dass die CLA-Isomere weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf das Verhältnis zwischen Relaxations- und Konstriktionsfaktoren in den HAoEC hatten.

Für die Untersuchung proinflammatorischer Parameter der frühen Entstehungsphase der Atherosklerose wurden die HAoEC nach 20 h Inkubationszeit mit 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l der beiden CLA-Isomere oder LA, als Referenzsubstanz, bei 37°C mit 2 ng/ml Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) für 4 h stimuliert, um eine inflammatorische Situation hervorzurufen. Folgende Parameter wurden untersucht: die Expression der Adhäsionsmoleküle *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1) und E-Selektin, die Freisetzung der Chemokine *monocyte chemoattractant* bzw. *chemotactic protein-1* (MCP-1) und Interleukin (IL)-8, die Adhäsion der U937 Monozyten an die Endothelzellen sowie die DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Die Behandlung der HAoEC mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  erhöhte die Expression der Adhäsionsmoleküle, die Freisetzung der Chemokine und die Monozytenadhäsion. Jedoch veränderte die Behandlung der Zellen mit dem jeweiligen CLA-Isomer bzw. der LA nicht die Zytokin-induzierte Chemokinfreisetzung, Expression der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) und Adhäsion der Monozyten. Die beiden CLA-Isomere und die LA wirkten zwar auf die PPAR $\gamma$ -DNA-Bindungsaktivität leicht steigernd, veränderten aber kaum die DNA-Bindungsaktivität des NF- $\kappa$ B. Dies deutet darauf hin, dass die CLA-Isomere und auch die LA keinen Effekt auf die untersuchten Parameter der frühen Phase der Atherogenese in den HAoEC hatten. Vermutlich lässt sich die in der Literatur beschriebene antiatherogene Wirkung der CLAs durch deren Einfluss auf Prozesse einer späteren Phase der Atherogenese oder andere als in dieser Studie untersuchte Faktoren erklären.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die beiden CLA-Isomere *cis*-9, *trans*-11 CLA und *trans*-10, *cis*-12 CLA keinen Einfluss auf atheroskleroserelevante Parameter in humanen arteriellen Endothelzellen ausübten.

## 7 Summary

Several *in vivo* studies suggest that conjugated linoleic acid (CLA) isomers occurring naturally in milk and meat of ruminants influence atherosclerotic processes. Atherosclerosis constitutes the most important contributor to cardiovascular diseases representing the leading cause of death in developed countries. Nutrition plays a pivotal role in the development of atherosclerosis-risk factors such as overweight, lipometabolic disorders, hypertension and diabetes mellitus.

The aim of this study was to investigate the effects of *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA on atherosclerosis-relevant parameters, vasoactive substances and pro-inflammatory parameters, in human aortic endothelial cells.

To investigate the effects of both CLA isomers on the release of vasoactive substances nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1) and eicosanoids prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), thromboxane (TX) A<sub>2</sub>, prostaglandine (PG) E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub>, human aortic endothelial cells (HAoEC) were incubated with 5 or 50 μmol/L of *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA for 24 h at 37°C. After the incubation period the fatty acid composition in total lipids and the phospholipid fractions phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, formation of conjugated metabolites of CLA in total lipids, parameters of the eicosanoid synthesis and NO synthesis as well as the release of ET-1 were determined. Incubation of HAoEC with the CLA isomers resulted in a significant incorporation of either CLA isomer and a significant isomer-specific formation of conjugated metabolites of CLA (CD) such as CD16:2 and CD20:2 in a concentration dependent manner when compared with untreated endothelial cells. Endothelial cells incubated with 50 μmol/L with either *cis*-9, *trans*-11 CLA or *trans*-10, *cis*-12 CLA released less eicosanoids, NO and ET-1 than control cells. The ratio between the amounts of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and that of TXB<sub>2</sub> (as stable derivatives of PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub>, respectively) released did not differ between control cells and cells treated with CLA isomers. Furthermore, cells treated with 50 μmol/L of either *cis*-9, *trans*-11 CLA or *trans*-10, *cis*-12 CLA had

lower amounts of arachidonic acid (AA) in phospholipid fractions, a reduced mRNA concentration and activity of secretory phospholipase A<sub>2</sub> compared with control cells. The ratio of the amounts of AA and those of linoleic acid (LA) as an index of  $\Delta$ 5- and  $\Delta$ 6-desaturation were lower in phospholipid fractions of endothelial cells treated with CLA isomers than those of untreated cells. Derived from investigations, CLA isomers have neither a positive nor a negative effect on the ratio between the relaxation and constriction factors, parameters of the vascular homeostasis, in endothelial cells.

To investigate the effect of both CLA isomers on inflammatory parameters of the early phase of atherosclerosis, endothelial cells were incubated in medium without (control) or with 5 or 50  $\mu$ mol/L of either *cis*-9, *trans*-11, *trans*-10, *cis*-12 CLA or LA, as a reference substance, for 20 h at 37°C followed by a 4 h treatment with 2 ng/mL TNF $\alpha$  to cause an inflammatory situation. After the incubation periods, the expression of adhesion molecules intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cellular adhesion molecule 1 (VCAM-1) und E-selectin, the release of chemokines monocyte chemoattractant or chemotactic protein-1 (MCP-1) and interleukin (IL)-8 and the monocyte adhesion to endothelial cells as well as the DNA-binding activity of the transcription factors nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  were determined. Treatment of HAoEC with 2 ng/mL TNF $\alpha$  increased release of the chemokines, expression of adhesion molecules and monocyte adhesion. However, treatment of HAoEC with either CLA isomer or LA did not modulate the cytokine-induced expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin, MCP-1 and IL-8 release and U937 cell adhesion. In addition, both CLA isomers and LA slightly increased PPAR $\gamma$  DNA-binding activity, but almost did not alter DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B. This suggests that CLA isomers had no effect on parameters of the early phase of atherosclerosis in HAoEC. This raises the possibility that the anti-atherogenic effects of CLA described in the literature might be explained by influence on processes of a later stage of atherogenesis or factors other than those addressed in this study.

In conclusion, both CLA isomers *cis*-9, *trans*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA had no effects on the investigated atherosclerosis-relevant parameters in human arterial endothelial cells.

## 8 Literaturverzeichnis

### **AGATHA et al. 2004**

AGATHA, G. ; VOIGT, A. ; KAUF, E. ; ZINTL, F.: Conjugated linoleic acid modulation of cell membrane in leukemia cells. In: *Cancer Lett* 209 (2004), S. 87–103

### **ALAOUI-EL-AZHER et al. 2000**

ALAOUI-EL-AZHER, M. ; HAVET, N. ; SINGER, M. ; DUMAREY, C. ; TOUQUI, L.: Inhibition by unsaturated fatty acids on type II secretory phospholipase A<sub>2</sub> synthesis in guinea-pig alveolar macrophages. In: *Eur J Biochem* 267 (2000), S. 3633–3639

### **BALSINDE et al. 1999**

BALSINDE, J. ; SHINOHARA, H. ; LEFKOWITZ, L.J. ; JOHNSON, C.A. ; BALBOA, M.A. ; DENNIS, E.A.: Group V phospholipase A<sub>2</sub>-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 37, S. 25967–25970

### **BANNI et al. 1999a**

BANNI, S. ; ANGIONI, E. ; CARTA, G. ; CASU, V. ; DEIANA, M. ; DESSI, M.A. ; LUCCHI, L. ; MELIS, M.P. ; ROSA, A. ; VARGIOLU, S. ; CORONGIU, F.P.: Influence of dietary conjugated linoleic acid on lipid metabolism in relation to its anticarcinogenic activity. In: YURAWECZ, M.P. (Hrsg.): *Advances in conjugated linoleic acid research*. 1. Champaign : AOCS Press, 1999, Kap. 23, S. 307–318

### **BANNI et al. 1999b**

BANNI, S. ; ANGIONI, E. ; CASU, V. ; MELIS, M.P. ; CARTA, G. ; CORONGIU, F.P. ; THOMPSON, H. ; IP, C.: Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. In: *Carcinogenesis* 20 (1999), Nr. 6, S. 1019–1024

### **BANNI et al. 2001**

BANNI, S. ; CARTA, G. ; ANGIONI, E. ; MURRU, E. ; SCANU, P. ; MELIS, M.P. ; BAUMANN, D.E. ; FISCHER, S.M. ; IP, C.: Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. In: *J Lipid Res* 42 (2001), S. 1056–1061

### **BANNI et al. 2003**

BANNI, S. ; HEYS, S.D. ; WAHLE, K.W.J.: Conjugated linoleic acids as anticancer nutrients: studies in vivo and cellular mechanisms. In: SEBEDIO, J.L. (Hrsg.) ; CHRISTIE, W.W. (Hrsg.): *Advances in conjugated linoleic acid research* Bd. 2. Champaign : AOCS Press, 2003, Kap. 16, S. 267–282

### **BANNI et al. 2004**

BANNI, S. ; PETRONI, A. ; BLASEVICH, M. ; CARTA, G. ; ANGIONI, E. ; MURRU, E. ; DAY, B.W. ; MELIS, M.P. ; SPADA, S. ; IP, C.: Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. In: *Biochim Biophys Acta* 168 (2004), S. 120 – 127

### **BARNES u. KARIN 1997**

BARNES, P.J. ; KARIN, M.: Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. In: *N Engl J Med* 336 (1997), Nr. 15, S. 1066–1071

**BECUWE et al. 2003**

BECUWE, P. ; BIANCHI, A. ; DIDELOT, C. ; BARBERI-HEYOB, M. ; DAUCA, M.: Arachidonic acid activates a functional AP-1 and an inactive NF- $\kappa$ B complex in human HepG2 hepatoma cells. In: *Free Radic Biol Med* 35 (2003), Nr. 6, S. 636–647

**BEISIEGEL et al. 2003**

BEISIEGEL, U. ; HEEREN, J. ; SCHNIEDERS, F.: Fatty acids and gene expression. In: ZEMPLIEN, J. (Hrsg.) ; DANIEL, H. (Hrsg.): *Molecular Nutrition*. Wallingford : CAB International, 2003, Kap. 9, S. 121–134

**BELURY 2002**

BELURY, M.A.: Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: Potential mechanism of action. In: *J Nutr* 132 (2002), S. 2995–2998

**BELURY u. KEMPA-STECZKO 1997**

BELURY, M.A. ; KEMPA-STECZKO, A.: Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. In: *Lipids* 32 (1997), Nr. 2, S. 199–204

**BELURY et al. 1996**

BELURY, M.A. ; NICKEL, K.P. ; BIRD, C.E. ; WU, Y.: Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. In: *Nutr Cancer* 26 (1996), S. 149–157

**BELURY u. VANDEN HEUVEL 1997**

BELURY, M.A. ; VANDEN HEUVEL, J.P.: Protection against cancer and heart disease by CLA: potential mechanisms of action. In: *Nutr Dis Update* 1 (1997), S. 58–63

**BENNINGHOFF u. DRENCKHAHN 2004**

BENNINGHOFF, A. ; DRENCKHAHN, D.: *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie (Bd. 2)*. 16. München, Jena : Urban & Fischer, 2004

**BERKHOUT et al. 1997**

BERKHOUT, T.A. ; SARAU, H.M. ; MOORES, K. ; WHITE, J.R. ; ELSHOUBAGY, N. ; APPELBAUM, E. ; REAPE, T.J. ; BRAWNER, M. ; MAKWANA, J. ; FOLEY, J.J. ; SCHMIDT, D.B. ; IMBURGIA, C. ; McNULTY, D. ; MATTHEWS, J. ; O'DONNELL, K. ; O'SHANNESY, D. ; SCOTT, M. ; GROOT, P.H.E. ; MACPHEE, C.: Cloning, *in vitro* expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of monocyte chemotactic protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 26, S. 16404–16413

**BERNATCHEZ et al. 2001**

BERNATCHEZ, P.N. ; WINSTEAD, M.V. ; DENNIS, E.A. ; SIROIS, M.G.: VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory PLA<sub>2</sub>. In: *Br J Pharmacol* 134 (2001), S. 197–205

**BIESALSKI u. GRIMM 1999**

BIESALSKI, H.K. ; GRIMM, P.: *Taschenatlas der Ernährung*. Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 1999

**BINION et al. 1998**

BINION, D.G. ; FU, S. ; RAMANUJAM, K.S. ; CHAI, Y.C. ; DWEIK, R.A. ; DRAZBA, J.A. ; WADE, J.G. ; ZIATS, N.P. ; ERZURUM, S.C. ; WILSON, K.T.: iNOS expression in human intestinal microvascular endothelial cells inhibits leukocyte adhesion. In: *Am J Physiol* 275 (1998), Nr. 3, S. G592–G603

**BISHOP-BAILEY 2000**

BISHOP-BAILEY, D.: Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. In: *Br J Pharmacol* 129 (2000), S. 823–834

**BLANKENBERG et al. 2003**

BLANKENBERG, S. ; BARBAUX, S. ; TIRET, L.: Adhesion molecules and atherosclerosis. In: *Atherosclerosis* 170 (2003), S. 191–203

**BLIGH u. DYER 1959**

BLIGH, E.G. ; DYER, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. In: *Can J Biochem Physiol* 37 (1959), Nr. 8, S. 911–917

**BÖCKER et al. 2004**

BÖCKER, W. ; DENK, H. ; HEITZ, P.U.: *Pathologie*. 3. München, Jena : Urban & Fischer, 2004

**BOULANGER et al. 1992**

BOULANGER, C.M. ; TANNER, F.C. ; BEA, M.L. ; HAHN, A.W. ; WERNER, A. ; LÜSCHER, T.F.: Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. In: *Circ Res* 70 (1992), Nr. 6, S. 1191–1197

**BRADFORD 1976**

BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), S. 248–254

**BRAND et al. 1997**

BRAND, K. ; PAGE, S. ; WALLI, A.K. ; NEUMEIER, D. ; BAEUERLE, P.A.: Role of nuclear factor-kappaB in atherogenesis. In: *Exp Physiol* 82 (1997), S. 297–304

**BRANDENBOURG u. HU 2005**

BRANDENBOURG, T.D. ; HU, C.Y.: Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. In: *J Anim Sci* 83 (2005), Nr. 9, S. 2096–2105

**BRETILLON et al. 1999**

BRETILLON, L. ; CHARDIGNY, J.M. ; GREGOIRE, S. ; BERDEAUX, O. ; SEBEDIO, J.L.: Effects of conjugated linoleic acid isomers on hepatic microsomal desaturation activities *in vitro*. In: *Lipids* 34 (1999), S. 965–969

**BROWN u. MCINTOSH 2003**

BROWN, J.M. ; MCINTOSH, M.K.: Conjugated linoleic acid in humans: regulation of adiposity and insulin sensitivity. In: *J Nutr* 133 (2003), S. 3041–3046

**BROWN et al. 2004**

BROWN, J.M. ; SANDBERG BOYSEN, M. ; CHUNG, S. ; FABIYI, O. ; MORRISON, R.F. ; MANDRUP, S. ; MCINTOSH, M.K.: Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 25, S. 26735–26747

**BROWN et al. 1994**

BROWN, Z. ; GERRITSEN, M.E. ; CARLEY, W.W. ; STRIETER, R.M. ; KUNKEL, S.L. ; WESTWICK, J.: Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 response to interferon-gamma. In: *Am J Pathol* 145 (1994), S. 913–921

**BULGARELLA et al. 2001**

BULGARELLA, J.A. ; PATTON, D. ; BULL, A.W.: Modulation of prostaglandin H synthase activity by conjugated linoleic acid (CLA) and specific CLA isomers. In: *Lipids* 36 (2001), Nr. 4, S. 407–412

**BUNTING et al. 1983**

BUNTING, S. ; MONCADA, S. ; VANE, J.R.: The prostacyclin-thromboxane A<sub>2</sub> balance: pathophysiological and therapeutic implications. In: *Br Med Bull* 39 (1983), S. 271–276

**BUTLER et al. 1995**

BUTLER, A.R. ; FLITNEY, F.W. ; WILLIAMS, D.L.: NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. In: *Trends Pharmacol Sci* 16 (1995), Nr. 1, S. 18–22

**BUTTE 1983**

BUTTE, W.: Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulfonium hydroxide for transesterification. In: *J Chromatogr* 261 (1983), S. 142–145

**CAMACHO et al. 1998**

CAMACHO, M. ; LOPEZ-BELMONTE, J. ; VILA, L.: Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. In: *Circ Res* 83 (1998), Nr. 4, S. 353–365

**CAUGHEY et al. 2001**

CAUGHEY, G.E. ; CLELAND, L.G. ; PENGLIS, P.S. ; GAMBLE, J.R. ; JAMES, M.J.: Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. In: *J Immunol* 167 (2001), S. 2831–2838

**CESANO et al. 1998**

CESANO, A. ; VISONNEAU, S. ; SCIMECA, D. ; KRITCHEVSKY, D. ; SANTOLI, D.: Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. In: *Anticancer Res* 18 (1998), Nr. 3A, S. 1429–1434

**CHACKO et al. 2005**

CHACKO, B.K. ; CHANDLER, R.T. ; MUNDHEKAR, A. ; KHOO, N. ; PRUITT, H.M. ; KUCIK, D.F. ; PARKS, D.A. ; KEVIL, C.G. ; BARNES, S. ; PATEL, R.P.: Revealing anti-inflammatory mechanisms of soy isoflavones by flow: modulation of leukocyte-endothelial cell interactions. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289 (2005), S. H908–H915

**CHANGHUA et al. 2005**

CHANGHUA, L. ; JINDONG, Y. ; DEFA, L. ; LIDAN, Z. ; SHIYAN, Q. ; JIANJUN, X.: Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. In: *J Nutr* 135 (2005), S. 239–244

**CHEN et al. 2004**

CHEN, B.-Q. ; YANG, Y.-M. ; WANG, Q. ; GAO, Y.-H. ; LIU, J.-R. ; ZHANG, J.-S. ; WANG, X.-L. ; LIU, R.-H.: Effects of *c9,t11*-conjugated linoleic acid on adhesion of human gastric carcinoma cell line SGC-7901. In: *World J Gastroenterol* 10 (2004), Nr. 10, S. 1392–1396

**CHEN u. HAN 2001**

CHEN, N.-G. ; HAN, X.: Dual function of troglitazone in ICAM-1 gene expression in human vascular endothelium. In: *Biochem Biophys Res Commun* 282 (2001), S. 717–722

**CHEN et al. 2003**

CHEN, W. ; JUMP, D.B. ; GRANT, M.B. ; ESSELMAN, W.J. ; BUSIK, J.V.: Dyslipidemia, but not hyperglycemia, induces inflammatory adhesion molecules in human retinal vascular endothelial cells. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (2003), S. 5016–5022

**CHEN et al. 2002**

CHEN, Y.-H. ; LIN, S.-J. ; CHEN, J.-W. ; KU, H.-H. ; CHEN, Y.-L.: Magnolol attenuates VCAM-1 expression *in vitro* in TNF- $\alpha$ -treated human aortic endothelial cells and *in vivo* in the aorta of cholesterol-fed rabbits. In: *Br J Pharmacol* 135 (2002), S. 37–47

**CHENG et al. 2004**

CHENG, W.-L. ; LIU, C.-K. ; CHEN, H.-W. ; LIN, T.-H. ; LIU, K.-L.: Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of NF- $\kappa$ B pathway. In: *J Agric Food Chem* 52 (2004), S. 71–78

**CHEW et al. 1997**

CHEW, B.P. ; WONG, T.S. ; SHULTZ, T.D. ; MAGNUSON, N.S.: Effects of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene in modulating lymphocyte and macrophage function. In: *Anticancer Res* 17 (1997), S. 1099–1106

**CHISAKI et al. 2003**

CHISAKI, K. ; OKUDA, Y. ; SUZUKI, S. ; MIYAUCHI, T. ; SOMA, M. ; OHKOSHI, N. ; SONE, H. ; YAMADA, N. ; NAKAJIMA, T.: Eicosapentaenoic acid suppresses basal and insulin-stimulated endothelin-1 production in human endothelial cells. In: *Hypertens Res* 26 (2003), Nr. 8, S. 655–661

**CHOI et al. 2000**

CHOI, Y. ; KIM, Y.-C. ; HAN, Y.-B. ; PARK, Y. ; PARIZA, M.W. ; NTAMBI, J.M.: The *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. In: *J Nutr* 130 (2000), S. 1920–1924

**CHUANG et al. 2001**

CHUANG, L.T. ; LEONARD, A.E. ; LIU, J.W. ; MUKERJI, P. ; BRAY, T.M. ; HUANG, Y.S.: Inhibitory effect of conjugated linoleic acid on linoleic acid elongation in transformed yeast with human elongase. In: *Lipids* 36 (2001), Nr. 10, S. 1099–1103

**CLEMENT et al. 2002**

CLEMENT, L. ; POIRIER, H. ; NIOT, I. ; BOCHER, V. ; GUERRE-MILLO, M. ; KRIEF, S. ; STAELS, B. ; BESNARD, P.: Dietary *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. In: *J Lipid Res* 43 (2002), Nr. 9, S. 1400–1409

**COEN et al. 2004**

COEN, P.M. ; CUMMINS, P.M. ; BIRNEY, Y.A. ; DEVERY, R. ; CAHILL, P.A.: Modulation of nitric oxide and 6-keto-prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub>  in bovine aortic endothelial cells by conjugated linoleic acid. In: *Endothelium* 11 (2004), S. 211–220

**COLLINS 1993**

COLLINS, T.: Endothelial nuclear factor- $\kappa$ B and the initiation of atherosclerosis lesion. In: *Lab Invest* 68 (1993), S. 499–508

**COLLINS u. CYBULSKY 2001**

COLLINS, T. ; CYBULSKY, M.I.: NF- $\kappa$ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? In: *J Clin Invest* 107 (2001), Nr. 3, S. 255–264

**COLLINS et al. 1995**

COLLINS, T. ; READ, M.A. ; NEISH, A.S. ; WHITLEY, M.Z. ; THANOS, D. ; MANIATIS, T.: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. In: *FASEB J* 9 (1995), S. 899–909

**COOK et al. 2000**

COOK, W.S. ; YELDANDI, A.V. ; RAO, M.S. ; HASHIMOTO, T. ; REDDY, J.K.: Less extrahepatic induction of fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes by PPAR $\alpha$ . In: *Biochem Biophys Res* 278 (2000), S. 250–257

**CORINO et al. 2005**

CORINO, C. ; DI GIANCAMILLO, A. ; ROSSI, R. ; DOMENEGHINI, C.: Dietary conjugated linoleic acid affects morphofunctional and chemical aspects of subcutaneous adipose tissue in heavy pigs. In: *J Nutr* 135 (2005), Nr. 6, S. 1444–1450

**CUPILLARD et al. 1997**

CUPILLARD, L. ; KOUMANOV, K. ; MATTEI, M.-G. ; LAZDUNSKI, M. ; LAMBEAU, G.: Cloning, chromosomal mapping, and expression of novel human secretory phospholipase A<sub>2</sub>. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 25, S. 15745–15752

**DANCU et al. 2004**

DANCU, M.B. ; BERARDI, D.E. ; VANDEN HEUVEL, J.P. ; TARBELL, J.M.: Asynchronous shear stress and circumferential strain reduces endothelial NO synthase and cyclooxygenase-2 but induces endothelin-1 gene expression in endothelial cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004), Nr. 11, S. 2088–2094

**DAVIES et al. 1993**

DAVIES, M.J. ; GORDON, J.L. ; GEARING, A.J. ; PIGOTT, R. ; WOOLF, N. ; KATZ, D. ; KY-RIAKOPOULOS, A.: The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. In: *J Pathol* 171 (1993), S. 223–229

**DE CATERINA et al. 2000**

DE CATERINA, R. ; LIAO, J.K. ; LIBBY, P.: Fatty acid modulation of endothelial activation. In: *Am J Clin Nutr* 71 (2000), Nr. 1, S. 213–223

**DE CATERINA u. LIBBY 1996**

DE CATERINA, R. ; LIBBY, P.: Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. In: *Lipids* 31 (1996), S. 57–63

**DE DECKERE et al. 1999**

DECKERE, E.A. de ; AMELSVOORT, J.M. van ; MCNEILL, G.P. ; JONES, P.: Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. In: *Br J Nutr* 82 (1999), Nr. 4, S. 309–317

**DELERIVE et al. 1999**

DELERIVE, P. ; MARTIN-NIZARD, F. ; CHINETTI, G. ; TROTTEIN, F. ; FRUCHART, J.C. ; NAJIB, J. ; DURIEZ, P. ; STAELS, B.: Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. In: *Circ Res* 85 (1999), Nr. 5, S. 394–402

**DEMUTH et al. 1999**

DEMUTH, K. ; ATGER, V. ; BORDERIE, D. ; BENOIT, M.-O. ; SAUVAGET, D. ; LOTERSZTAJN, S. ; MOATTI, N.: Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells. In: *Eur J Biochem* 263 (1999), S. 367–376

**DENNING et al. 1983**

DENNING, G.M. ; FIGARD, P.H. ; KADUCE, T.L. ; SPECTOR, A.A.: Role of triglycerides in endothelial cell arachidonic acid metabolism. In: *J Lipid Res* 24 (1983), S. 993–1001

**DENNIS 1994**

DENNIS, E.A.: Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Nr. 18, S. 13057–13060

**DICHTL et al. 2002**

DICHTL, W. ; ARES, M.P.S. ; NIEMANN JÖNSON, A. ; JOVINGE, S. ; PACHINGER, O. ; GIACHELLI, C.M. ; HAMSTEN, A. ; ERIKSSON, P. ; NILSSON, J.: Linoleic acid-stimulated vascular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells depends on nuclear factor- $\kappa$ B activation. In: *Metabolism* 51 (2002), Nr. 3, S. 327–333

**DU et al. 1999**

DU, M. ; AHN, D.U. ; SELL, J.L.: Effects of dietary conjugated linoleic acid on the composition of egg yolk lipids. In: *Poult Sci* 78 (1999), Nr. 11, S. 1639–1645

**DUSTIN et al. 1986**

DUSTIN, M.L. ; ROTHLEIN, R. ; BHAN, A.K. ; DINARELLO, C.A. ; SPRINGER, T.A.: Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). In: *J Immunol* 137 (1986), S. 245–254

**DUVAL et al. 2002**

DUVAL, C. ; CHINETTI, G. ; TROTTEIN, F. ; FRUCHART, J.-C. ; STAELS, B.: The role of PPARs in atherosclerosis. In: *TRENDS in Molecular Medicine* 8 (2002), Nr. 9, S. 422–430

**EDER u. KIRCHGESSNER 1994**

EDER, K. ; KIRCHGESSNER, M.: Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force-fed equal quantities of diet. In: *J Nutr* 124 (1994), Nr. 10, S. 1917–1926

**EDER et al. 2002**

EDER, K. ; SLOMMA, N. ; BECKER, K.: *Trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids in HepG2 cells. In: *J Nutr* 132 (2002), S. 1115–1121

**FARQUHARSON et al. 1999**

FARQUHARSON, A. ; WU, H.-C. ; GRANT, I. ; GRAF, B. ; CHOUNG, J.-J. ; EREMIN, O. ; HEYS, S. ; WAHLE, K.W.J.: Possible mechanisms for the putative anti-atherogenic and antitumorigenic effects of conjugated polyenoic fatty acids. In: *Lipids* 34 (1999), S. S343

**FLEMING u. BUSSE 2003**

FLEMING, I. ; BUSSE, R.: Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284 (2003), S. R1–R12

**FORGERTY et al. 1988**

FORGERTY, A. ; FORD, G. ; SVORNONOS, D.: Octadeca-9,11-dienoic acid in foodstuff and in lipids of human blood and breast milk. In: *Nutr Rep Int* 38 (1988), S. 937–944

**FORMAN et al. 1997**

FORMAN, B.M. ; CHEN, J. ; EVANS, R.M.: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\delta$ . In: *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997), S. 4312–4217

**FORTH et al. 1998**

FORTH, W. (Hrsg.) ; HENSCHLER, D. (Hrsg.) ; RUMMEL, W. (Hrsg.) ; STARKE, K. (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 7. Heidelberg, Berlin, Oxford : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998

**FRITSCHÉ u. STEINHART 1998**

FRITSCHÉ, J. ; STEINHART, H.: Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. In: *Z Lebensm Unters Forsch A* 206 (1998), S. 77–82

**GARLUND et al. 2005**

GARLUND, L. ; PEDERSEN, J.I. ; NEBB, H.I.: Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. In: *Biochim Biophys Acta* 1687 (2005), Nr. 1-3, S. 11–22

**GELLAI et al. 1996**

GELLAI, M. ; FLETCHER, T. ; PULLEN, M. ; NAMBI, P.: Evidence for the existence of endothelin-B receptor subtypes and their physiological roles in the rat. In: *Am J Physiol* 271 (1996), Nr. 1, S. R254–R261

**GERSZTEN et al. 1999**

GERSZTEN, R.E. ; GARCIS-ZEPEDA, E.A. ; LIM, Y.C. ; YOSHIDA, M. ; DING, H.A. ; GIMBRONE, M.A. J. ; LUSTER, A.D. ; LUSCINSKAS, F.W. ; ROSENZWEIG, A.: MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. In: *Nature* 398 (1999), Nr. 6729, S. 718–723

**GORACA 2002**

GORACA, A.: New views on the role of endothelin. In: *Endocr Regul* 36 (2002), S. 161–167

**GREEN et al. 1982**

GREEN, L.C. ; WAGNER, D.A. ; GLOGOWSKI, J. ; SKIPPER, P.L. ; WISHNOK, J.S. ; TANNENBAUM, S.R.: Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. In: *Anal Biochem* 126 (1982), Nr. 1, S. 131–138

**HA et al. 1990**

HA, Y.L. ; STORKSON, J. ; PARIZA, M.W.: Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. In: *Cancer Res* 50 (1990), Nr. 4, S. 1097–1101

**HAI et al. 2004**

HAI, E. ; IKURA, Y. ; NARUKO, T. ; SHIRAI, N. ; YOSHIMI, N. ; KAYO, S. ; SUGAMA, Y. ; FUJINO, H. ; OHSAWA, M. ; TANZAWA, K. ; YOKOTA, T. ; UEDA, M.: Alterations of endothelin-converting enzyme expression in early and advanced stages of human coronary atherosclerosis. In: *Int J Mol Med* 13 (2004), Nr. 5, S. 649–654

**HAJRA et al. 2000**

HAJRA, L. ; EVANS, A.I. ; CHEN, M. ; HYDUK, S.J. ; COLLINS, T. ; CYBULSKY, M.I.: The NF- $\kappa$ B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. In: *Proc Natl Acad Sci* 97 (2000), Nr. 16, S. 9052–9057

**HALCOX et al. 2001**

HALCOX, J.P. ; NOUR, K.R. ; ZALOS, G. ; QUYYUMI, A.A.: Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ET<sub>A</sub> receptor blockade. In: *Circ Res* 89 (2001), Nr. 11, S. 969–976

**HARA u. RADIN 1978**

HARA, A. ; RADIN, N.S.: Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. In: *Anal Biochem* 90 (1978), Nr. 1, S. 420–426

**HARRIS et al. 2001**

HARRIS, M.A. ; HANSEN, R.A. ; VIDSUDHIPHAN, P. ; KOSLO, J.L. ; THOMAS, J.B. ; WATKINS, B.A. ; ALLEN, K.G.: Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metalloproteinase production. In: *Prost Leuk Fatty Acids* 65 (2001), Nr. 1, S. 23–29

**HARRISON et al. 1996**

HARRISON, D.G. ; INOUE, N. ; Y., Oharam ; FUKAI, T.: Modulation of endothelial cell nitric oxide synthase expression. In: *Jpn Circ J* 60 (1996), S. 815–821

**HAUG et al. 2000**

HAUG, C. ; SCHMID-KOTSAS, A. ; ZORN, U. ; BACHEM, M.G. ; SCHUETT, S. ; GRUENERT, A. ; RODZINSKI, E.: Hepatocyte growth factor is upregulated by low-density lipoproteins and inhibits endothelin-1 release. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (2000), Nr. 6, S. H2865–H2871

**HAYEK et al. 1999**

HAYEK, M.G. ; HAN, S.N. ; WU, D. ; WATKINS, B.A. ; MEYDANI, M. ; DORSEY, J.L. ; SMITH, D.E. ; MEYDANI, S.N.: Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrIBR mice. In: *J Nutr* 129 (1999), S. 32–38

**HAYNES et al. 1995**

HAYNES, W.G. ; FERRO, C.E. ; WEBB, D.J.: Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 26 (1995), S. 183–185

**HENNIG et al. 1996**

HENNIG, B. ; TOBOREK, M. ; JOSHI-BARVE, S. ; BARGER, S.W. ; BARVE, S. ; MATTSON, M.P. ; MCCLAIN, C.J.: Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells. In: *Am J Clin Nutr* 63 (1996), Nr. 3, S. 322–328

**HINZ u. BRUNE 2002**

HINZ, B. ; BRUNE, K.: Cyclooxygenase-2 - 10 years later. In: *J Pharmacol Exp Ther* 300 (2002), Nr. 2, S. 367–375

**HOFFMANN et al. 1999**

HOFFMANN, G. ; SCHOBERSBERGER, W. ; RIEDER, J. ; SMOLNY, M. ; SEIBEL, M. ; FÜRAPTER, C. ; FRITSCH, P. ; SEPP, N.: Human dermal microvascular endothelial cells express inducible nitric oxide synthase in vitro. In: *J Invest Dermatol* 112 (1999), Nr. 3, S. 387–390

**HOLTHE et al. 2005**

HOLTHE, M.R. ; ANDERSSON, Y. ; LYBERG, T.: Lack of proinflammatory effects of free fatty acids on human umbilical cord vein endothelial cells and leukocytes. In: *Acta Obstet Gynecol Scand* 84 (2005), S. 672–678

**HOULISTON u. WHEELER-JONES 2001**

HOULISTON, R.A. ; WHEELER-JONES, C.P.: sPLA<sub>2</sub> cooperates with cPLA<sub>2α</sub> to regulate prostacyclin synthesis in human endothelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 287 (2001), Nr. 4, S. 881–887

**HOUSEKNECHT et al. 1998**

HOUSEKNECHT, K.L. ; VANDEN HEUVEL, J.P. ; MOYA-CAMERENA, S.Y. ; PORTOCARRERO, C.P. ; PECK, L.W. ; NICKEL, K.P.: Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fattyfa/fa rat. In: *Biochem Biophys Res Commun* 244 (1998), Nr. 3, S. 678–682

**Hsu et al. 2004**

HSU, Y.H. ; CHEN, J.-J. ; CHANG, N.-C. ; CHEN, C.-H. ; LIU, J.-C. ; CHEN, T.-H. ; JENG, C.-J. ; CHAO, H.-H. ; CHENG, T.-H.: Role of reactive oxygen species-sensitive extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. In: *J Vasc Res* 41 (2004), S. 64–74

**IHLING et al. 2004**

IHLING, C. ; BOHRMANN, B. ; SCHAEFER, H.E. ; TECHNANU-IHLING, K. ; LOEFFLER, B.M.: Endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in human atherosclerosis - novel targets for pharmacotherapy in atherosclerosis. In: *Curr Vasc Pharmacol* 2 (2004), Nr. 3, S. 249–258

**IJPENBERG et al. 1997**

IJPENBERG, A. ; JEANNIN, E. ; WAHLI, W. ; DESVERGNE, B.: Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 32, S. 20108–20117

**IP et al. 1999a**

IP, C. ; BANNI, S. ; ANGIONI, E. ; CARTA, G. ; MCGINLEY, J. ; THOMPSON, H.J. ; BARBANO, D. ; BAUMAN, D.: Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. In: *J Nutr* 129 (1999), S. 2135–2142

**IP et al. 1991**

IP, C. ; CHIN, S.F. ; SCIMECA, J.A. ; PARIZA, M.W.: Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. In: *Cancer Res* 51 (1991), S. 6118–6124

**IP et al. 1999b**

IP, M.M. ; MASSO-WELCH, P.A. ; SHOEMAKER, S.F. ; SHEA-EATON, W.K. ; IP, C.: Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. In: *Exp Cell Res* 250 (1999), Nr. 1, S. 22–34

**IWAKIRI et al. 2002**

IWAKIRI, Y. ; SAMPSON, D.A. ; ALLEN, K.G.D.: Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. In: *Prost Leuk Fatty Acids* 67 (2002), Nr. 6, S. 435–443

**IWASHINA et al. 1996**

IWASHINA, M. ; HIRATA, Y. ; IMAI, T. ; SATO, K. ; MARUMO, F.: Molecular cloning of endothelial, inducible nitric oxide synthase gene from rat aortic endothelial cell. In: *Eur J Biochem* 237 (1996), Nr. 3, S. 668–673

**JACKSON et al. 1999**

JACKSON, S.M. ; PARHAMI, F. ; XI, X.-P. ; BERLINER, J.A. ; HSUEH, W.A. ; LAW, R.E. ; DEMER, L.L.: Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cells interaction. In: *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 19 (1999), S. 2094–2104

**JAUDSZUS et al. 2005**

JAUDSZUS, A. ; FOERSTER, M. ; KROEGEL, C. ; WOLF, I. ; JAHREIS, G.: *Cis-9,trans-11-CLA* exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: comparison to *trans-10,cis-12-CLA* and to linoleic acid. In: *Biochim Biophys Acta* 1737 (2005), S. 111–118

**JIANG et al. 1999**

JIANG, J. ; WOLK, A. ; VESSBY, B.: Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. In: *Am J Clin Nutr* 70 (1999), Nr. 1, S. 21–27

**KAJITA et al. 2004**

KAJITA, K. ; MUNE, T. ; KANO, Y. ; NATSUME, Y. ; ISHIZAWA, M. ; KAWAI, Y. ; YASUDA, K. ; SUGIYAMA, C. ; ISHIZUKA, T.: TNF $\alpha$  reduces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) via the production of ceramide and activation of atypical PKC. In: *Diabetes Res Clin Pract* 66 (2004), S. S79–S83

**KARIM et al. 1996**

KARIM, S. ; HABIB, A. ; LEVY-TOLEDANO, S. ; MACLOUF, J.: Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 20, S. 12042–12048

**KARLSON et al. 1994**

KARLSON, P. ; DOENECKE, D. ; KOOLMAN, J.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 1994

**KASPER 2004**

KASPER, H.: *Ernährungsmedizin und Diätetik*. 10. München, Jena : Urban und Fischer, 2004

**KAVANAUGH et al. 1999**

KAVANAUGH, C.J. ; LIU, K.-L. ; BELURY, M.A.: Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE<sub>2</sub> production and hyperplasia in mouse epidermis. In: *Nutr Cancer* 33 (1999), Nr. 2, S. 132–138

**KNOWLES u. MONCADA 1992**

KNOWLES, R.G. ; MONCADA, S.: Nitric oxide as a signal in blood vessels. In: *Trends Biochem Sci* 17 (1992), Nr. 10, S. 399–402

**KOCH et al. 1993**

KOCH, A.E. ; KUNKEL, S.L. ; PEARCE, W.H. ; SHAH, M.R. ; PARIKH, D. ; EVANOFF, H.L. ; HAINES, G.K. ; BURDICK, M.D. ; STRIETER, R.M.: Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. In: *Am J Pathol* 142 (1993), Nr. 5, S. 1423–1431

**KOGA et al. 2002**

KOGA, T. ; CLAYCOMBE, K. ; MEYDANI, M.: Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. In: *Atherosclerosis* 161 (2002), S. 365–374

**KOHNO et al. 2001**

KOHNO, M. ; OHMORI, K. ; WADA, Y. ; KONDO, I. ; NOMA, T. ; FUJITA, N. ; MANDAL, A.K. ; MIZUSHIGE, K.: Inhibition by eicosapentaenoic acid oxidized-LDL- and lysophosphatidylcholine-induced human coronary artery smooth muscle cell production of endothelin. In: *J Vasc Res* 38 (2001), S. 379–388

**KOOLMAN u. RÖHM 1998**

KOOLMAN, J. ; RÖHM, K.-H.: *Taschenatlas der Biochemie*. Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 1998

**KRISHNASWAMY et al. 1999**

KRISHNASWAMY, G. ; KELLEY, J. ; YERRA, L. ; SMITH, J.K. ; CHI, D.S.: Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. In: *J Interferon Cytokine Res* 19 (1999), S. 91–104

**KRITCHEVSKY et al. 2000**

KRITCHEVSKY, D. ; TEPPER, S.A. ; WRIGHT, S. ; TSO, P. ; CZARNECKI, S.K.: Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. In: *J Am Coll Nutr* 19 (2000), Nr. 4, S. 472S–477S

**KUNSCH u. MEDFORD 1999**

KUNSCH, C. ; MEDFORD, R.M.: Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. In: *Circ Res* 85 (1999), S. 753–766

**LAMPEN et al. 2005**

LAMPEN, A. ; LEIFHEIT, M. ; VOSS, J. ; NAU, H.: Molecular and cellular effects of *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression. In: *Biochim Biophys Acta* 1735 (2005), Nr. 1, S. 30–40

**LEE et al. 2005**

LEE, J.H. ; CHO, K.H. ; LEE, K.T. ; KIM, M.R.: Antiatherogenic effects of structured lipid containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice. In: *J Agric Food Chem* 53 (2005), Nr. 18, S. 7295–7301

**LEE et al. 2001**

LEE, J.Y. ; SOHN, K.H. ; RHEE, S.H. ; HWANG, D.: Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 20, S. 16683–16689

**LEE et al. 1994**

LEE, K.N. ; KRITCHEVSKY, D. ; PARIZA, M.W.: Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. In: *Atherosclerosis* 108 (1994), S. 19–25

**LEHMANN et al. 1995**

LEHMANN, J.M. ; MOORE, L.B. ; SMITH-OLIVER, T.A. ; WILKINSON, W.O. ; WILLSON, T.M. ; KLIEWER, S.A.: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nr. 22, S. 12953–12956

**LEHNINGER et al. 1998**

LEHNINGER, A.L. ; NELSON, D.L. ; COX, M.M.: *Prinzipien der Biochemie*. 2. Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag, 1998

**LEITZMANN et al. 2001**

LEITZMANN, C. ; MÜLLER, C. ; MICHEL, P. ; BREHME, U. ; HAHN, A. ; LAUBE, H.: *Ernährung in Prävention und Therapie*. Stuttgart : Hippokrates Verlag GmbH, 2001

**LEMAIRE et al. 1998**

LEMAIRE, S. ; LIZARD, G. ; MONIER, S. ; MIGUET, C. ; GUELDRY, S. ; VOLOT, F. ; GAMBERT, P. ; NEEL, D.: Different patterns of IL-1 $\beta$  secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. In: *FEBS Letters* 440 (1998), S. 434–439

**LERMAN et al. 1995**

LERMAN, A. ; HOLMES, D.R. ; BELL, M.R. ; GARRATT, K.N. ; NISHIMURA, R.A. ; BURNETT, J.C.: Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. In: *Circulation* 92 (1995), Nr. 9, S. 2426–2431

**LEUNG u. LIU 2000**

LEUNG, Y.H. ; LIU, R.H.: *trans*-10,*cis*-12-conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than *cis*-9,*trans*-11-conjugated linoleic acid isomer. In: *J Agric Food Chem* 48 (2000), Nr. 11, S. 5469–5475

**LI u. GLASS 2002**

LI, A.C. ; GLASS, C.K.: The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. In: *Nature Med* 8 (2002), Nr. 11, S. 1235–1242

**LI u. WATKINS 1998**

LI, Y. ; WATKINS, B.A.: Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. In: *Lipids* 33 (1998), Nr. 4, S. 417–425

**LIBBY 2002**

LIBBY, P.: Inflammation in atherosclerosis. In: *Nature* 420 (2002), S. 868–874

**LIEW et al. 1995**

LIEW, C. ; SCHUT, H.A.J. ; CHIN, S.F. ; PARIZA, M.W. ; DASHWOOD, R.H.: Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo(4,5-*f*)quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. In: *Carcinogenesis* 16 (1995), S. 3037–3043

**LIN et al. 2004**

LIN, X. ; LOOR, J.J. ; HERBEIN, J.H.: *Trans*10,*cis*12-18:2 is a more potent inhibitor of de novo fatty acid synthesis and desaturation than *cis*9,*trans*11-18:2 in mammary gland of lactating mice. In: *J Nutr* 134 (2004), S. 1362–1368

**LISTER et al. 1988**

LISTER, M.D. ; DEEMS, R.A. ; WATANABE, Y. ; ULEVITCH, R.J. ; DENNIS, E.A.: Kinetic analysis of the Ca<sup>2+</sup>-dependent, membrane-bound, macrophage phospholipase A<sub>2</sub> and effects of arachidonic acid. In: *J Biol Chem* 263 (1988), Nr. 16, S. 7506–7513

**LIU u. BELURY 1997**

LIU, K.L. ; BELURY, M.A.: Conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester-induced events in murine keratinocytes. In: *Lipids* 32 (1997), Nr. 7, S. 725–730

**LIU u. BELURY 1998**

LIU, K.L. ; BELURY, M.A.: Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE<sub>2</sub> synthesis in murine keratinocytes. In: *Cancer Lett* 127 (1998), S. 15–22

**LIU et al. 2004**

LIU, L. ; ZUBIK, L. ; COLLINS, F.W. ; MARKO, M. ; MEYDANI, M.: The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. In: *Atherosclerosis* 175 (2004), S. 39–49

**LÖFFLER u. PETRIDES 1997**

LÖFFLER, G. ; PETRIDES, P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag, 1997

**LONG u. PEKALA 1996**

LONG, S.D. ; PEKALA, P.H.: Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E<sub>2</sub>. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 2, S. 1138–1144

**LUCAS u. GREAVES 2001**

LUCAS, A.D. ; GREAVES, D.R.: Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. In: *Expert Rev Mol Med* (2001), S. 1–18

**LÜSCHER u. NOLL 1995**

LÜSCHER, T.F. ; NOLL, G.: The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. In: *Atherosclerosis* 118 (1995), S. S81–S90

**LÜSCHER u. NOLL 1996**

LÜSCHER, T.F. ; NOLL, G.: Endothelial function as an end-point in interventional trials: concepts, methods and current data. In: *J Hypertens Suppl* 14 (1996), Nr. 2, S. 111–119

**LUSIS 2000**

LUSIS, A.J.: Atherosclerosis. In: *Nature* 407 (2000), S. 233–241

**LYONS-GIORDANO et al. 1989**

LYONS-GIORDANO, B. ; DAVIS, G.L. ; GALBRAITH, W. ; PRATTA, M.A. ; ARNER, E.C.: Interleukin-1 $\beta$  stimulates phospholipase A<sub>2</sub> mRNA synthesis in rabbit articular chondrocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 164 (1989), S. 488–495

**MACLOUF et al. 1998**

MACLOUF, J. ; FOLCO, G. ; PATRONO, C.: Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. In: *Thromb Haemost* 79 (1998), Nr. 4, S. 691–705

**MARKS u. FÜRSTENBERGER 1999**

MARKS, F. (Hrsg.) ; FÜRSTENBERGER, G. (Hrsg.): *Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids. From biogenesis to clinical application*. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapur, Toronto : Wiley - VCH, 1999

**MARTIN u. VALEILLE 2002**

MARTIN, J.-C. ; VALEILLE, K.: Conjugated linoleic acids: all the same or everyone its own function? In: *Reprod Nutr Dev* 42 (2002), S. 525–536

**MARTIN-NIZARD et al. 2004**

MARTIN-NIZARD, F. ; SAHPAZ, S. ; KANDOSSI, A. ; CARPENTIER, M. ; FRUCHART, J.C. ; DURIEZ, P. ; BAILLEUL, F.: Natural phenylpropanoids inhibit lipoprotein-induced endothelin-1 secretion by endothelial cells. In: *J Pharm Pharmacol* 56 (2004), Nr. 12, S. 1607–1611

**MARX et al. 1999**

MARX, N. ; BOURCIER, T. ; SUKHOVA, G.K. ; LIBBY, P. ; PLUTZKY, J.: PPAR $\gamma$  activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression. PPAR $\gamma$  as a potential mediator in vascular disease. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999), S. 546–551

**MASAKI 1995**

MASAKI, T.: Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35 (1995), S. 235–255

**MATHERS 2003**

MATHERS, J.C.: Nutrients and apoptosis. In: ZEMPLINI, J. (Hrsg.) ; DANIEL, H. (Hrsg.): *Molecular Nutrition*. Wallingford : CAB International, 2003, Kap. 6, S. 73–89

**MC GUIRE et al. 1999**

MC GUIRE, M.K. ; MC GUIRE, M.A. ; RITZENTHALER, K. ; SHULTZ, T.D.: Dietary sources and intakes of conjugated linoleic acid intake in humans. In: YURAWECZ, M.P. (Hrsg.): *Advances in conjugated linoleic acid research* Bd. 1. Champaign : AOCS Press, 1999, Kap. 29, S. 369–377

**MC NEEL u. MERSMANN 2003**

MC NEEL, R.L. ; MERSMANN, H.J.: Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. In: *J Nutr Biochem* 14 (2003), Nr. 5, S. 266–274

**MEERARANI et al. 2003**

MEERARANI, P. ; REITERER, G. ; TOBOREK, M. ; HENNIG, B.: Zinc modulates PPAR $\gamma$  signaling and activation of porcine endothelial cells. In: *J Nutr* 133 (2003), S. 3058–3064

**MICHAL 1998**

MICHAL, G. (Hrsg.): *Biochemical Pathways*. Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998

**MIRALPEIX et al. 1997**

MIRALPEIX, M. ; CAMACHO, M. ; LOPEZ-BELMONTE, J. ; CANALIAS, F. ; BELETA, J. ; PALACIOS, J.M. ; VILA, L.: Selective induction of cyclo-oxygenase-2 activity in the permanent endothelial cell line HUV-EC-C: biochemical and pharmacological characterization. In: *Br J Pharmacol* 121 (1997), S. 171–180

**MONACO u. PALEOLOG 2004**

MONACO, C. ; PALEOLOG, E.: Nuclear factor  $\kappa$ B: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. In: *Cardiovasc Res* 61 (2004), S. 671–682

**MONCADA u. VANE 1984**

MONCADA, S. ; VANE, J.R.: Prostacyclin and clinical applications. In: *Ann Clin Res* 16 (1984), Nr. 5-6, S. 241–252

**MOSMANN 1983**

MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J Immunol Methods* 65 (1983), Nr. 1-2, S. 55–63

**MOYA-CAMERENA et al. 1999**

MOYA-CAMERENA, S.Y. ; VANDEN HEUVEL, J.P. ; BLANCHARD, S.G. ; LEESNITZER, L.A. ; BELURY, M.A.: Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR $\alpha$ . In: *J Lipid Res* 40 (1999), S. 1426–1433

**MÜLLER 2001**

MÜLLER, H.-J.: *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Berlin, Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2001

**MUNDAY et al. 1999**

MUNDAY, J.S. ; THOMPSON, K.G. ; JAMES, K.A.C.: Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. In: *Br J Nutr* 81 (1999), S. 251–255

**MURAKAMI u. KUDO 2002**

MURAKAMI, M. ; KUDO, I.: Phospholipase A<sub>2</sub>. In: *J Biochem* 131 (2002), S. 285–292

**NAKAMURA u. NARA 2002**

NAKAMURA, M.T. ; NARA, T.Y.: Gen regulation of mammalian desaturases. In: *Biochem Soc Trans* 30 (2002), Nr. Pt 6, S. 1076–1079

**NARA et al. 2002**

NARA, T.Y. ; HE, W.S. ; TANG, C. ; CLARKE, S.D. ; NAKAMURA, M.T.: The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human  $\Delta$ -6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. In: *Biochem Biophys Res Commun* 296 (2002), Nr. 1, S. 111–117

**NICOLOSI et al. 1997**

NICOLOSI, R.J. ; ROGERS, E.J. ; KRITCHEVSKY, D. ; SCIMECA, J.A. ; HUTH, P.J.: Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. In: *Artery* 22 (1997), Nr. 5, S. 266–277

**NIESSEN et al. 2003**

NIESSEN, H.W.M. ; KRIJNEN, P.A.J. ; VISSER, C.A. ; MEIJER, C.J.L.M. ; HACK, C.E.: Type II secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes? In: *Cardiovasc Res* 60 (2003), S. 68–77

**NOH et al. 2002**

NOH, H. ; HA, H. ; YU, M.R. ; KANG, S.W. ; CHOI, K.H. ; HAN, D.S. ; LEE, H.Y.: High glucose increases inducible NO production in cultured rat mesangial cells. In: *Nephron* 90 (2002), S. 78–85

**NUGENT et al. 2005**

NUGENT, A.P. ; ROCHE, H.M. ; NOONE, E.J. ; LONG, A. ; KELLEHER, D.K. ; GIBNEY, M.J.: The effects of conjugated linoleic acid supplementation on immune function in healthy volunteers. In: *Eur J Clin Nutr* 59 (2005), Nr. 6, S. 742–750

**NUGTEREN u. CHRIST-HAZELHOF 1987**

NUGTEREN, D.H. ; CHRIST-HAZELHOF, E.: Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. In: *Prostaglandins* 33 (1987), Nr. 3, S. 403–417

**OATES et al. 1988**

OATES, J.A. ; FITZGERALD, G.A. ; BRANCH, R.A. ; JACKSON, E.K. ; KNAPP, H.R. ; ROBERTS, L.J.: Clinical implication of prostaglandin and thromboxane A2 formation (1). In: *N Engl J Med* 319 (1988), Nr. 11, S. 689–698

**OKA u. ARITA 1991**

OKA, S. ; ARITA, H.: Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A<sub>2</sub> in rat cultured astrocytes: two distinct pathways of the gene expression. In: *J Biol Chem* 266 (1991), S. 9956–9960

**OKUDA et al. 1997**

OKUDA, Y. ; KAWASHIMA, K. ; SAWADA, T. ; TSURUMARU, K. ; ASANO, M. ; SUZUKI, S. ; SOMA, M. ; NAKAJIMA, T. ; YAMASHITA, K.: Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 232 (1997), Nr. 2, S. 487–491

**OREM et al. 2001**

OREM, A. ; OREM, C. ; ALIOGLU, Y. ; VANIZOR, B. ; ERDOL, C.: Effect of coronary angiography on plasma endothelin-1 and nitric oxide concentration. In: *Angiology* 52 (2001), Nr. 4, S. 231–235

**ÖST et al. 1998**

ÖST, M. ; UHL, E. ; CARLSSON, M. ; GIDLÖF, A. ; SÖDERKVIST, P. ; SIRSJÖ, A.: Expression of mRNA for phospholipase A<sub>2</sub>, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cultured human umbilical vascular endothelial and smooth muscle cells and biopsies from umbilical arteries and veins. In: *J Vasc Res* 35 (1998), S. 150–155

**PARK et al. 2001**

PARK, H.J. ; LEE, Y.W. ; HENNIG, B. ; TOBOREK, M.: Linoleic acid-induced VCAM-1 expression in human microvascular endothelial cells is mediated by NF- $\kappa$ B-dependent pathway. In: *Nutr Cancer* 41 (2001), Nr. 1-2, S. 126–134

**PARK u. PARIZA 1998**

PARK, Y. ; PARIZA, M.W.: Evidence that commercial calf and horse sera can contain substantial amounts of trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. In: *Lipids* 33 (1998), S. 817–819

**PARK et al. 2005**

PARK, Y. ; STORKSON, J.M. ; ALBRIGHT, K.J. ; LIU, W. ; PARIZA, M.W.: Biological activities of conjugated fatty acids: conjugated eicosadienoic (conj. 20:2 $\Delta^{c11,t13/t12,c14}$ ), eicosatrienoic (conj. 20:3 $\Delta^{c8,t12,c14}$ ), and heneicosadienoic (conj. 21:2 $\Delta^{c12,t14/c13,t15}$ ) acids and other metabolites of conjugated linoleic acids. In: *Biochim Biophys Acta* 1687 (2005), Nr. 1-3, S. 120–129

**PASCERI et al. 2001**

PASCERI, V. ; CHANG, J. ; WILLERSON, J.T. ; YEH, E.T.H.: Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. In: *Circulation* 103 (2001), S. 2531–2534

**PEARSON 2000**

PEARSON, J.D.: Normal endothelial cell function. In: *Lupus* 9 (2000), Nr. 3, S. 183–188

**PFAFFL 2001**

PFAFFL, M.W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29 (2001), Nr. 9, S. 2002–2007

**PICH et al. 1993**

PICH, I. ; LÓPEZ, S. ; VILA, L. ; LAGUNAS, C. ; CASTELLARNAU, C. de: Influence of fatty acid anilides present in toxic oils on the metabolism of exogenous arachidonic acid in cultured human endothelial cells. In: *Toxicology* 77 (1993), S. 51–63

**PLUTZKY 2001**

PLUTZKY, J.: Peroxisome proliferator-activated receptors in endothelial cell biology. In: *Curr Opin Lipidol* 12 (2001), S. 511–518

**POULOS et al. 2001**

POULOS, S.P. ; SISK, M. ; HAUSMANN, D.B. ; AZAIN, M.J. ; HAUSMANN, G.J.: Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. In: *J Nutr* 131 (2001), S. 2722–2731

**PRICE u. LOSCALZO 1999**

PRICE, D.T. ; LOSCALZO, J.: Cellular adhesion molecules and atherogenesis. In: *Am J Med* 107 (1999), S. 85–97

**RACLOT et al. 1997**

RACLOT, T. ; GROSCOLAS, R. ; LANGIN, D. ; FERRE, P.: Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. In: *J Lipid Res* 38 (1997), Nr. 10, S. 1963–1972

**RAES et al. 2002**

RAES, K. ; HUYGHEBAERT, G. ; DE SMET, S. ; NOLLET, L. ; ARNOUITS, S. ; DEMEYER, D.: The deposition of conjugated linoleic acids in eggs of laying hens fed diets varying in fat level and fatty acid profile. In: *J Nutr* 132 (2002), S. 182–189

**RAGHUPATHI u. FRANSON 1992**

RAGHUPATHI, R. ; FRANSON, R.C.: Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> by *cis*-unsaturated fatty acids: evidence for the binding of fatty acid to enzyme. In: *Biochim Biophys Acta* 1126 (1992), Nr. 2, S. 206–214

**REHNER u. DANIEL 2002**

REHNER, G. ; DANIEL, H.: *Biochemie der Ernährung*. 2. Heidelberg, Berlin : Spektrum Akademischer Verlag, 2002

**REISSIG et al. 2003**

REISSIG, D. ; RASSOUL, F. ; SALVETTER, J. ; WAGNER, O. ; RICHTER, V.: Effect of fatty acids on expression of endothelial leukocyte adhesion molecules. In: *Eur J Nutr* 42 (2003), S. 224–227

**REITERER et al. 2004a**

REITERER, G. ; TOBOREK, M. ; HENNIG, B.: Peroxisome proliferator activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  require zinc for their anti-inflammatory properties in porcine vascular endothelial cells. In: *J Nutr* 134 (2004), S. 1711–1715

**REITERER et al. 2004b**

REITERER, G. ; TOBOREK, M. ; HENNIG, B.: Quercetin protects against linoleic acid-induced porcine endothelial cell dysfunction. In: *J Nutr* 134 (2004), S. 771–775

**RICHTER 2003**

RICHTER, G.: *Praktische Biochemie*. Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 2003

**RICHTER et al. 1999**

RICHTER, V. ; WAGNER, O.F. ; RASSOUL, F.: Circulating cell adhesion molecules in patients with risk for atherosclerosis. In: *Atherosclerosis* 144 (1999), Nr. 1, S. 56

**RICOTE et al. 1998**

RICOTE, M. ; LI, A.C. ; WILLSON, T.M. ; KELLY, C.J. ; GLASS, C.K.: The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. In: *Nature* 391 (1998), Nr. 6662, S. 79–82

**RIEDE et al. 2004**

RIEDE, U.-N. ; WERNER, M. ; SCHÄFER, H.-E.: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Stuttgart, New York : Georg Thieme Verlag, 2004

**RINGSEIS et al. 2006**

RINGSEIS, R. ; MÜLLER, A. ; HERTER, C. ; GAHLER, S. ; STEINHART, H. ; EDER, K.: CLA isomers inhibit TNF $\alpha$ -induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR $\gamma$  ligand-like action. In: *Biochim Biophys Acta* 1760 (2006), S. 290–300

**RINKER et al. 2004**

RINKER, K.D. ; KIRKPATRICK, A.P. ; TING-BEALL, H.P. ; SHEPHERD, R.D. ; LEVIN, J.D. ; IRICK, J. ; THOMAS, J.L. ; TRUSKEY, G.A.: Linoleic acid increases monocyte deformation and adhesion to endothelium. In: *Atherosclerosis* 177 (2004), S. 275–285

**RIZZO et al. 2000**

RIZZO, M.T. ; NGUYEN, E. ; ALDO-BENSON, M. ; LAMBEAU, G.: Secreted phospholipase A<sub>2</sub> induces vascular endothelial cell migration. In: *Blood* 96 (2000), Nr. 12, S. 3809–3815

**RIZZO u. YU 1999**

RIZZO, M.T. ; YU, W.-M.: Arachidonic acid induces endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. In: *J Cell Biochem* 75 (1999), S. 724–733

**RÖSEN 2002**

RÖSEN, P.: Endotheliale Dysfunktionen: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. In: *J Kardiol* 9 (2002), Nr. 12, S. 556–562

**ROSENTHAL u. WHITEHURST 1983**

ROSENTHAL, M.D. ; WHITEHURST, M.C.: Fatty acid  $\Delta 6$  desaturation activity of cultured human endothelial cells. Modulation by fetal bovine serum. In: *Biochim Biophys Acta* 750 (1983), S. 490–496

**ROSS 1993**

ROSS, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. In: *Nature* 362 (1993), S. 801–809

**ROSS 1999**

ROSS, R.: Atherosclerosis - an inflammatory disease. In: *N Engl J Med* 340 (1999), Nr. 2, S. 115 – 126

**ROSS u. GLOMSET 1973**

ROSS, R. ; GLOMSET, J.A.: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. In: *Science* 180 (1973), S. 1332–1339

**ROSSI et al. 2001**

ROSSI, G.P. ; SECCIA, T.M. ; NUSSDORFER, G.G.: Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of cardiovascular system. In: *Int Rev Cytol* 209 (2001), S. 241–272

**ROTHLEIN et al. 1988**

ROTHLEIN, R. ; CZAJKOWSKI, M. ; O'NEILL, M.M. ; MARLIN, S.D. ; MAINOLFI, E. ; MERLUZZI, V.J.: Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by proinflammatory cytokines. In: *J Immunol* 141 (1988), Nr. 5, S. 1665–1669

**SARASWATHI et al. 2004**

SARASWATHI, V. ; WU, G. ; TOBOREK, M. ; HENNIG, B.: Linoleic acid-induced endothelial activation: role of calcium and peroxynitrite signaling. In: *J Lipid Res* 45 (2004), S. 794–804

**SCHIFFRIN 2001**

SCHIFFRIN, E.L.: Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. In: *J Hypertens* 14 (2001), S. 83S–89S

**SCHNEEBERGER et al. 1971**

SCHNEEBERGER, E.E. ; LYNCH, R.D. ; GEYER, R.P.: Formation and disappearance of triglyceride droplets in strain L fibroblasts. In: *Exp Cell Res* 69 (1971), S. 193–206

**SCHRÖR 1985**

SCHRÖR, K.: Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells. In: *Basic Res Cardiol* 80 (1985), S. 502–514

**SEBEDIO et al. 2001**

SEBEDIO, J.L. ; ANGIONI, E. ; CHARDIGNY, S. ; GREGOIRE, S. ; JUANEDA, P. ; BERDEAUX, O.: The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. In: *Lipids* 36 (2001), S. 575–582

**SEBEDIO et al. 1997**

SEBEDIO, J.L. ; JUANEDA, P. ; DOBSON, G. ; RAMILISON, I. ; MARTN, J.C. ; CHARDIGNY, J.M. ; CHRISTIE, W.W.: Metabolites of conjugated isomers of linoleic acids (CLA) in the rat. In: *Biochim Biophys Acta* 1345 (1997), S. 5–10

**SHEN et al. 2004**

SHEN, C.L. ; DUNN, D.M. ; HENRY, J.H. ; LI, Y. ; WATKINS, B.A.: Decreased production of inflammatory mediators in human osteoarthritic chondrocytes by conjugated linoleic acids. In: *Lipids* 39 (2004), Nr. 2, S. 161–169

**SHER et al. 2003**

SHER, J. ; PRONCZUK, A. ; HAJRI, T. ; HAYES, K. C.: Dietary conjugated linoleic acid lowers plasma cholesterol during cholesterol supplementation, but accentuates the atherogenic lipid profile during the acute phase response in hamsters. In: *J Nutr* 133 (2003), Nr. 2, S. 456–460

**SHIN et al. 2002**

SHIN, W.S. ; SZUBA, A. ; ROCKSON, S.G.: The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. In: *Atherosclerosis* 160 (2002), S. 91–102

**SIMON et al. 1982**

SIMON, I. ; BURNS, C.P. ; SPECTOR, A.A.: Electron spin resonance studies on intact cells and isolated lipid droplets from fatty acid-modified L1210 murine leukemia. In: *Cancer Res* 42 (1982), S. 2715–2721

**SOINI et al. 2001**

SOINI, Y. ; PUHAKKA, A. ; KAHLOS, K. ; SÄILY, M. ; PÄÄKKÖ, P. ; KOISTINEN, P. ; KINNULA, V.: Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. In: *Histopathology* 39 (2001), S. 179–186

**SONG et al. 2002a**

SONG, H.J. ; YU, G. ; BESTWICK, C.S. ; SNEDDON, A.A. ; CHOE, S.-N. ; GRANT, I. ; HEYS, S.D. ; WAHLE, K.W.J.: Regulation of NF-kappaB activation in prostate cancer cells by n-3 polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA). Graz : 43rd ICBL, 2002

**SONG et al. 2002b**

SONG, W. ; NARA, T.Y. ; NAKAMURA, M.T.: Delayed induction of  $\Delta$ -6 and  $\Delta$ -5 desaturases by peroxisome proliferator. In: *Biochem Biophys Res Commun* 299 (2002), Nr. 5, S. 832–838

**SPECTOR et al. 1981**

SPECTOR, A.A. ; MATHUR, S.N. ; KADUCE, T.L. ; HYMAN, B.T.: Lipid nutrition and metabolism of cultured mammalian cells. In: *Prog Lipid Res* 19 (1981), S. 155–186

**STANGL 2000a**

STANGL, G.I.: Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats. In: *J Nutr* 130 (2000), S. 1140–1146

**STANGL 2000b**

STANGL, G.I.: High dietary levels of a conjugated linoleic acid mixture alter hepatic glycerophospholipid class profile and cholesterol-carrying serum lipoproteins of rats. In: *J Nutr Biochem* 11 (2000), Nr. 4, S. 184–191

**SUGANO et al. 1998**

SUGANO, M. ; TSUJITA, A. ; YAMASAKI, M. ; NOGUCHI, M. ; YAMADA, K.: Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. In: *Lipids* 33 (1998), Nr. 5, S. 521–527

**SUGANO et al. 1997**

SUGANO, M. ; TSUJITA, A. ; YAMASAKI, M. ; YAMADA, K. ; IKEDA, L. ; KRITCHEVSKY, D.: Lymphatic recovery, tissue distribution, and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats. In: *J Nutr Biochem* 8 (1997), S. 38–43

**SUGANO et al. 1999**

SUGANO, M. ; YAMASAKI, M. ; YAMADA, K. ; HUANG, Y.-S.: Effect of conjugated linoleic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and immune function. In: YURAWECZ, M.P. (Hrsg.): *Advances in conjugated linoleic acid research*. 1. Champaign : AOCS Press, 1999, Kap. 25, S. 327–339

**SUNG et al. 2004**

SUNG, C.K. ; SHE, H. ; XIONG, S. ; TSUKAMOTO, H.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286 (2004), S. G722–G729

**SUZUKI et al. 1997**

SUZUKI, E. ; SANO, A. ; KURIKI, T. ; MIKI, T.: Improved separation and determination of phospholipids in animal tissue employing solid phase extraction. In: *Biol Pharm Bull* 20 (1997), S. 299–303

**TANG et al. 2003**

TANG, C. ; CHO, H.P. ; NAKAMURA, M.T. ; CLARKE, S.D.: Regulation of human  $\Delta$ -6 desaturase gene transcription: identification of a functional direct repeat-1 element. In: *J Lipid Res* 44 (2003), Nr. 4, S. 686–695

**TCHEKNEVA et al. 2000**

TCHEKNEVA, E. ; LAWRENCE, M.L. ; MEYRICK, B.: Cell-specific differences in ET-1 system in adjacent layers of main pulmonary artery. A new source of ET-1. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278 (2000), S. L813–L821

**TERKELTAUB et al. 1998**

TERKELTAUB, R. ; BOISVERT, W.A. ; CURTISS, L.K.: Chemokines and atherosclerosis. In: *Curr Opin Lipidol* 9 (1998), S. 397–405

**TOBOREK u. KAISER 1999**

TOBOREK, M. ; KAISER, S.: Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. In: *Basic Res Cardiol* 94 (1999), Nr. 5, S. 295–314

**TOBOREK et al. 2002**

TOBOREK, M. ; LEE, Y.W. ; GARRIDO, R. ; KAISER, S. ; HENNIG, B.: Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. In: *Am J Clin Nutr* 75 (2002), S. 119–125

**TOOMEY et al. 2003**

TOOMEY, S. ; ROCHE, H. ; FITZGERALD, D. ; BELTON, O.: Regression of pre-established atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mouse by conjugated linoleic acid. In: *Biochem Soc Trans* 31 (2003), Nr. 5, S. 1075–1079

**TORRES-DUARTE u. VANDERHOEK 2003**

TORRES-DUARTE, A.P. ; VANDERHOEK, J.Y.: Conjugated linoleic acid exhibits stimulatory and inhibitory effects on prostanoid production in human endothelial cells and platelets. In: *Biochim Biophys Acta* 1640 (2003), S. 69–76

**TOUQUI u. ALAOUI-EL-AZHER 2001**

TOUQUI, L. ; ALAOUI-EL-AZHER, M.: Mammalian secreted phospholipase A<sub>2</sub> and their pathophysiological significance in inflammatory diseases. In: *Curr Mol Med* 1 (2001), S. 739–754

**URQUHART et al. 2001**

URQUHART, P. ; PARKIN, S.M. ; NICOLAOU, A.: Profile of eicosanoids produced by human saphenous vein endothelial cells and the effect of dietary fatty acids. In: *Prost Leuk Fatty Acids* 65 (2001), Nr. 1, S. 15–22

**URQUHART et al. 2002**

URQUHART, P. ; PARKIN, S.M. ; ROGERS, E.J. ; BOSLEY, J.A. ; NICOLAOU, A.: The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. In: *Biochim Biophys Acta* 1580 (2002), S. 150–160

**VAPORCIYAN et al. 1993**

VAPORCIYAN, A.A. ; JONES, M.L. ; WARD, P.A.: Rapid analysis of leukocyte-endothelial adhesion. In: *J Immunol Methods* 159 (1993), S. 93–100

**VASSALLE et al. 2003**

VASSALLE, C. ; DOMENICI, C. ; LUBRANO, V. ; L'ABBATE, A.: Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways in endothelial cells. In: *J Vasc Res* 40 (2003), S. 491–499

**VISTICA et al. 1991**

VISTICA, D.T. ; SKEHAN, P. ; SCUDIERO, D. ; MONKS, A. ; PITTMAN, A. ; BOYD, M.R.: Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. In: *Cancer Res* 51 (1991), Nr. 10, S. 2515 – 2520

**VOET u. VOET 1994**

VOET, D. ; VOET, J.G.: *Biochemie*. 1. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1994

**VOGEL et al. 1997**

VOGEL, R.A. ; CORRETTI, M.C. ; PLOTNICK, G.D.: Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. In: *Am J Cardiol* 79 (1997), Nr. 3, S. 350–354

**VOSSEN et al. 1991**

VOSSEN, R.C.R.M. ; DAM-MIERAS, M.C.E. van ; LEMMENS, P.J.M.R. ; HORNSTRA, G. ; ZWAAL, R.F.A: Membrane fatty acid composition and endothelial cell functional properties. In: *Biochim Biophys Acta* 1083 (1991), S. 243–251

**WANG et al. 2002**

WANG, N. ; VERNA, L. ; CHEN, N.-G. ; CHEN, J. ; LI, H. ; FORMAN, B.M. ; STEMERMAN, M.B.: Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 37, S. 34176–34181

**WANG et al. 2003**

WANG, X. ; WANG, J. ; TRUDINGER, B.: Gene expression of nitric oxide synthase by human umbilical vein endothelial cells: the effect of fetal plasma from pregnancy with umbilical placental vascular disease. In: *Br J Obstet Gynaecol* 110 (2003), S. 53–58

**WANG et al. 2004**

WANG, X.L. ; CHEN, B.Q. ; YANG, Y.M. ; ZHENG, Y.M. ; LIU, J.R.: The effects of conjugated linoleic acid on the ability of murine macrophage in killing tumor cells. In: *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 38 (2004), Nr. 2, S. 107–110

**WARGENT et al. 2005**

WARGENT, E. ; SENNITT, M.V. ; STOCKER, C. ; MAYES, A.E. ; BROWN, L. ; O'DOWD, J. ; WANG, S. ; EINERHAND, A.W.C. ; MOHEDE, I. ; ARCH, J.R.S. ; CAWTHORNE, M.A.: Prolonged treatment of genetically obese mice with conjugated linoleic acid improves glucose tolerance and lowers plasma insulin concentration: possible involvement of PPAR activation. In: *Lipids Health Dis* 4 (2005), Nr. 3, S. 1–14

**WARNER 1999**

WARNER, T.D.: Relationships between the endothelin and nitric oxide pathways. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (1999), S. 247–252

**WARNER u. KLEMM 1996**

WARNER, T.D. ; KLEMM, P.: What turns on the endothelins? In: *Inflamm Res* 45 (1996), Nr. 2, S. 51–53

**WELDON et al. 2004**

WELDON, S. ; MITCHELL, S. ; KELLEHER, D. ; GIBNEY, M.J. ; ROCHE, H.M.: Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: no effect on molecular markers of cholesterol homeostasis in THP-1 macrophages. In: *Atherosclerosis* 174 (2004), S. 261–273

**WIGHAM et al. 2001**

WIGHAM, L.D. ; COOK, E.B. ; STAHL, J.L. ; SABAN, R. ; BJORLING, D.E. ; PARIZA, M.W. ; COOK, M.E.: CLA reduces antigen-induced histamine and PGE<sub>2</sub> release from sensitized guinea pig tracheae. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280 (2001), Nr. 3, S. R908–R912

**XU et al. 2001**

XU, X. ; OTSUKI, M. ; SAITO, H. ; SUMITANI, H. ; YAMAMOTO, H. ; SUMITANI, S. ; ASANUMA, N. ; KOUHARA, H. ; KASAYAMA, S.: PPAR $\alpha$  and GR differentially down-regulate the expression of nuclear factor- $\kappa$ B-responsive genes in vascular endothelial cells. In: *Endocrinology* 142 (2001), Nr. 8, S. 3332–3339

**YAMASAKI et al. 2002**

YAMASAKI, M. ; IKEDA, A. ; HIRAO, A. ; TANAKA, Y. ; RIKIMARU, T. ; SHIMADA, M. ; SUGIMACHI, K. ; TACHIBANA, H. ; YAMADA, K.: Dose-dependent effect of dietary conjugated linoleic acid on the growth of rat hepatoma dRLh-84 cells in vivo. In: *J Nutr Sci Vitaminol* 48 (2002), Nr. 6, S. 505–511

**YANAGISAWA et al. 1988**

YANAGISAWA, M. ; KURIHARA, H. ; KIMURA, S. ; TOMOBE, Y. ; KOBAYASHI, M. ; MITSU, Y. ; YAZAKI, Y. ; GOTO, K. ; MASAKI, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. In: *Nature* 332 (1988), S. 411–415

**YANG et al. 2002**

YANG, L. ; YU, H. ; JAMES, A.E. ; LAM, L.W. ; CHEN, Z.-Y.: Differential incorporation of conjugated linoleic acid isomers into egg yolk lipids. In: *J Agric Food Chem* 50 (2002), S. 4941–4946

**YANG et al. 2004**

YANG, Y.-Y. ; HU, C.-J. ; CHANG, S.-M. ; TAI, T.-Y. ; LEU, S.-J.: Aspirin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 expression in TNF $\alpha$  stimulated human umbilical vein endothelial cells. In: *Atherosclerosis* 174 (2004), S. 207–213

**YOUNG et al. 1998**

YOUNG, V.M. ; TOBOREK, M. ; YANG, F. ; MCCLAIN, C.J. ; HENNIG, B.: Effect of linoleic acid on endothelial cell inflammatory mediators. In: *Metabolism* 47 (1998), Nr. 5, S. 566–572

**YU et al. 2002**

YU, Y. ; CORRELL, P.H. ; VANDEN HEUVEL, J. P.: Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism. In: *Biochim Biophys Acta* (2002), Nr. 1581, S. 89–99

**YUAN et al. 1995**

YUAN, Y. ; JACKSON, S.P. ; NEWNHAM, H.H. ; MITCHELL, C.A ; SALEM, H.H.: An essential role for lysophosphatidylcholine in the inhibition of platelet aggregation by secretory phospholipase A<sub>2</sub>. In: *Blood* 86 (1995), Nr. 11, S. 4166–4174

**ZHANG et al. 1996**

ZHANG, B. ; BERGER, J. ; SZALKOWSKI, D. ; WHITE-CARRINGTON, S. ; SPIEGELMAN, B.M. ; MOLLER, D.E.: Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . In: *Mol Endocrinology* 10 (1996), Nr. 11, S. 1457–1466

## A Anhang

**Tab. A.1:** Anteile der gesättigten, der einfach ungesättigten und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (SFA, MUFA und PUFA) in den Gesamtlipiden der HAoEC.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis-9, trans-11 CLA</i>		<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>g/100 g Gesamtfettsäuren</i>					
C14:0	2,20 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,10 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,97 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>e</sup>
C16:0	19,67 ± 0,40 <sup>a</sup>	19,22 ± 0,08 <sup>b</sup>	11,48 ± 0,11 <sup>d</sup>	18,47 ± 0,08 <sup>c</sup>	8,31 ± 0,17 <sup>e</sup>
C16:1 n-7	2,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,03 <sup>d</sup>	2,01 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>e</sup>
C16:1 n-5	2,59 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,05 <sup>d</sup>	1,64 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,73 ± 0,07 <sup>e</sup>
C18:0	13,22 ± 0,25 <sup>a</sup>	12,91 ± 0,21 <sup>a</sup>	8,12 ± 0,12 <sup>b</sup>	13,47 ± 0,33 <sup>a</sup>	6,74 ± 0,32 <sup>c</sup>
C18:1 n-9	19,59 ± 0,45 <sup>a</sup>	17,70 ± 0,18 <sup>b</sup>	9,45 ± 0,13 <sup>d</sup>	16,12 ± 0,20 <sup>c</sup>	6,72 ± 0,07 <sup>e</sup>
C18:1 n-7	5,71 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,95 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,81 ± 0,10 <sup>d</sup>	5,07 ± 0,08 <sup>c</sup>	2,10 ± 0,04 <sup>e</sup>
C20:4 n-3	0,21 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,10 ± 0,08 <sup>d</sup>	0,57 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,04 ± 0,03 <sup>a</sup>
C20:5 n-3	1,09 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,80 ± 0,03 <sup>d</sup>	2,55 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,06 <sup>d</sup>
C22:5 n-3	3,29 ± 0,37 <sup>a</sup>	3,24 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,52 ± 0,35 <sup>a</sup>	2,29 ± 0,18 <sup>b</sup>
C22:6 n-3	7,24 ± 1,17 <sup>a</sup>	6,33 ± 1,22 <sup>ab</sup>	4,50 ± 1,02 <sup>b</sup>	6,42 ± 1,56 <sup>ab</sup>	5,06 ± 0,83 <sup>b</sup>
ΣPUFA n-3	11,97 ± 0,76 <sup>a</sup>	10,81 ± 0,71 <sup>ab</sup>	9,72 ± 0,70 <sup>b</sup>	12,07 ± 1,38 <sup>a</sup>	10,34 ± 0,69 <sup>b</sup>
C20:2 n-6	0,52 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,10 <sup>b</sup>
C22:4 n-6	1,77 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,76 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,88 ± 0,06 <sup>ab</sup>	2,14 ± 0,13 <sup>ab</sup>	2,20 ± 0,37 <sup>a</sup>
C22:5 n-6	0,33 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>a</sup>	< 0,1
ΣPUFA n-6	13,13 ± 2,63 <sup>a</sup>	11,45 ± 1,72 <sup>ab</sup>	9,04 ± 1,63 <sup>bc</sup>	11,42 ± 1,55 <sup>a</sup>	8,29 ± 1,39 <sup>c</sup>
ΣSFA	35,81 ± 0,41 <sup>a</sup>	34,94 ± 0,10 <sup>b</sup>	21,22 ± 0,29 <sup>c</sup>	35,29 ± 0,26 <sup>b</sup>	16,87 ± 0,30 <sup>d</sup>
ΣMUFA	31,05 ± 0,65 <sup>a</sup>	28,00 ± 0,29 <sup>b</sup>	14,90 ± 0,28 <sup>d</sup>	25,25 ± 0,20 <sup>c</sup>	10,65 ± 0,15 <sup>e</sup>
ΣPUFA	25,83 ± 0,48 <sup>e</sup>	29,09 ± 0,44 <sup>d</sup>	54,57 ± 1,02 <sup>b</sup>	32,59 ± 0,17 <sup>c</sup>	65,78 ± 0,68 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* oder *trans-10, cis-12 CLA* für 24 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

**Tab. A.2:** Anteile der gesättigten, der einfach ungesättigten und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (SFA, MUFA und PUFA) in der Phosphatidylethanolaminfraktion der HAoEC.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA		<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>g/100 g Gesamtfettsäuren</i>					
C14:0	2,91 ± 0,52 <sup>b</sup>	2,84 ± 0,72 <sup>b</sup>	3,35 ± 1,03 <sup>ab</sup>	3,49 ± 0,70 <sup>ab</sup>	4,10 ± 0,57 <sup>a</sup>
C16:0	12,52 ± 3,07 <sup>ab</sup>	11,01 ± 2,02 <sup>b</sup>	13,58 ± 0,82 <sup>a</sup>	12,72 ± 1,84 <sup>ab</sup>	12,56 ± 1,76 <sup>ab</sup>
C16:1 n-7	4,05 ± 1,40 <sup>b</sup>	4,29 ± 1,59 <sup>b</sup>	5,28 ± 1,36 <sup>ab</sup>	5,79 ± 2,00 <sup>a</sup>	5,69 ± 0,83 <sup>ab</sup>
C16:1 n-5	1,08 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,41 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,25 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,23 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,26 <sup>ab</sup>
C18:0	13,20 ± 1,22 <sup>b</sup>	13,82 ± 1,26 <sup>ab</sup>	14,00 ± 0,51 <sup>ab</sup>	13,67 ± 1,78 <sup>ab</sup>	15,02 ± 1,67 <sup>a</sup>
C18:1 n-9	13,49 ± 2,04 <sup>a</sup>	12,55 ± 1,22 <sup>ab</sup>	11,31 ± 1,49 <sup>b</sup>	13,42 ± 1,09 <sup>a</sup>	11,42 ± 1,62 <sup>b</sup>
C18:1 n-7	3,33 ± 1,39 <sup>ab</sup>	4,42 ± 1,58 <sup>a</sup>	2,25 ± 0,46 <sup>b</sup>	3,19 ± 0,92 <sup>ab</sup>	1,73 ± 0,41 <sup>b</sup>
C20:4 n-3	0,17 ± 0,16	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,32 ± 0,19
C20:5 n-3	1,35 ± 0,36 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,25 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,13 <sup>b</sup>
C22:5 n-3	3,69 ± 0,96 <sup>a</sup>	3,13 ± 1,39 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,59 <sup>b</sup>	2,70 ± 1,59 <sup>ab</sup>	1,51 ± 0,62 <sup>b</sup>
C22:6 n-3	5,80 ± 1,66 <sup>a</sup>	3,93 ± 1,76 <sup>b</sup>	2,83 ± 0,92 <sup>b</sup>	3,83 ± 1,59 <sup>b</sup>	3,07 ± 1,94 <sup>b</sup>
ΣPUFA n-3	11,81 ± 3,51 <sup>a</sup>	7,70 ± 3,66 <sup>b</sup>	5,00 ± 2,67 <sup>b</sup>	8,71 ± 3,53 <sup>ab</sup>	6,07 ± 2,79 <sup>b</sup>
C20:2 n-6	0,15 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,67 <sup>ab</sup>	1,23 ± 2,32 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,69 <sup>ab</sup>	0,48 ± 0,56 <sup>ab</sup>
C22:4 n-6	1,12 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,34 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,31 <sup>b</sup>	0,73 ± 0,25 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,25 <sup>b</sup>
C22:5 n-6	0,16 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,17 <sup>b</sup>	< 0,1	0,76 ± 0,84 <sup>a</sup>	< 0,1
ΣPUFA n-6	10,35 ± 3,26 <sup>a</sup>	9,39 ± 3,26 <sup>ab</sup>	7,28 ± 1,38 <sup>b</sup>	9,67 ± 2,00 <sup>ab</sup>	6,95 ± 0,96 <sup>b</sup>
ΣSFA	29,84 ± 4,35 <sup>bc</sup>	29,44 ± 3,00 <sup>c</sup>	33,20 ± 2,18 <sup>ab</sup>	32,02 ± 1,70 <sup>abc</sup>	33,56 ± 2,55 <sup>a</sup>
ΣMUFA	24,72 ± 1,81 <sup>ab</sup>	22,36 ± 2,15 <sup>bc</sup>	23,90 ± 5,91 <sup>ab</sup>	25,30 ± 1,58 <sup>a</sup>	21,30 ± 2,39 <sup>c</sup>
ΣPUFA	26,52 ± 7,45	22,54 ± 6,88	24,04 ± 9,21	23,04 ± 4,60	27,11 ± 6,60

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis*-9, *trans*-11 CLA oder *trans*-10, *cis*-12 CLA für 24 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

**Tab. A.3:** Anteile der gesättigten, der einfach ungesättigten und der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (SFA, MUFA und PUFA) in der Phosphatidylcholinfraktion der HAoEC.<sup>1,2,3</sup>

	Kontrolle	<i>cis-9, trans-11 CLA</i>		<i>trans-10, cis-12 CLA</i>	
		5 µmol/l	50 µmol/l	5 µmol/l	50 µmol/l
<i>g/100 g Gesamtfettsäuren</i>					
C14:0	4,00 ± 0,72 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,67 <sup>ab</sup>	3,03 ± 0,71 <sup>bc</sup>	3,92 ± 0,75 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,92 <sup>c</sup>
C16:0	26,29 ± 0,92 <sup>a</sup>	19,21 ± 5,07 <sup>c</sup>	19,10 ± 1,90 <sup>c</sup>	23,01 ± 1,79 <sup>b</sup>	16,68 ± 2,65 <sup>c</sup>
C16:1 n-7	5,88 ± 1,53 <sup>bc</sup>	6,18 ± 1,04 <sup>b</sup>	5,00 ± 0,72 <sup>bc</sup>	8,00 ± 1,51 <sup>a</sup>	4,64 ± 1,00 <sup>c</sup>
C16:1 n-5	2,43 ± 0,44 <sup>a</sup>	1,86 ± 0,60 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,13 <sup>c</sup>	1,05 ± 0,69 <sup>c</sup>	1,01 ± 0,23 <sup>c</sup>
C18:0	8,15 ± 0,40 <sup>b</sup>	10,96 ± 2,04 <sup>a</sup>	9,21 ± 0,79 <sup>b</sup>	8,63 ± 0,70 <sup>b</sup>	9,31 ± 1,84 <sup>b</sup>
C18:1 n-9	23,30 ± 1,40 <sup>a</sup>	17,96 ± 3,18 <sup>b</sup>	12,87 ± 1,98 <sup>c</sup>	19,74 ± 2,17 <sup>b</sup>	12,72 ± 3,85 <sup>c</sup>
C18:1 n-7	6,51 ± 0,75 <sup>a</sup>	4,52 ± 1,78 <sup>b</sup>	3,12 ± 0,91 <sup>c</sup>	4,80 ± 1,24 <sup>b</sup>	2,64 ± 0,53 <sup>c</sup>
C20:4 n-3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,57 ± 0,33
C20:5 n-3	0,59 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>b</sup>
C22:5 n-3	1,37 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,15 <sup>b</sup>
C22:6 n-3	1,29 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,77 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,20 <sup>b</sup>
ΣPUFA n-3	3,60 ± 0,88 <sup>a</sup>	2,93 ± 1,46 <sup>ab</sup>	2,84 ± 0,88 <sup>ab</sup>	2,50 ± 0,96 <sup>b</sup>	2,43 ± 0,71 <sup>ab</sup>
C20:2 n-6	0,20 ± 0,07	0,15 ± 0,05	< 0,1	0,23 ± 0,16	0,17 ± 0,16
C22:4 n-6	0,47 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,44 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,03 <sup>a</sup>
C22:5 n-6	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
ΣPUFA n-6	4,24 ± 1,04	3,92 ± 1,55	4,24 ± 1,92	4,17 ± 0,61	3,19 ± 0,21
ΣSFA	38,91 ± 1,36 <sup>a</sup>	34,76 ± 3,05 <sup>b</sup>	30,82 ± 3,50 <sup>c</sup>	36,88 ± 2,22 <sup>ab</sup>	29,96 ± 4,80 <sup>c</sup>
ΣMUFA	39,58 ± 2,80 <sup>a</sup>	31,26 ± 5,18 <sup>b</sup>	23,13 ± 3,46 <sup>c</sup>	33,89 ± 4,09 <sup>b</sup>	22,62 ± 6,00 <sup>c</sup>
ΣPUFA	10,72 ± 1,67 <sup>b</sup>	13,53 ± 1,67 <sup>b</sup>	31,53 ± 4,87 <sup>a</sup>	12,35 ± 3,73 <sup>b</sup>	33,58 ± 11,61 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Die Endothelzellen wurden in Medium ohne CLA (Kontrolle) oder mit 5 bzw. 50 µmol/l *cis-9, trans-11 CLA* oder *trans-10, cis-12 CLA* für 24 h inkubiert.

<sup>2</sup>Mittelwerte ± SD für mindestens drei unabhängige Experimente.

<sup>3</sup>Ergebnisse in einer Reihe mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden mit  $P < 0,05$ .

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Sabine Schleser

Geb. am 11. 12. 1975 in Apolda

Ledig

Deutsch

## Schulausbildung

1982–1991 Oberschule »Dr.-Theodor-Neubauer« in Apolda

1991–1994 Gymnasium »Bergschule« in Apolda

## Hochschulstudium

1994–1995 Studium des Bauingenieurwesens an der Hochschule für Architektur und Bauwesen in Weimar

1995–2000 Studium der Ökotrophologie an der Hochschule Anhalt (FH) in Bernburg  
Abschluss: Dipl.-oec.troph. (FH)

02/1997–06/1997 Auslandssemester an der Rijkshogeschool IJsseland in Deventer, Niederlande

## Berufstätigkeit

09/2000–02/2002 Fachberaterin für Ernährung bei der Verbraucher-Zentrale Thüringen e.V. in Erfurt

02/2002–03/2002 Sachbearbeiterin beim Referat »Ökologischer Landbau« an der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung in Bonn

03/2002–03/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

seit 04/2005 Promotionsstudentin

## Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die eingereichte Dissertation »Der Einfluss von konjugierten Linolsäure-Isomeren auf atheroskleroserelevante Parameter in humanen Endothelzellen der Aorta« selbständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Ferner versichere ich, dass ich die zur Erstellung der Dissertationsschrift verwendeten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe. Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Jena, 2. Mai 2006

---

Sabine Schleser

## Danksagung

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. K. Eder dafür, dass er mir die Möglichkeit gab als Doktorandin am Institut für Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität zu arbeiten. Weiterhin möchte ich mich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die motivierenden Diskussionen sowie die Möglichkeit zur Veröffentlichung und zur Präsentation meiner Ergebnisse bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. K. Becker für ihre Betreuung, die Einweisung in die experimentelle Arbeit, vor allem in die Zellkulturtechnik, sowie ihre Unterstützung und ihr Verständnis während der ersten eineinhalb Jahre am Institut. Bei Herrn Dr. R. Ringseis möchte ich mich für seine Betreuung und vor allem für die Durchsicht der Manuskripte der vorliegenden Arbeit, seine konstruktive Kritik, seine motivierende Art und seine Geduld bedanken.

Ein herzliches Dankschön geht an Frau Dr. R. Körting und Frau S. Barth, die mich bei der Durchführung der molekularbiologischen Analysen unterstützten. Frau A. Schibelius-Aßmann und Herrn W. Böttcher bin ich für ihre Unterstützung bei der Fettsäureanalytik zu Dank verpflichtet. Außerdem sei den Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Institutes für Ernährungswissenschaften gedankt, die mir so manches Mal mit Rat und Tat zur Seite gestanden sowie fachlich und menschlich für eine angenehme Zeit am Institut gesorgt haben.

Herrn A. Müller der Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Steinharts des Institutes für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei der Analytik der konjugierten Dien-Fettsäuren bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung des Projekts.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die einfach für mich da waren. Mein besonderer Dank gilt Andreas für seine Geduld, sein Verständnis und seine Hilfe, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.