

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Geschlechtsspezifische Unterschiede in  
intrazellulären und sezernierten Zytokinen und Chemokinen in  
Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC)

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dania van de Maat

aus Burgsteinfurt

Datum der Promotion: 04.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>.....</b>
<b>II.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>.....</b>
<b>III.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>.....</b>
<b>IV.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>.....</b>
<b>V.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>.....</b>
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Geschlechtsspezifische Unterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen .....	1
1.2.	Diskutierte Ursachen für geschlechtsspezifische Unterschiede .....	4
1.3.	Ursachen für Unterschiede zwischen Männern und Frauen bei Erkrankungen des.....	7
	Immunsystems.....	7
1.4.	Die Rolle von Zytokinen und Chemokinen bei inflammatorischen Prozessen im .....	9
	kardiovaskulären System.....	9
<b>2.</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT.....</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
3.1.	Verwendete Materialien und Chemikalien .....	15
3.2.	HUVEC-Präparation aus Nabelschnüren.....	19
3.3.	Zellkultur.....	19
3.3.1.	Kultivierung der Zellen .....	19
3.3.2.	Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Reinheit der HUVEC .....	20
3.3.3.	Bestimmung der Zellzahl und Behandlung der Zellen.....	22
3.3.4.	Einfrieren und Lagerung.....	23
3.3.5.	Zellyse und Abnahme des Zellkulturüberstandes .....	23
3.4.	Zytokin- und Chemokinarray .....	24
3.4.1.	Versuchsprinzip des Zytokin- und Chemokinarrays .....	24
3.4.2.	Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen in Zellkulturüberständen .....	26
3.4.3.	Analyse von Zytokinen und Chemokinen in Zelllysaten .....	29
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
4.1.	Immunfluoreszenz der HUVEC-Zellkultur .....	31
4.2.	Auswertungen der Zytokin- und Chemokinarrays mittels Chemilumineszenz .....	34
4.2.1.	Invertierung und Bezeichnung der Membranen .....	34
4.2.2.	Prinzip der Zuordnung detektierter Signale .....	35
4.2.3.	Allgemeine Auswertungen der Membranen .....	37
4.3.	Geschlechtsspezifische Unterschiede sezernierter und intrazellulärer Zytokine und .....	39

Chemokine in HUVEC.....	39
4.3.1. Geschlechtsspezifische Unterschiede sezernierter Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC .....	39
4.3.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede intrazellulärer Zytokine und Chemokine in unbehandelten HUVEC .....	43
4.3.3. Vergleich sezernierter Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen VEGF-behandelter männlicher und weiblicher HUVEC .....	46
4.4. Zusammenfassung aller Zytokin- und Chemokin-Auswertungen.....	51
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
5.1. Die biologische Rolle von intra- und extrazellulären Zytokinen .....	54
5.2. Zelluläre Funktionen detektierter intrazellulärer und sezernierter Zytokine .....	55
I. Detektierte intrazelluläre Zytokine.....	55
II. Detektierte sezernierte Zytokine .....	55
5.2.1. Makrophage Migration Inhibitory Factor (MIF).....	56
5.2.2. Interleukin- 6 (IL-6).....	58
5.2.3. Interleukin-8 (IL-8) .....	60
5.2.4. Midkine .....	62
5.2.5. Growth Regulated Alpha-Protein (GRO- $\alpha$ ).....	64
5.2.6. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1).....	66
5.2.7. Serpin E1 .....	68
5.2.8. CXC Chemokine Ligand 16 (CXCL16) .....	69
5.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Zytokinsekretion im Blut.....	70
5.4. HUVEC als Zellkulturmodell zur Untersuchung von geschlechtsspezifischen Unterschieden.....	71
5.4.1. Vorteile von HUVEC bei der Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede .....	71
5.4.2. Unterschiede von männlichen und weiblichen Endothelzellen bei der Migration.....	72
5.4.3. Geschlechtsunterschiede in der zellulären Reaktion auf Stress und Regulation.....	73
der Apoptose bei HUVEC .....	73
5.4.4. Intrinsische Geschlechtsunterschiede von Zytokinen bei HUVEC .....	73
5.4.5. Notwendigkeit der Berücksichtigung des Geschlechts bei Experimenten mit Zellen .....	74
5.5. Limitationen der Arbeit .....	76
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
Eidesstattliche Versicherung.....	88
Lebenslauf.....	90
Publikationsliste.....	92
Danksagung.....	93

## I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACS	Acute Coronary Syndrome
AP-1	Aktivator-Protein 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CD4+	Cluster of Differentiation 4
CRP	C-Reaktives Protein
CXCL16	C-X-C Motif Chemokine Ligand 16
C5/C5a	Complement Component 5a
DAPI	Diaminophenylindol
DNA/DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylen Diamin Tetraacetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FCS	Fetal Calf Serum
GRO- $\alpha$	Growth Regulated Alpha-Protein
HAEC	Human Aortic Endothelial Cells
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCC-1	Hemofiltrate C-C Ligand Chemokin
HCVEC	Humane Cerebral Vascular Endothelial Cell
HEPES	Hydroxy Ethyl Piperazin Ethansulfon Säure
HRP	Horseradish Peroxidase
HRT	Hormone Replacement Therapie
HUAEC	Human Umbilical Artery Endothelial Cell
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN- $\alpha$	Interferon-alpha
IFN- $\beta$	Interferon-beta
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IFN- $\lambda$	Interferon-lambda
IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 alpha
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin.13
JAB-1	Jun-Aktivation-Domain Binding Protein-1
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein
LTA	Lipoteichonsäure

M	Molar
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIF	Makrophage Migration Inhibitory Factor
mM	Millimolar
MS	Multiple Sklerose
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOS 3	Nitric Oxide Synthase (endothelial)
NSTEMI	Non-ST Elevation Myocardial Infarction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
pg	Pikogramm
pY-STAT3	Phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transcription
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Revolutions per Minute
SFM	Serum Free Medium
sICAM-1	Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
STEMI	ST Elevation Myocardial Infarction
TBS	Tris Buffered Saline
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule- 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Von-Willebrand-Faktor

## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### EINLEITUNG

Abbildung 1: Ursachen für geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen Männern und Frauen bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	4
Abbildung 2: Häufigkeit autoimmuner und kardiovaskulärer Erkrankungen bei Frauen mit dem Lebensalter .....	8

### MATERIALIEN UND METHODEN

Abbildung 3: Prinzip der Immunfluoreszenz und Zellkernfärbung von HUVEC .....	21
Abbildung 4: Skizze der 1 $\mu$ -Slide IO.4 Luer ibiTreat-Microscopy Chamber, Ibi.....	24
Abbildung 5: Versuchsprinzip des Zytokin- und Chemokinarrays.....	24
Abbildung 6: Zuordnung der Zytokine im Humanen Cytokine Array.....	25
Abbildung 7: Zuordnung der Chemokine im Humanen Chemokine Array.....	26
Abbildung 8: Prinzip des Versuchsaufbaus des Zytokin- und Chemokinarrays für Zellkulturüberstände unbehandelter HUVEC .....	27
Abbildung 9: Prinzip des Versuchsaufbaus des Zytokin- und Chemokinarrays für Zellkulturüberstände VEGF-behandelter HUVEC .....	27
Abbildung 10: Prinzip des Versuchsaufbaus des Zytokin- und Chemokinarrays für Zelllysate unbehandelter HUVEC .....	29

### ERGEBNISSE

Abbildung 11: HUVEC-Färbung mit Von-Willebrand-Faktor.....	31
Abbildung 12: Zellkernfärbung mit DAPI.....	32
Abbildung 13: Übereinandergelegte Darstellung der vWF-Färbung und der DAPI-Zellkernfärbung.....	33
Abbildung 14: Originalaufnahmen von Membranen des Zytokin- und Chemokinarrays.....	34
Abbildung 15: Invertierte Aufnahme der Originalaufnahmen der Membranen des Zytokin- und Chemokinarrays .....	35
Abbildung 16: Membranskizze und Schablone des Chemokinarrays.....	36
Abbildung 17: Skizze der Membran mit Schablone des Zytokinarrays.....	37
Abbildung 18: Sezernierte Zytokine unbehandelter HUVEC.....	39
Abbildung 19: Sezernierte Chemokine unbehandelter HUVEC.....	41
Abbildung 20: Detektierte Zytokine in Zelllysaten unbehandelter HUVEC.....	43
Abbildung 21: Detektierte Chemokine in Zelllysaten unbehandelter HUVEC .....	45
Abbildung 22: Sezernierte Zytokine nach Behandlung mit VEGF.....	47
Abbildung 23: Sezernierte Chemokine nach Behandlung mit VEGF .....	49

### III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Komponenten des Zytokinarrays .....	17
Tabelle 2: Komponenten des Chemokinarrays .....	18
Tabelle 3: Vergleich der Intensitäten sezernierter Zytokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC .....	40
Tabelle 4: Vergleich der Intensitäten sezernierter Chemokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC .....	42
Tabelle 5: Vergleich der Intensitäten intrazellulärer Zytokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC .....	44
Tabelle 6: Vergleich der Intensitäten intrazellulärer Chemokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC .....	46
Tabelle 7: Vergleich der Intensitäten sezernierter Zytokine zwischen männlichen und weiblichen HUVEC nach VEGF-Behandlung .....	48
Tabelle 8: Vergleich der Intensitäten sezernierter Chemokine zwischen männlichen und weiblichen HUVEC nach VEGF-Behandlung .....	50
Tabelle 9: Detaillierte Zusammenfassung der Zytokin- und Chemokin-Analysen.....	52

## IV. ZUSAMMENFASSUNG

Hormone stellen eine wichtige Ursache für geschlechtsspezifische Unterschiede bei Herz-Kreislaufkrankungen und Erkrankungen des Immunsystems dar. Daneben werden aber auch zunehmend intrinsische geschlechtsspezifische Unterschiede auf zellulärer Ebene diskutiert. So wurde gezeigt, dass weibliche Zellen eine stärkere Expression immunrelevanter Gene aufweisen als männliche. Frauen besitzen gegenüber Männern ein aktiveres Immunsystem, was auch dazu führt, dass Frauen häufiger von Erkrankungen des Immunsystems betroffen sind. Zytokine und Chemokine vermitteln zahlreiche Prozesse immunbedingter und entzündlicher Erkrankungen. Daher sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in intrazellulären und sezernierten Zytokinen und Chemokinen bei Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) gibt. Durch die Verwendung von HUVEC-Zellen können weitgehend hormonunabhängige geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht werden. Mittels Zytokin- und Chemokinarrays konnten in dieser Arbeit geschlechtsspezifische Unterschiede nachgewiesen werden. Weibliche HUVEC sezernieren im Vergleich zu männlichen Zellen weniger Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen. So wurden höhere Konzentrationen von IL-8 und MCP-1 in Zellkulturüberständen männlicher unbehandelter Zellen gemessen. Auch nach VEGF-Behandlung wurden höhere Konzentrationen von IL-8, MCP-1, Midkine, CXCL 16, IL-6 und C5/C5a in Zellkulturüberständen männlicher HUVEC nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden intrazellulär mehr Zytokine und Chemokine (IL-8, GRO- $\alpha$ , Midkine, MIF, Serpin E1, IL-6, sICAM-1 und IL-1ra) in weiblichen unbehandelten HUVEC detektiert. Damit scheint es geschlechtsspezifische Unterschiede vor allem im Verhältnis sezernierter zu intrazellulären Zytokinen und Chemokinen zu geben. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass Zellen intrinsische geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen und unterstreichen die Notwendigkeit das Geschlecht der Zellen zu berücksichtigen.



## V. ABSTRACT

Hormones represent an important cause for sex-specific differences in cardiovascular and of diseases of the immune system. In addition, intrinsic sex differences at the cellular level are increasingly being discussed. It has been shown that female cells have a stronger expression of immune-related genes than male cells. Women possess a more active immune system compared to men, which manifests itself in the fact that women are more frequently affected by diseases of the immune system. Cytokines and chemokines mediate numerous processes of immune-related and inflammatory diseases. Therefore, this work aimed to investigate whether there are sex-specific differences in intracellular and secreted cytokines and chemokines in human umbilical cord endothelial cells (HUVEC). By using HUVEC cells as an established model in basic research, largely hormone-independent sex differences can be investigated. Cytokine and chemokine arrays have been used in this work to detect sex-specific differences. Female HUVEC secrete fewer cytokines and chemokines in cell culture supernatants compared with male cells. Thus, higher levels of IL-8 and MCP-1 were measured in cell culture supernatants of untreated male cells. Higher concentrations of IL-8, MCP-1, midkine, CXCL 16, IL-6, and C5/C5a were also detected in cell culture supernatants of male HUVEC after VEGF treatment. In contrast, more cytokines and chemokines (IL-8, GRO- $\alpha$ , midkine, MIF, serpin E1, IL-6, sICAM-1, and IL-1ra) were detected intracellularly in untreated female HUVEC. Thus, it has been shown that sex-specific differences exist in the ratio of secreted to intracellular cytokines and chemokines. The present results highlight that cells exhibit intrinsic sex differences and emphasize the need to consider the sex of the cells in basic research.

# **1. EINLEITUNG**

## **1.1. Geschlechtsspezifische Unterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache bei Männern und Frauen weltweit (Benjamin et al. 2018). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO, World Health Organization) sterben jährlich über 17,7 Millionen Menschen an den Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen, mit steigender Tendenz. Es wird geschätzt, dass die Zahl im Jahr 2030 auf 22,2 Millionen Todesfälle ansteigt. Zirka 30 % aller Betroffenen sind unter 70 Jahre. Zu den häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen zählen ischämische Herzerkrankungen wie der Herzinfarkt (Dunlay und Roger 2012; Madonna et al. 2019). Neben dem Myokardinfarkt zählen dazu auch der Schlaganfall und die periphere Gefäßerkrankung als Folge der Arteriosklerose, die eine der Hauptursachen für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt (Ramji und Davies 2015). Die Arteriosklerose wird definiert als eine chronisch inflammatorische Erkrankung der großen und mittleren Arterien (Moroni et al. 2019).

Es existieren viele geschlechtsspezifische Unterschiede in der Prävalenz und Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen (Kander et al. 2017). Des Weiteren sind sowohl Unterschiede in der Diagnostik als auch in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zwischen Männern und Frauen beschrieben (Taqueti 2018; Wada et al. 2019). Frauen mit einem Herzinfarkt sind beispielsweise im Schnitt 10 Jahre älter als Männer (Kander et al. 2017). Zwar wurde gezeigt, dass bei prämenopausalen Frauen die Wahrscheinlichkeit eines Herzinfarktes geringer ist, die Anzahl an Komorbiditäten und die damit einhergehende erhöhte Mortalität infolge eines Herzinfarktes ist hingegen höher als bei Männern (Kander et al. 2017). Die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen beträgt laut der American Heart Association (AHA) von 2019 im Alter von 60 und 79 Jahren 77,2 % bei Männern und 78,2 % bei Frauen, und bei über 80 Jahren 89 % bei Männern und 91,8 % bei Frauen (Rodgers et al. 2019). Die Inzidenz

von Herzinsuffizienz und Hypertonie ist bei Frauen geringer als bei Männern (Kander et al. 2017). Auch die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen ist bei Frauen höher als bei Männern (Appelman et al. 2015). Daten der National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) zeigten, dass die Prävalenz für einen Herzinfarkt bei Frauen zwischen 35 und 54 Jahren innerhalb der vergangenen 20 Jahre gestiegen ist, wohingegen sie für gleichaltrige Männer sank (Maas und Appelman 2010).

Zu den anerkannten Hauptrisikofaktoren für Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems gehören die arterielle Hypertonie, Rauchen, Übergewicht und Adipositas, sowie erhöhte Cholesterinwerte und Hyperlipidämie (Appelman et al. 2015). Zu diesen Risikofaktoren werden auch das Alter, eine positive Familienanamnese für Arteriosklerose, sowie Diabetes mellitus gezählt (Taqueti 2018; Madonna et al. 2019). Während für die Risikofaktoren Hypertension, Hyperlipidämie und Übergewicht vergleichbare kardiovaskuläre Auswirkungen für beide Geschlechter beschrieben sind, gilt das Rauchen als gefährlicherer Risikofaktor bei Frauen (Appelman et al. 2015; Taqueti 2018). Auch Diabetes hat beim weiblichen Geschlecht schlechtere Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System (Appelman et al. 2015).

Daneben sind Unterschiede in der Symptomatik infolge eines akuten Koronarsyndroms (ACS) beschrieben. ACS ist die klinische Symptombezeichnung der instabilen Angina pectoris, Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI) und ST-Hebungsinfarkt (STEMI) (Hedayati et al. 2018) und betrifft in den meisten Fällen Patienten über 60 Jahre (Bugiardini et al. 2019). Das Leitsymptom für den Myokardinfarkt ist die Angina pectoris, der retrosternale Brustschmerz, der sich bei Belastung verstärkt und bei Ruhe oder mittels Nitroglycerintherapie bessert (Sanghavi und Gulati 2015). Im Falle eines Myokardinfarktes zeigen Frauen klinisch seltener typischen Brustschmerz, sondern eher atypische Symptome (Canto et al. 2012), wie Kiefer-/Schulter-/Armschmerzen, Übelkeit, Müdigkeit, Schwäche, Kurzatmigkeit und Verdauungsbeschwerden (Kawamoto et al. 2016).

Es bestehen auch pathophysiologische Unterschiede in der Arteriosklerose zwischen Männern und Frauen. So leiden Frauen häufiger an den nicht-obstruktiven arteriosklerotischen Herzerkrankungen, unter die Koronarspasmus, endotheliale und mikrovaskuläre Dysfunktion, sowie Inflammation subsummiert werden. Männer hingegen leiden häufiger an der obstruktiven Arteriosklerose, bei der die Koronararterien durch arteriosklerotische Plaques stenosieren und so den Blutfluss limitieren (Schmidt et al. 2018).

Auch hinsichtlich Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen sind zahlreiche geschlechtsspezifische Unterschiede bekannt. Sowohl orale Therapien mit Thrombozytenaggregationshemmern, Betablockern und Lipidsenkern, als auch invasive koronare Interventionen erhalten Frauen im Alter von 35-54 Jahren wesentlich seltener als gleichaltrige Männer (Arora et al. 2018).

Im Outcome haben Frauen im Gegensatz zu Männern ein erhöhtes Risiko einer 30-Tage-Mortalität infolge eines STEMI, sogar während einer perkutanen koronaren Intervention (PCI), einer invasiven Katheter-Behandlung im Falle eines stattgehabten STEMI ohne vorherige medikamentöse Fibrinolyse (Jahic 2017; Bugiardini et al. 2019). Diese erhöhte Mortalitätsrate ist nur bei jüngeren Frauen signifikant erhöht (Bugiardini et al. 2019). Generell ist die Rate perioperativer Komplikationen einer perkutanen koronaren Intervention bei Frauen höher als bei Männern und Frauen werden weniger leitliniengerecht behandelt (Kawamoto et al. 2016).

## 1.2. Diskutierte Ursachen für geschlechtsspezifische Unterschiede

Unterschiede zwischen Männern und Frauen bei kardiovaskulären Erkrankungen können in beeinflussbare und unbeeinflussbare Faktoren differenziert werden (Abbildung 1).

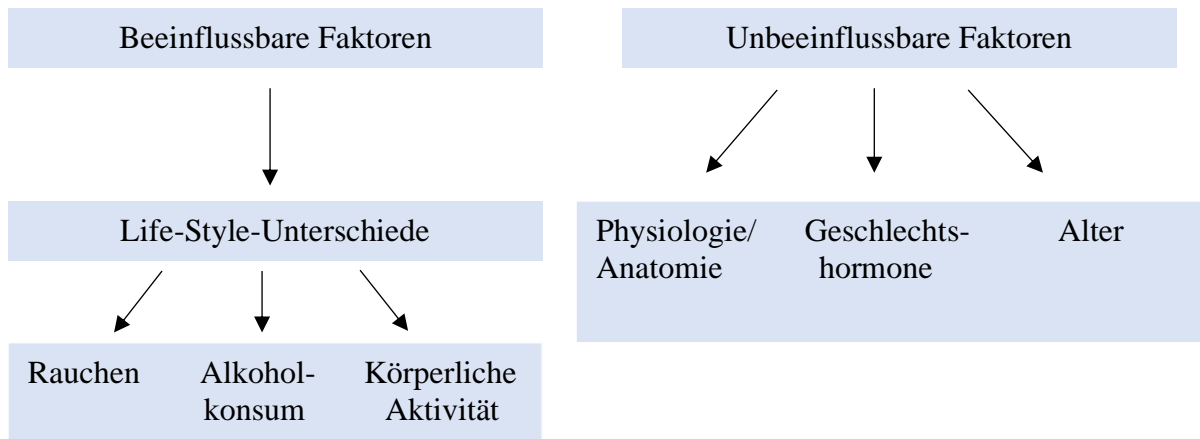


Abbildung 1: Ursachen für geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen Männern und Frauen bei kardiovaskulären Erkrankungen

Rauchen gilt als einer der Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Miura et al. 2019). Das Risiko an einer koronaren Herzerkrankung zu sterben ist bei Rauchern 2-3 Mal höher, als bei Patienten die nie geraucht haben (Carter et al. 2015). Im Gegensatz zu Männern rauchen Frauen zwar weniger (Chinwong et al. 2018), jedoch hat der Zigarettenkonsum bei Frauen schlechtere Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System als bei Männern (Taqueti 2018). Ein beeinflussbarer Faktor, der sich positiv auf das Herz-Kreislaufsystem auswirkt, ist regelmäßige körperliche Aktivität. Sie wird von Frauen weniger ausgeübt als von Männern (Edwards und Sackett 2016). Auch der Alkoholkonsum, der bei Männern höher als bei Frauen ist (Polsky und Akturk 2017), steht in engem Verhältnis zur koronaren Herzerkrankung und arterieller Hypertension (Li et al. 2016).

Zu den unbeeinflussbaren Faktoren gehören unter anderem physiologische und anatomische Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Hierzu zählen die kleineren Organgrößen der Nieren mit geringerer glomerulären Filtrationsrate und die dadurch reduzierte

Clearance und erhöhte Toxizität einiger Medikamente bei Frauen (Abdel-Rahman 2017). Außerdem besitzen Frauen kleinere Koronararterien als Männer, wodurch eine erhöhte koronare Blutflussgeschwindigkeit bei Frauen angenommen wird. Die damit einhergehenden freigesetzten Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen begünstigen die Entwicklung für nicht-obstruktive koronare Herzerkrankungen bei Frauen, auch Syndrom X genannt (Anastasiadis et al. 2016; Taqueti 2018). Männer hingegen leiden häufiger an obstruktiven kardiovaskulären Herzerkrankungen (Schmidt et al. 2018). Daneben haben Frauen einen erhöhten Fettgewebsanteil, was in unterschiedlichen Verstoffwechslungsprozessen von Medikamenten resultiert (Valencak et al. 2017). Dies erklärt die Unterschiede im Ansprechen der Behandlung und im Outcome kardiovaskulärer Erkrankungen.

Ein besonderes Augenmerk zur Erklärung geschlechtsspezifischer Unterschiede bei kardiovaskulären Erkrankungen wird auf die Geschlechtshormone gelegt (Abdel-Rahman 2017; Kander et al. 2017; Rosano et al. 2017). Da das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Frauen nach der Menopause steigt, geht man von einer protektiven Rolle des Östrogens aus (Kander et al. 2017). Zhao et al. beschreiben ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei postmenopausalen Frauen mit geringen Östrogenkonzentrationen (Di Zhao et al. 2018). Während die Wirkung des endogenen Östrogens als kardioprotektiv gilt, sind die Auswirkungen der Zufuhr exogenen Östrogens durch eine Hormonersatztherapie (HRT) auf das Herz-Kreislaufsystem weniger eindeutig und noch nicht vollständig geklärt. Seit mehreren Jahren wird über die Hormonersatztherapie diskutiert. Zunächst zeigten Beobachtungen zur Hormonersatztherapie viele kardiovaskuläre Vorteile und eine Reduktion der Sterberate. Eine etablierte randomisierte Studie, die Women's Health Initiative (WHI), die Frauen viele Jahre nach Beginn der Menopause untersuchte, zeigte keine Vorteile. Die WHI beobachtete ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Mammakarzinom und die Ausbildung koronarer Herzerkrankungen (KHK), wodurch der Einsatz der Hormonersatztherapie deutlich zurückgegangen ist. Neuere Metaanalysen der WHI-Daten mit Altersstratifikation zeigten dann

eine Reduktion der Ausbildung von KHK und eine geringere Mortalität, wenn die HRT mit geringem zeitlichen Abstand nach Beginn der Menopause begonnen wird. So werden postmenopausale Symptome (Hitzewallungen, Osteoporose, etc.) reduziert und damit die Lebensqualität verbessert. Bei Frauen im Alter von 50-60 Jahren wird der Nutzen einer Hormonersatztherapie als positiv beschrieben und könnte neben gesunder Ernährung und regelmäßiger körperlicher Aktivität als Primärprävention der KHK gelten (Lobo 2017). Auch Rosano et al. beschreiben kardioprotektive Wirkungen des Östrogens im Rahmen der Hormonersatztherapie wenn sie unmittelbar nach Einsetzen der ersten Symptome eingeleitet wird (Rosano et al. 2017). Andere Autoren sahen hingegen nur geringe kardiovaskuläre Vorteile und beschrieben hohe Schlaganfall- und Thromboserisiken (Boardman et al. 2015; Iorga et al. 2017). Einigkeit über ein festes Therapieregime der Hormonersatztherapie gibt es derzeit noch nicht und muss immer individuell unter Abwägung anderer Nebenerkrankungen entschieden werden (Lobo 2017).

Das männliche Geschlechtshormon Testosteron, was in geringerer Konzentration auch bei Frauen vorliegt, besitzt ebenfalls kardiovaskuläre Wirkungen (Webb und Collins 2017). Es wurde festgestellt, dass niedrige Testosteronkonzentrationen im Blut in engem Zusammenhang mit vorzeitiger koronarer Herzerkrankung und erhöhter kardiovaskulärer Mortalität stehen (Webb und Collins 2017). Ob eine Hormontherapie mit Testosteron bei Männern mit Hypogonadismus positive kardiovaskuläre Effekte zeigt, ist jedoch ebenfalls unklar. Einerseits beschrieben Finkle et al. ein erhöhtes Risiko für einen Herzinfarkt bei Männern mit vorbestehender Herzerkrankung nach Einnahme exogenen Testosterons (Finkle et al. 2014). Andererseits wurde wenige Jahre später ein reduziertes Risiko für Herzinfarkt, Schlaganfall, instabile Angina pectoris, plötzlichen Herztod, sowie eine reduzierte kardiovaskuläre Mortalität bei männlichen Patienten, die sich einer Testosteron-Ersatztherapie unterzogen, beschrieben (Wallis et al. 2016; Cheetham et al. 2017).

Die Grundlagenforschung der letzten Jahre hat sich zunehmend auf hormonunabhängige Ursachen für Geschlechtsunterschiede konzentriert. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen selbst geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen (Straface et al. 2012; Ventura-Clapier et al. 2017). Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) werden in der Grundlagenforschung häufig verwendet um Fragen im Zusammenhang mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu untersuchen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass weibliche HUVEC eine höhere Zellviabilität nach Serumentzug aufweisen als männliche Zellen (Lorenz et al. 2015). Außerdem beobachtete die Arbeitsgruppe Unterschiede in der VEGF-induzierten Migration zwischen männlichen und weiblichen HUVEC. Dabei wiesen weibliche Zellen eine höhere VEGF-induzierte Migrationsaktivität auf als männliche HUVEC (Lorenz et al. 2019). Aufgrund der beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede auf zellulärer Ebene wird die Notwendigkeit der Berücksichtigung des Geschlechts in der Grundlagenforschung unterstrichen.

### **1.3. Ursachen für Unterschiede zwischen Männern und Frauen bei Erkrankungen des Immunsystems**

Es wurden auch bei vielen Erkrankungen des Immunsystems geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben. So ist die Prävalenz für Autoimmunerkrankungen bei Frauen deutlich höher als bei Männern (Ngo et al. 2014). Konkret betreffen zum Beispiel chronisch inflammatorische Autoimmunerkrankungen wie der systemische Lupus erythematodes (SLE), die multiple Sklerose (MS) und die rheumatoide Arthritis (RA) in erster Linie Frauen (Pace et al. 2017; Christou et al. 2019). Daneben sind Frauen auch häufiger von den Autoimmunerkrankungen der Leber, wie der primären biliären Cholangitis (PBC) und der Autoimmunhepatitis (AIH), betroffen (Schwinge und Schramm 2019).

Generell sind die Gründe für Geschlechtsunterschiede bei immunologischen Erkrankungen nicht eindeutig geklärt. Genetische Faktoren und Umweltfaktoren tragen dazu



zwar bei, jedoch werden hauptsächlich die Geschlechtshormone für die Geschlechtsunterschiede verantwortlich gemacht (Ngo et al. 2014; Gubbels Bupp 2015; Ortona et al. 2016). Ortona et al. sehen Östrogen als einen Stimulator für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, wohingegen für Testosteron eine protektive Rolle beschrieben wird (Ortona et al. 2016). So wurde bei postmenopausalen Frauen im Vergleich zu gleichaltrigen Männern eine sinkende Inzidenz für Autoimmunerkrankungen festgestellt (Gubbels Bupp 2015). Nicht nur Veränderungen des Östrogenspiegels durch die Menopause führen zur Reduktion von Autoimmunerkrankungen, sondern auch indirekte Faktoren können durch eine Senkung des Östrogenspiegels im Blut eine Reduktion von Autoimmunerkrankungen bewirken. Zu diesen Faktoren gehören mentaler und psychischer Stress, aber auch Stress in Form von hormonellen Fluktuationen wie prämenopausaler und schwangerschafts-induzierter Stress (Assad et al. 2017).

Die hormonellen Auswirkungen auf Erkrankungen des Immunsystems und des kardiovaskulären Systems verhalten sich gegensätzlich. Östrogen wirkt bei Frauen während der fruchtbaren Jahre kardioprotektiv, wohingegen hohe Östrogenspiegel Autoimmunerkrankungen fördern. Dabei steigt die Inzidenz chronisch inflammatorischer Erkrankungen wie der Arteriosklerose bei Frauen nach der Menopause auf annähernd identischem Niveau gleichaltriger Männer an, wohingegen die Inzidenz für Autoimmunerkrankungen bei postmenopausalen Frauen im Vergleich zu gleichaltrigen Männern sinkt (Abbildung 2) (Gubbels Bupp 2015).

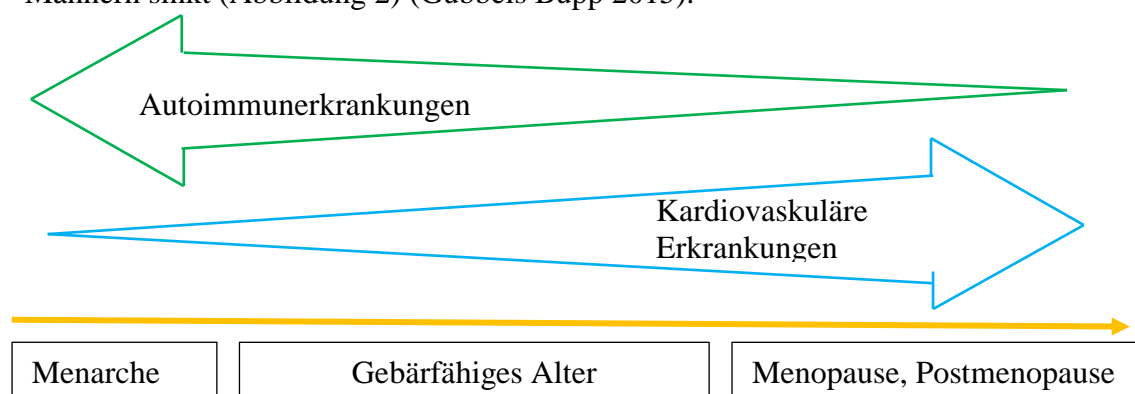


Abbildung 2: Häufigkeit autoimmuner und kardiovaskulärer Erkrankungen bei Frauen mit dem Lebensalter

In der Zeit hoher Östrogenspiegel (gebärfähiges Alter) sind Autoimmunerkrankungen häufiger, während Frauen in der Postmenopause häufiger an kardiovaskulären Erkrankungen leiden.

Inwieweit Östrogen die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen fördert und gleichzeitig zur Protektion kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Khan und Ansar 2015; Iorga et al. 2017).

#### **1.4. Die Rolle von Zytokinen und Chemokinen bei inflammatorischen Prozessen im kardiovaskulären System**

Die Inflammation trägt zur Entstehung und Progression der Arteriosklerose maßgeblich bei und steht somit in engem Zusammenhang mit der Pathogenese und Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen (Fatkhullina et al. 2016; Jiang et al. 2019; Yang et al. 2019). Die im Erkrankungsprozess der Arteriosklerose involvierten Zellen werden einerseits durch Zytokine aktiviert (Fatkhullina et al. 2016), und andererseits exprimieren alle bei der Arteriosklerose beteiligten Zellen Zytokine (Tousoulis et al. 2016). Man unterscheidet zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen, die das Voranschreiten der Arteriosklerose begünstigen, sowie anti-inflammatorischen Zytokinen, die die Krankheitsentwicklung hemmen (Fatkhullina et al. 2016). Zytokine werden in mehrere Untergruppen unterteilt: Chemokine, Interleukine, Tumornekrosefaktor und Interferone (Palomino und Marti 2015; L. Ferreira et al. 2019).

Chemokine haben ein geringes Molekulargewicht zwischen 7 und 15 kDa (Palomino und Marti 2015). Chemokine, auch chemotaktische Zytokine genannt, und ihre Rezeptoren beeinflussen die Migration und die Immobilisation von Immunzellen (Griffith et al. 2014; Palomino und Marti 2015; Sokol und Luster 2015). Dabei haben sie zahlreiche Funktionen an verschiedenen Stellen des Immunsystems, in der Organ- und Embryonalentwicklung, Angiogenese, Tumorgenese und bei Infektionen (Raman et al. 2011). Unter den bislang bekannten Chemokinen wurden einige Chemokine identifiziert, die bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen. Beispielsweise wurde diskutiert ob Chemokine als Biomarker für die Risikoeinschätzung kardiovaskulärer Erkrankungen dienen könnte. In mehreren Studien wurde eine mögliche Verwendung von CCL5-Spiegeln als Biomarker im Blut für

kardiovaskuläre Erkrankungen angedeutet (Blanchet et al. 2014). Jedoch stellte eine Fall-Kohorten-Studie den Nutzen von CCL5-Spiegeln als Biomarker für das kardiovaskuläre Risiko in Frage (Herder et al. 2011). Es gibt Hinweise dafür, dass Chemokine als therapeutischer Angriffspunkt zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen verwendet werden könnten. Die CANTOS-Studie zeigte, dass eine Blockade des pro-inflammatorischen Chemokins IL-1 $\beta$  bei Patienten mit vorangegangenem Myokardinfarkt systemische Entzündungen reduzierte und die Wahrscheinlichkeit für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse und Herztod sank (Noels et al. 2019). Das Ziel dieser Behandlungen ist das Risiko der endothelialen Dysfunktion zu senken (Steyers und Miller 2014). Bei der endothelialen und mikrovaskulären Dysfunktion spielen Zytokine eine Rolle (Dal Lin et al. 2015). Endothelzellen sind neben anderen Zellarten einer der Hauptproduzenten von Zytokinen, die die inflammatorischen Prozesse in den Gefäßen durch pleiotrope Eigenschaften aktivieren oder limitieren (Fatkhullina et al. 2016).

Im Wesentlichen unterscheidet man 2 Chemokinarten. Abhängig von der Position ihrer Zysteinreste unterteilt man in CXC-Chemokine und CC-Chemokine. Dabei bewirken CXC-Chemokine eine Chemotaxis bei neutrophilen Granulozyten und CC-Chemokine bei Monozyten und Lymphozyten (Palomino und Marti 2015). Beispielsweise hat das CXC-Chemokin GRO- $\alpha$  (Growth Regulated Oncogene-alpha) und dessen Rezeptor CXCR2 diverse Funktionen bei Autoimmunerkrankungen, sowie im kardiovaskulären System bei der Angiogenese und bei inflammatorischen Prozessen der Arteriosklerose (Bechara et al. 2007; Sisto und Lisi 2015; Ray 2016). Aufgrund pro-inflammatorischer Eigenschaften (Begünstigung einer endothelialen Dysfunktion durch oxidativen Stress und Downregulation von eNOS) trägt GRO- $\alpha$  zur Entwicklung koronarer Herzerkrankungen bei (Ray 2016).

Oxidativer Stress bewirkt eine erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) (Kattoor et al. 2017). Durch ROS erhöht sich die Expression inflammatorischer Faktoren und andererseits führt es zur Verminderung der eNOS-Aktivität, wodurch es die Arteriosklerose begünstigt (Yuan et al. 2019). Das Enzym eNOS (endotheliale

Stickstoffmonoxid-Synthase) hat eine zentrale Rolle in der Endothelfunktion und im Gefäßtonus (Biwer et al. 2016; Siragusa und Fleming 2016). Wird das Enzym durch ROS entkoppelt, so entsteht Superoxid, was durch Schädigung des Endothels die Entwicklung der Arteriosklerose beschleunigt (Pascali et al. 2014; Li et al. 2015). Dabei kommt es zur Expression von Adhäsionsmolekülen, die die Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten bewirken (Baker et al. 2018). Vor allem das Adhäsionsmolekül VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) auf den Zellen des Gefäßendothels spielt bei der Progression der Arteriosklerose eine bedeutende Rolle (Sun et al. 2017). Rekrutierte Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen und werden zu Schaumzellen, was die Initiation und Progression der arteriosklerotischen Plaques begünstigt (Baker et al. 2018). Das Chemokin MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) ist dabei für die Regulation der Migration von Monozyten und Makrophagen verantwortlich (Ismail et al. 2016). Die Expression des pro-inflammatorischen Chemokins MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) erfolgt bei der Arteriosklerose vorwiegend von Makrophagen und Endothelzellen und bewirkt ebenfalls die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen (Sinitski et al. 2019).

Interleukine als zweite Untergruppe der Zytokine spielen bei inflammatorischen Prozessen der Arteriosklerose ebenso eine wichtige Rolle. Einige Interleukine zeigen pro-atherogene Effekte (Regulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Aktivierung von Makrophagen und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen). Andere dagegen bewirken anti-atherogene Effekte (Thüsen et al. 2003). Interleukin-10 (IL-10) zählt zu den wichtigsten Zytokinen mit anti-inflammatorischer Wirkung. Es wird von aktivierten Immunzellen, vor allem von Monozyten, Makrophagen und T-Zellen produziert, und setzt die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren herab, um eine überschießende Immunreaktion und die dadurch entstehenden Gewebeschäden einzudämmen (Sabat et al. 2010). Im Zusammenhang mit den pro-inflammatorischen Eigenschaften der Interleukine sind Interleukin-8 (IL-8) und Interleukin-6 (IL-6) hervorzuheben. Beispielsweise wird IL-6 durch Infektionen, chronische

Inflammationen, Übergewicht und auch physiologischen Stress stimuliert und hält somit im Rahmen der Arteriosklerose die inflammatorischen Prozesse aufrecht (Hartman und Frishman 2014). Zusammen mit anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie CRP (C-reaktives Protein) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) wird IL-6 als unabhängiger Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen gezählt (Kosmas et al. 2019).

Der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha bewirkt als pro-inflammatorisches Zytokin zum einen die Expression von VCAM-1 (Lin et al. 2015) und zum anderen führt es mit weiteren pro-inflammatorischen Mediatoren wie ROS und oxidiertem LDL (Low Density Lipoprotein) zur Aktivierung von Endothelzellen mit daraus resultierender erhöhter Leukozytenadhäsion und zunehmender Thrombosierung (Steyers und Miller 2014). TNF- $\alpha$  ist besonders bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, SLE, Psoriasis und chronisch entzündliche Darmerkrankungen erhöht. Da Patienten mit solchen Erkrankungen erhöhtes kardiovaskuläres Risiko haben, sind zielgerichtete Therapien gegen TNF- $\alpha$ -induzierte Entzündungen von besonderem Interesse. Die TNF- $\alpha$ -Inhibitoren Etanercept und Infliximab werden beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis eingesetzt und der monoklonale TNF- $\alpha$ -Antikörper Adalimumab bei Psoriasis. Das Ziel dieser Behandlungen ist das Risiko der endothelialen Dysfunktion bei solchen Patienten zu senken, wodurch auch das kardiovaskuläre System profitiert (Steyers und Miller 2014).

Eine weitere Untergruppe der Zytokine sind Interferone. Dabei handelt es sich um Glykoproteine die, abhängig von ihren Rezeptorstrukturen auf den Zelloberflächen, in 3 Gruppen klassifiziert werden können: Typ I (Synonym: IFN- $\alpha/\beta$ ), Typ II (Synonym: IFN- $\gamma$ ) und Typ III (Synonym: IFN- $\lambda$ ) (Rauch et al. 2013; Lin und Young 2014). Sie haben vielfältige Aufgaben im Immunsystem sowie bei der Inflammation (Rauch et al. 2013). Dabei wird IFN- $\gamma$  zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gezählt und gilt als klassischer Makrophagen-aktivierender Faktor. Wird IFN- $\gamma$  von T-Zellen freigesetzt, so bewirkt es in den Makrophagen

die weitere Ausschüttung von Chemokinen und von ROS und begünstigt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Voloshyna et al. 2014).

## **2. ZIEL DER ARBEIT**

Ziel der Arbeit war die Aufklärung geschlechtsspezifischer Unterschiede in intrazellulären und sezernierten Zytokinen und Chemokinen von humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC). HUVEC werden in der Forschung häufig verwendet, um zelluläre Prozesse der Gefäßfunktion zu untersuchen. Dies geschieht allerdings selten unter der Berücksichtigung des Geschlechts der Zellen. Da HUVEC unmittelbar nach der Schwangerschaft isoliert werden, können potentielle Einflüsse geschlechtsspezifischer Umweltfaktoren (Konzentrationen von Geschlechtshormonen, Lebensstil sowie unterschiedliche Risikofaktoren) auf zelluläre Prozesse weitgehend minimiert werden. Endothelzellen produzieren in hohem Umfang Zytokine und Chemokine und tragen dadurch zur Regulation inflammatorischer Prozesse bei. Dabei besitzen Zytokine und Chemokine sowohl intra- als auch extrazellulär wichtige regulatorische Funktionen. Pathogenetisch spielt die Inflammation bei Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sowie bei Erkrankungen des Immunsystems eine zentrale Rolle. Beide Erkrankungen sind durch geschlechtsspezifische Unterschiede gekennzeichnet. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es hormonunabhängige geschlechtsspezifische Unterschiede sowohl in intrazellulären wie auch in sezernierten Zytokinen und Chemokinen in HUVEC gibt. Damit sollte die Frage untersucht werden, ob es neben hormonellen auch intrinsische Geschlechtsunterschiede auf zellulärer Ebene gibt.

### 3. MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1. Verwendete Materialien und Chemikalien

##### Arbeitsgeräte

##### Hersteller

Brutschrank 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus Instruments
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Fusion Solo Chemilumineszenz	Vilber
Kühlschrank	LIEBHERR
Mikroskop	Leica
Schüttler	Heidolph DuoMax
Sterile Werkbank	Lamin Air
Zentrifuge	Heraeus Instruments
Photometer	Molecular Devices

##### Materialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Gerda-Schalen (50 ml)	Roth
Klemmen	Acufirm
Knopfkanüle	Acufirm
Kühlzentrifuge	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Poly-Optik
Objektträger, 1 $\mu$ -Slide I <sup>0.4</sup> Luer ibiTreat Microscopy Chamber	Ibidi
Petrischalen mit / ohne Deckel	Roth
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf
Spritzen 10 ml und 20 ml	BD Plastipak
T 75 – Zellkulturflaschen	Falcon
Urinbecher	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
2 ml Kryogefäß	Corning
6 cm-Zellkulturschalen	Falcon
50 ml Falcons	Falcon

##### Substanzen und Chemikalien

Complete-Inhibitor	Roche
Cryo-SFM	PromoCell
DAPI	Sigma Aldrich
DTT	Sigma Aldrich
EDTA	Sigma Aldrich
EGTA	Sigma Aldrich
HEPES	Merck



**Substanzen und Chemikalien****Hersteller**

Isopropanol	Merck
KCl	Merck
Kollagenase	BioChrom
MgCl <sub>2</sub>	Roth
NaCl	Roth
Natrium – Pyrophosphat	Sigma Aldrich
Natriumvanadat	Sigma Aldrich
Okadainsäure	Calbiochem
PBS	Thermo Fisher Scientific
Phosphatase-Inhibitor	Roche
PFA	Histofix
TBS	Thermo Fisher Scientific
TRIS	Roth
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific
VEGF	Merck

**Lösungen**

HBSS	Thermo Fisher Scientific
M199-Medium (Vollmedium)	
500 ml M199	Thermo Fisher Scientific
- 20 % FCS	BioChrom
- 12 µg/ml ECGS	PromoCell
- 5 U/ml Heparin	BioChrom
- 2 mM L-Glutamin	Invitrogen
- 5 µg/ml Ascorbinsäure	Sigma Aldrich
- 5 µg/ml Glutathion	Sigma Aldrich
- 100 U/ml Penicillin	BioChrom
- 100 µg/ml Streptomycin	BioChrom
- 100 µl Amphotericin B	BioChrom

**Antikörper**

Anti-von-Willebrand-Primärantikörper	Abcam
Alexa Flour 546 Goat anit-Rabbit-IgG-Sekundärantikörper	Thermo Fisher Scientific

**Hypotonischer Puffer (pH 7,5)**

Basisansatz	frisch zugeben
10 mM TRIS	1 mM DTT
1 mM EGTA	0,3 mM Natriumvanadat
1 mM EDTA	
10 mM KCl	
2 mM MgCl <sub>2</sub>	

## Lysepuffer

Basisansatz	frisch zugeben
100 mM NaCl	Phosphatase Inhibitor Cocktail PhosStop 25-fach
20 mM HEPES	Complete-Inhibitor 25-fach
1 % Triton X 100	Okadainsäure 100 µM
4 mM Natrium-Pyrophosphat	
10 mM EDTA	PhosStop und Complete als 25-fachen Bestand ansetzen: 1 Tablette in 400 µl destilliertem Wasser lösen

## Materialien des Human Cytokine Array Panel A, Proteome Profiler™ Array und Human Chemokine Array Kit, Proteome Profiler™ Array, R&D Systems

Tabelle 1: Komponenten des Zytokinarrays

Inhalt	Zytokinarray mit Bestell-Nr.	Anzahl
Nitrozellulosemembran	Human Cytokine Array Panel A, 893194	
Array Buffer (Blockierungslösung)	Array Buffer 4, 895022	1 (21 ml/Flasche)
Array Buffer (Blockierungslösung)	Array Buffer 5, 895876	Array Buffer 5:1 (21 ml/Flasche) Array Buffer 6:2 (21 ml/Flasche)
Waschpufferkonzentrat 25-fach konzentriert	895003	2 (21 ml/Flasche)
Detektor-Antikörper-Mischung	Detection Antibody Cocktail, Human Cytokine Array Panel A, 893195	1 (21 ml/Flasche)
Streptavidin-HRP	890803	1 Flasche
Entwickler 1/Chemi Reagent 1	894287	1 (2,5 ml/Flasche)
Entwickler 2/Chemi Reagent 2	894288	1 (2,5 ml/Flasche)
Multi Dish-Schale	607544	1 Schale

Tabelle 2: Komponenten des Chemokinarrays

Inhalt	Chemokinarray mit Bestell-Nr.	Anzahl
Nitrozellulosemembran	Human Chemokine Array, 894153	
Array Buffer (Blockierungslösung)	Array Buffer 4, 895022	1 (21 ml/Flasche)
Array Buffer (Blockierungslösung)	Array Buffer 6, 893573	Array Buffer 5:1 (21 ml/Flasche)  Array Buffer 6:2 (21 ml/Flasche)
Waschpufferkonzentrat 25-fach konzentriert	895003	2 (21 ml/Flasche)
Detektor-Antikörper- Mischung	Detection Antibody Cocktail, Human Chemokine Array, 894154	1 (21 ml/Flasche)
Streptavidin-HRP	890803	1 Flasche
Entwickler 1/Chemi Reagent 1	894287	1 (2,5 ml/Flasche)
Entwickler 2/Chemi Reagent 2	894288	1 (2,5 ml/Flasche)
Multi Dish-Schale	607544	1 Schale

### **3.2. HUVEC-Präparation aus Nabelschnüren**

Die Präparation von humanen Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC) erfolgte aus Nabelschnurvenen nach einer standardisierten Methode. Die Nabelschnüre wurden direkt nach der Entbindung trocken in einem Urinbecher im Kühlschrank bei 4-8 °C bis maximal 48 Stunden gelagert. Die Weiterverarbeitung der Nabelschnüre erfolgte bei Raumtemperatur unter einer sterilen, laminaren Werkbank. Die Nabelschnur wurde in eine Petrischale ohne Deckel überführt. Der Veneneingang wurde mit einer Knopfkanüle vorsichtig aufgesucht, ohne die Nabelschnur dabei zu verletzen oder zu manipulieren. Oberhalb der Knopfkanüle wurde die Nabelschnur abgeklemmt und anschließend mit 2 x 20 ml HBSS durchgespült. Es musste darauf geachtet werden, dass dabei keine Flüssigkeit seitlich aus der Nabelschnur herauslief. Schließlich wurde die Vene mit einer leeren Spritze vollständig entleert und das andere Ende der Nabelschnur wurde abgeklemmt. Danach wurde die Nabelschnur mit Knopfkanüle und Klemmen in eine zweite Petrischale überführt. Anschließend wurde die Nabelschnurvene mit 10 ml Kollagenase gefüllt. Die abgeklemmte Nabelschnur wurde anschließend für 15 Minuten in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der 15-minütigen Wartezeit wurde die Nabelschnurvene erneut mit 2 x 20 ml HBSS durchgespült, diese Flüssigkeit wurde gesammelt und in einem 50 ml-Falcon aufgefangen und 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml M199 mit 20 % FCS-Vollmedium resuspendiert. Letztlich wurden die Zellen auf zwei T 75 – Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3.3. Zellkultur**

#### **3.3.1. Kultivierung der Zellen**

Alle nachfolgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur durchgeführt. HUVEC sind Primärzellen und werden deshalb immer frisch aus

Nabelschnurvenen präpariert. Die in 3.2. beschriebene HUVEC-Präparation der Nabelschnur in der T 75-Zellkulturflasche befand sich im Brutschrank als Passage 0. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit Vollmedium M199 mit 20 % FCS durchgeführt, um in Suspension befindliche Blutzellen von adhärierenden Zellen zu trennen. Die Zellkulturen wurden bis zur Konfluenz im Brutschrank kultiviert. Bei HUVEC der Passage 0 beträgt dies durchschnittlich 7-14 Tage. Die Dauer bis zur Konfluenz der Zellen nach der Isolation ist jedoch spender- und zellabhängig. Nachdem die HUVEC konfluent gewachsen sind, wurden diese auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt und im Brutschrank weiter kultiviert. Die HUVEC befanden sich dann in Passage 1. Das Umsetzen auf die Zellkulturflaschen dient der Vermehrung und Kultivierung der HUVEC.

### **3.3.2. Immunfluoreszenz zur Bestimmung der Reinheit der HUVEC**

Mittels der Immunfluoreszenz wurde überprüft, ob die Zellkultur ausschließlich HUVEC enthält. Bei dieser Methode wurde der von-Willebrand-Faktor, der nur von Endothelzellen exprimiert wird, sichtbar gemacht. Der von-Willebrand-Faktor ist ein Antigen, an dem ein spezifischer Primärantikörper bindet, sodass ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper des Komplexes (Abbildung 3, *rechts*).

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff für die Kernfärbung. Er durchdringt die Zellmembran und bindet an doppelsträngige DNS (Abbildung 3, *links*). Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden HUVEC bei 10-facher Vergrößerung mikroskopiert. Bei dieser Methode werden die fluoreszierenden Farbstoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Diese wiederum strahlen Licht einer anderen Wellenlänge ab. Durch spezielle Filter im Fluoreszenzmikroskop wird das abgestrahlte Licht sichtbar gemacht.

## HUVEC

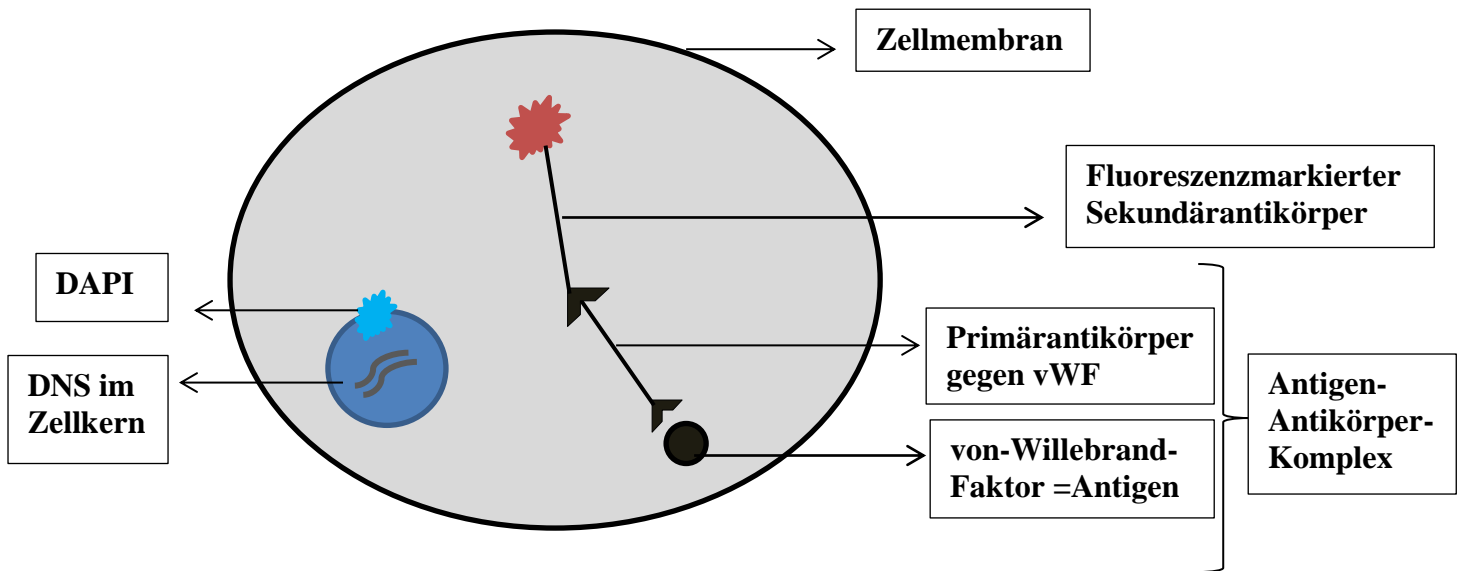


Abbildung 3: Prinzip der Immunfluoreszenz und Zellkernfärbung von HUVEC  
rechts: Fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper gegen den von-Willebrand-Faktor, links: Zellkernfärbung mit DAPI

Durch Verwendung eines speziellen Objektträgers wurde eine definierte Zellzahl fluoreszenzmarkierter Zellen fotografiert und die von-Willebrand-Faktor-positiven Zellen gezählt. So konnte abgeschätzt werden, wie rein die Isolation der HUVEC ist.

Für den Immunfluoreszenztest wurden HUVEC der Passage 2 in Vollmedium M199 mit 20 % FCS benutzt. Die Versuchsausrüstung bestand aus einem speziellen Objektträger, der sogenannten 1  $\mu$ -Slide I<sup>0.4</sup> Luer ibiTreat-MicroscopyChamber (Abbildung 4) mit einer Füllkapazität von 100  $\mu$ l. Der Objektträger wurde mit 100  $\mu$ l Suspension ( $\cong 7,5 \times 10^5$  Zellen) gefüllt und anschließend für 30 Minuten im CO<sub>2</sub>-Inkubator gelagert. Anschließend wurde das Reservoir mit Vollmedium M199 mit 20 % FCS aufgefüllt, um es über Nacht im CO<sub>2</sub>-Inkubator aufzubewahren.

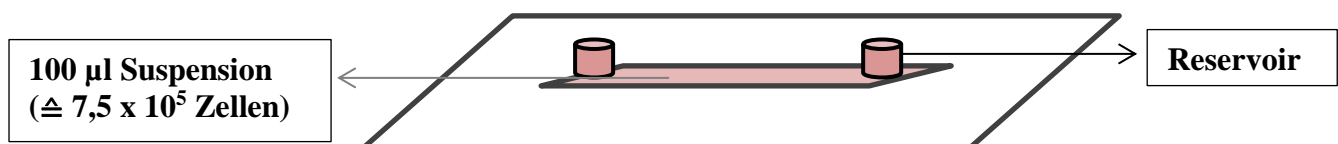


Abbildung 4: Skizze der 1 $\mu$ -Slide I0.4 Luer ibiTreat-MicroscopyChamber, Ibbidi

Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit 200 µl 4 % PFA/PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 120 µl 0,2 % Triton für 5 Minuten hinzugefügt, um die Zellen für die nachfolgende Antikörperbehandlung vorzubereiten. Die Zellen werden durch das Triton permeabilisiert, sodass hinzugefügte Antikörper in die Zellen gelangen können. Nachdem das Triton wieder abgesaugt wurde, wurde der Objektträger für 45 Minuten mit 1 % BSA/PBS befüllt. Durch diesen Blockierungsschritt sollen unspezifische Bindungen minimiert werden. Der Anti-von-Willebrand-Primärantikörper wurde 1:50 in PBS/BSA verdünnt, auf die Zellen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper und DAPI auf die Zellen gegeben wurde. Der Alexa Flour 546 Goat anti-Rabbit-IgG-Sekundärantikörper wurde 1:1000 in 1 % BSA/PBS verdünnt und DAPI wurde 1:1000 in 1 % BSA verdünnt. Die Zellen wurden danach eine Stunde bei Dunkelheit inkubiert, dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Mounting Medium eingebettet. Im Anschluss wurden die fluoreszierenden Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit 10-facher Vergrößerung mikroskopiert.

### **3.3.3. Bestimmung der Zellzahl und Behandlung der Zellen**

Für Versuche wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurde das Medium in der Zellkulturflasche mittels einer Absaugflasche entfernt, die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin-EDTA für circa 1 Minute hinzugefügt. Mit frisch zugegebenem M199 mit 20 % FCS wurden die abgelösten Zellen im Medium aufgenommen. Ein Teil der sich in Suspension befindlichen Zellen wurde für die Zellzahlbestimmung abgenommen und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt.  $4 \times 10^5$  HUVEC wurden dann auf 6-cm Zellkulturschalen gegeben und ausplattiert.

Bei Erreichen von Konfluenz in der 6-cm Zellkulturschale wurden die Zellen zur Serumreduzierung für 4 Stunden in M199 mit 0,5 % FCS inkubiert. Danach wurden sie für 16 Stunden mit 2 nM VEGF behandelt. Zellen ohne VEGF dienten als Kontrollen.

#### **3.3.4. Einfrieren und Lagerung**

Ein Teil der trypsinierten Zellen wurde eingefroren und gelagert. Dafür wurden die Zellen in 10 ml M199 mit 20 % FCS resuspendiert und in einem Falcon für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 1 ml Cryo-SFM resuspendiert und in ein 2 ml Kryogefäß überführt. Über Nacht wurden die Gefäße in einem Einfrierbehälter mit Isopropanol bei -80 °C eingefroren. Eine dauerhafte Lagerung von Zellen erfolgt im Stickstofftank.

#### **3.3.5. Zellyse und Abnahme des Zellkulturüberstandes**

Für die Zellyse wurden die HUVEC in der 6-cm Schale zuerst mit 1-2 ml kaltem PBS und dann mit 1 ml kaltem hypotonischen Puffer gewaschen. Danach wurde die Flüssigkeit gut abgesaugt und 80 µl Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach kurzer Zeit wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Platte abgekratzt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und enthielt lösliche Proteine. Die Zellysate wurden schockgefroren und bei -80 °C konserviert.

Für die Abnahme des Zellkulturüberstandes wurden  $4 \times 10^5$  HUVEC der Passage 3 in einer 6-cm Zellkulturschale kultiviert. Unter diesen Bedingungen waren die Zellen nach 2 Tagen konfluent. Um den Zellkulturüberstand von den Zellen aufzunehmen, wurde das Medium von den Kontrollplatten abgenommen und für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Der gewonnene Zellkulturüberstand wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C konserviert.



### 3.4. Zytokin- und Chemokinarray

#### 3.4.1. Versuchsprinzip des Zytokin- und Chemokinarrays

Zur Untersuchung von Zytokinen und Chemokinen in Proben wie Blutplasma, Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin oder Zellkulturüberständen wurde von der Firma R&D Systems ein Array angeboten, mit dessen Hilfe man sowohl Zytokine wie auch Chemokine in Proben bestimmen kann. Im Array für die Detektion von Zytokinen (Human Cytokine Array Panel A, Bestell-Nr.: ARY005) und für die Detektion von Chemokinen (Human Chemokine Array Kit, Bestell-Nr.: ARY017) befanden sich Nitrozellulosemembranen, die mit verschiedenen Antikörpern gespottet waren. Die zu untersuchenden Proben wurden mit einer Mischung verschiedener Detektor-Antikörper versetzt, welche Zytokine beziehungsweise Chemokine gebunden haben. In dieser Suspension entstehen dadurch Antigen-Antikörperkomplexe. Die Membranen wurden mit dieser Suspension in Multi-Dish Schalen inkubiert, sodass die gespotteten Antikörper auf den Membranen die Antigen-Antikörperkomplexe in den Proben zunächst blockiert und dann gebunden haben (Abbildung 5).

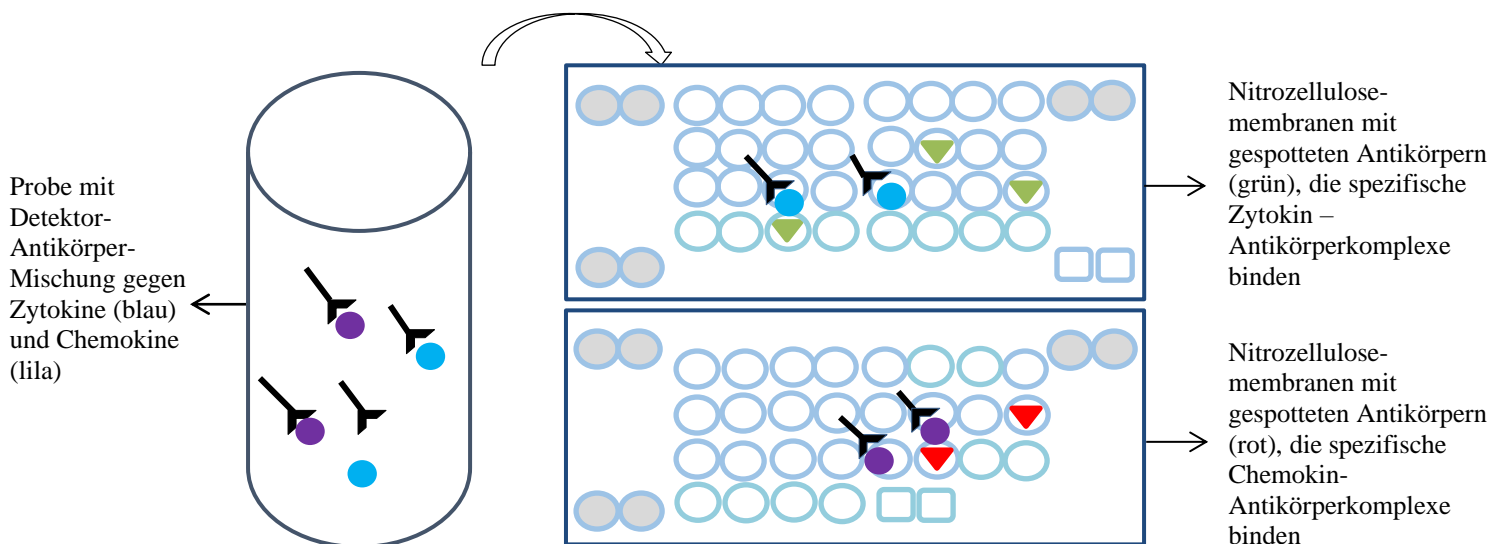


Abbildung 5: Versuchsprinzip des Zytokin- und Chemokinarrays

Nach Behandlung der Membranen wurden die zu untersuchenden Proben aus den Multi-Dish Schalen entfernt und Entwicklerflüssigkeit auf die Membranen gegeben. Die Detektor-Antikörper, welche die korrespondierenden Antigen-Antikörperkomplexe gebunden haben,

geben nach Applikation der Entwicklerflüssigkeit durch eine chemische Reaktion elektromagnetische Strahlung ab, die im Bereich des sichtbaren und ultravioletten Lichts emittiert wird (Chemilumineszenz). Die Nitrozellulosemembranen wurden im FUSION SOLO fotografiert. Damit konnten die gespotteten Antikörper auf den Membranen in Form von Signalen sichtbar gemacht werden. Die emittierten Signale wurden mit der Zeit intensiver bis eine maximale Sättigung erreicht wurde. Die Membranen wurden nach gleichen Entwicklungszeiten fotografiert und die Aufnahmen wurden gespeichert. Die Methode des FUSION SOLO ermöglicht keine Bestimmung absoluter Chemokin- und Zytokin-Mengen, sodass als Messparameter die Lichtintensität nach Menge des detektierten Zytokins bzw. Chemokins gemessen wurde.

Beide Arrays enthielten eine Schablone mit einem Koordinatensystem. Dadurch können die aufgelisteten Zytokine und Chemokine zugeordnet werden. Abbildungen 6 und 7 zeigen eine schematische Darstellung der zugeordneten Koordinaten der Zytokine beziehungsweise Chemokine.

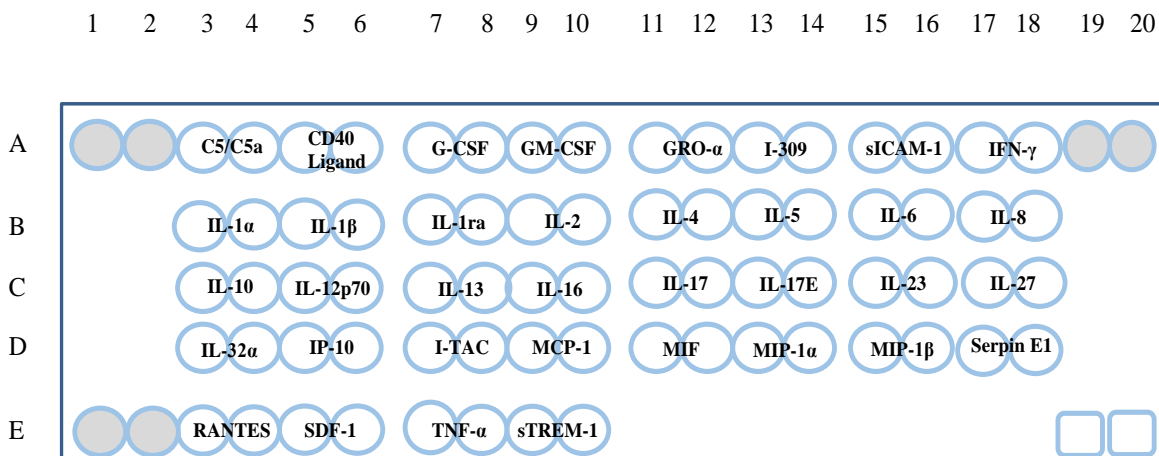


Abbildung 6: Zuordnung der Zytokine im Humanen Zytokine Array

Auf den Membranen des Zytokinarrays konnten insgesamt 36 verschiedene Zytokine identifiziert werden. Jedes Zytokin entspricht jeweils einem Koordinatenpaar. Das Koordinatenpaar B17+B18 entspricht beispielsweise dem Zytokin Interleukin-8. Die grauunterlegten Koordinatenpaare A1+A2, A19+A20 und E1+E2 entsprachen Referenzpunkte, mit deren Hilfe die Schablonen auf den Membranen adjustiert werden konnten. E19+E20 sind Negativkontrollen (eckig gezeichnet).

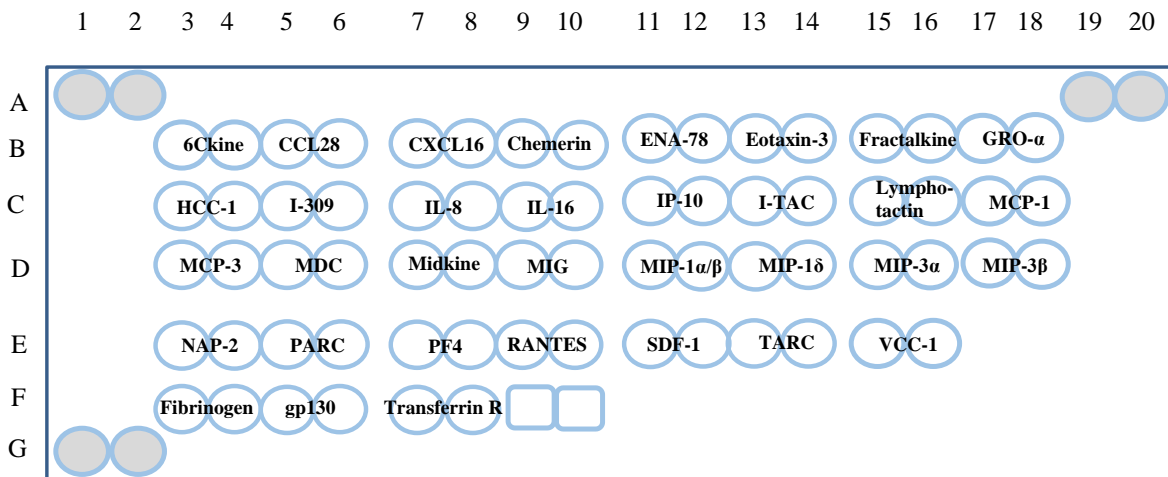


Abbildung 7: Zuordnung der Chemokine im Humanen Chemokine Array

Mit dem Chemokinarray konnten 31 verschiedene Chemokine identifiziert werden. Die Koordinatenpaare F3+F4 (Fibrinogen), F5+F6 (gp130) und F7+F8 (Transferrin R) waren Kontrollproben, die vom Hersteller je nach Membran und Art des Arrays ausgewählt wurden. Die graumarkierten Koordinatenpaare entsprachen Referenzpunkten (A1+A2, A19+A20 und G1+G2). Die Negativkontrollen sind F9+F10.

### 3.4.2. Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen in Zellkulturüberständen

Zellen sezernieren Zytokine und Chemokine in ihre Umgebung, sodass deren Konzentration in Zellkulturüberständen gemessen werden kann. Mit Hilfe des Zytokin- und Chemokinarrays wurde bestimmt, welche Zytokine und Chemokine sich in Zellkulturüberständen von unbehandelten als auch VEGF-behandelten HUVEC befanden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Chemokin- und Zytokinsekretion zwischen männlichen und weiblichen Proben gibt. Die Bestimmung der Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen erfolgte in der vorliegenden Arbeit aus Pools, d.h. aus Zellkulturüberständen mehrerer HUVECs. Dadurch erhält man für die vorliegende Fragestellung eine Gesamtheit der Zytokine und Chemokine aus mehreren Proben. Zytokin- und Chemokin-Messungen aus Einzelproben würden zwar eine bessere Interpretation ermöglichen, jedoch war dies nicht umsetzbar, da die Nitrozellulosemembranen nur einmalig genutzt werden konnten.

Die Proben der unbehandelten HUVEC bestanden aus einem Pool aus jeweils 3 Zellkulturüberständen pro Geschlecht von Zellen der Passage 3 nach 48 Stunden in M199 mit 20 % FCS. Es wurden also für die Pools Zellen von jeweils 3 männlichen und 3 weiblichen Spender/innen benutzt. Für beide Geschlechter wurde sowohl ein Zytokin- als auch ein Chemokinarray durchgeführt (Abbildung 8).

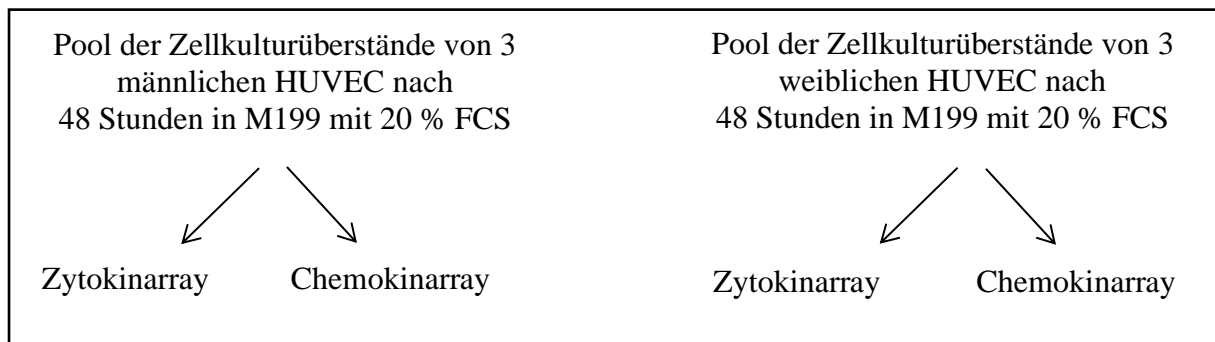


Abbildung 8: Prinzip des Versuchsaufbaus des Zytokin- und Chemokinarrays für Zellkulturüberstände unbehandelter HUVEC

Die Proben der VEGF-behandelten HUVEC bestanden aus einem Pool aus jeweils 5 Zellkulturüberständen pro Geschlecht. Dabei wurden die Zellen wie in 3.3.3. beschrieben für 4 Stunden in M199 mit 0,5 % FCS kultiviert und anschließend für 16 Stunden mit 2 nM VEGF behandelt. Auch dabei wurde je Geschlecht ein Zytokin- und ein Chemokinarray durchgeführt (Abbildung 9).

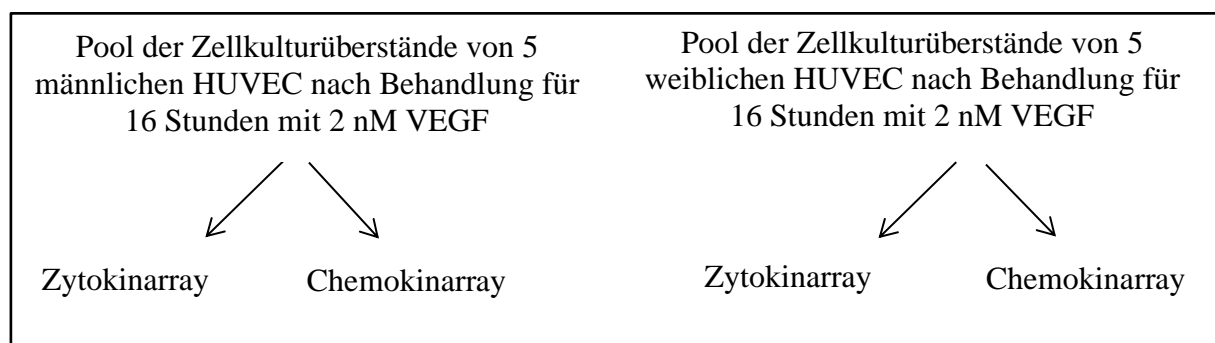


Abbildung 9: Prinzip des Versuchsaufbaus des Zytokin- und Chemokinarrays für Zellkulturüberstände VEGF-behandelter HUVEC

Die Vorbereitungen der Reagenzien und Materialien, sowie die Versuchsausführungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für den Chemokin- und Zytokinarray wurden die Membranen mit den zu untersuchenden Proben und Detektor-Antikörpermischungen inkubiert. In die Kammern der Multi-Dish Schale des Zytokinarrays wurden 2 ml Array Buffer 4 (Blockierungslösung) und in die Kammern des Chemokinarrays 2 ml Array Buffer 5 (Blockierungslösung) pipettiert. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen in die Kammern überführt und für eine Stunde auf einem Schüttler kontinuierlich blockiert. Danach wurde 1 ml Probe pro Kammer mit 0,5 ml Array Buffer 4 gemischt. Nach Entfernen der Blockierungslösungen wurden die vorbereiteten Detektor-Antikörper-Mischungen hinzugefügt. In die Proben für den Zytokinarray wurden 15 µl Detektor-Antikörper-Mischung 1 und in die Proben für den Chemokinarray 15 µl Detektor-Antikörper-Mischung 2 hinzugefügt. Die Membranen wurden über Nacht bei 2-8 °C inkubiert und am nächsten Tag mit jeweils 20 ml 1x Waschpuffer dreimal für jeweils 10 Minuten gewaschen. Für den Zytokinarray wurde Streptavidin-HRP 1:2000 in Array Buffer 5 verdünnt und 2 ml davon wurde in jede Kammer pipettiert. Für den Chemokinarray wurde Streptavidin-HRP in Array Buffer 6 1:2000 verdünnt und 2 ml davon in jede Kammer überführt. Die Membranen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit jeweils 1 ml der vorbereiteten Entwicklerflüssigkeit (Chemi-Reagent-Mix) für 1 Minute inkubiert. Schließlich wurden mit dem Fusion Solo (Chemilumineszenz) die gespotteten Antikörper auf den Membranen sichtbar gemacht. Durch die angegebenen Koordinatensysteme (vergl. Abbildungen 6 und 7) konnten die korrespondierenden Chemokine und Zytokine identifiziert werden. Mit der Herstellersoftware des FUSION SOLO wurden detektierte Zytokin- und Chemokin-Mengen quantifiziert.

### 3.4.3. Analyse von Zytokinen und Chemokinen in Zelllysaten

In diesem Versuchsansatz wurden Zelllysate von männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC untersucht, die neben vielen anderen löslichen Proteinen auch Zytokine und Chemokine enthalten. Es sollte geprüft werden, ob es einen geschlechtsspezifischen Unterschied in intrazellulären Zytokinen und Chemokinen gibt. Die Proben für diesen Versuch bestanden aus einem Pool aus jeweils 3 Zelllysaten pro Geschlecht von HUVEC der Passage 3 in M199 mit 20 % FCS. Es wurden also für die Pools Zellen von jeweils 3 männlichen und 3 weiblichen Spender/innen benutzt. Für jedes Geschlecht wurde auch hier sowohl ein Zytokin- als auch ein Chemokinarray durchgeführt (Abbildung 10).

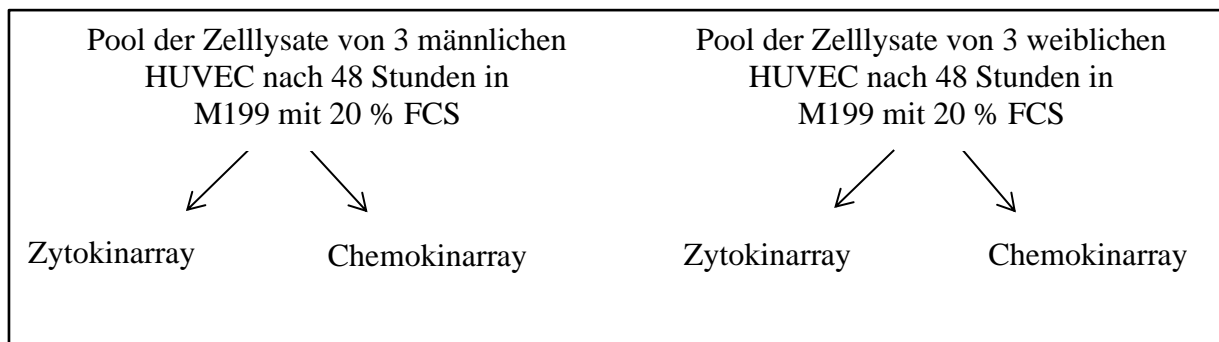


Abbildung 10: Prinzip des Versuchsaufbaus des Zytokin- und Chemokinarrays für Zelllysate unbehandelter HUVEC

Zunächst wurden 2 ml Array Buffer 4 in die Kammern der Multi-Dish Schale des Zytokinarrays und 2 ml Array Buffer 5 in die Kammern der Multi-Dish Schale des Chemokinarrays pipettiert. Anschließend wurden die entsprechenden Membranen in die Kammern überführt und für 1 Stunde auf einem Schüttler blockiert. In dieser Zeit wurden die Zelllysate-Proben vorbereitet. Dafür wurden 970 µl Array Buffer 5, 500 µl Array Buffer 4 und 7,5 µl Detektor-Antikörper-Mischung 1 in 84 µg Zelllysate für die Zytokinbestimmung hinzugefügt. In die gleiche Menge der Zelllysateproben (84 µg Zelllysate je Geschlecht) für die Chemokinbestimmung wurden 970 µl Array Buffer 6, 500 µl Array Buffer 4 und 7,5 µl Detektor-Antikörper-Mischung 2 hinzugegeben. Nach 60 Minuten wurden die Blockierungslösungen aus den Multi-Dish Schalen

entfernt und die entsprechenden Membranen wurden über Nacht bei 2-8 °C in den vorbereiteten Proben inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen mit jeweils 20 ml Waschpuffer dreimal für jeweils 10 Minuten gewaschen. Für den Zytokinarray wurde Streptavidin-HRP 1:2000 in Array Buffer 5 verdünnt und 2 ml davon in jede Kammer pipettiert. Für den Chemokinarray wurde Streptavidin-HRP in Array Buffer 6 1:2000 verdünnt und 2 ml davon in jede Kammer überführt. Die Membranen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Membranen mit jeweils 1 ml einer vorbereiteten Entwicklerflüssigkeit (Chemi-Reagent-Mix) für 1 Minute inkubiert. Schließlich wurden mit dem Fusion Solo (Chemilumineszenz) die gebundenen Antikörper auf den Membranen sichtbar gemacht.

Mit Hilfe der oben aufgeführten Koordinatensysteme (vergl. Abbildungen 6 und 7) konnten die korrespondierenden Chemokine und Zytokine in den Zelllysaten identifiziert werden. Auch in diesem Versuch wurden mittels der Herstellersoftware des FUSION SOLO detektierte Zytokin- und Chemokinkonzentrationen quantifiziert.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Immunfluoreszenz der HUVEC-Zellkultur

Die Reinheit der HUVEC-Zellkultur musste überprüft werden. Da nur Endothelzellen den von-Willebrand-Faktor exprimieren, kann mittels Immunfluoreszenz festgestellt werden, ob sich ausschließlich HUVEC in der Zellkultur befinden. Nach Zugabe eines von-Willebrand-Primärantikörpers und eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers, wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung mikroskopiert (Abbildung 11).

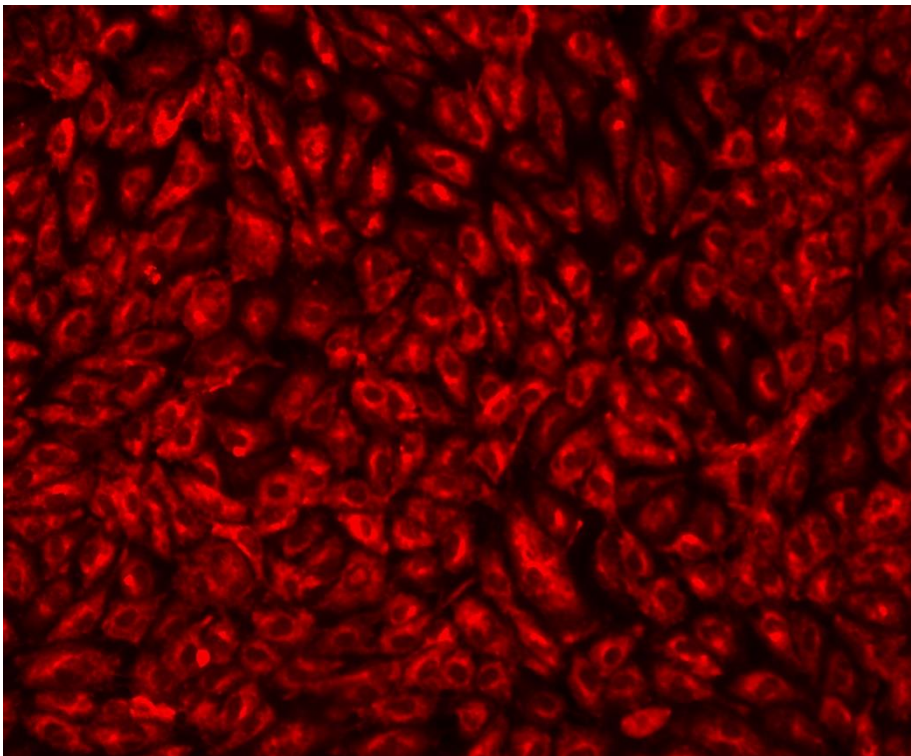


Abbildung 11: HUVEC-Färbung mit Von-Willebrand-Faktor  
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der HUVEC nach Zugabe eines von-Willebrand-Primärantikörpers und eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers, der den vW-Primärantikörper im Zellplasma bindet.

Die HUVEC färben sich intensiv rot, wobei die Zellkerne von der Fluoreszenz ausgenommen sind, da von-Willebrand-Faktor nicht im Zellkern vorkommt. Im dargestellten Bild sind etwa 350 Zellen enthalten. Die Form der Endothelzellen ist rund- bis tropfenförmig. Anschließend erfolgte eine Färbung des Zellkerns mittels des fluoreszierenden Farbstoffs DAPI.



DAPI durchdringt Zellmembranen und bindet an doppelsträngige DNS. Abbildung 12 stellt den identischen Ausschnitt sowie die gleiche Vergrößerung wie Abbildung 11 dar.

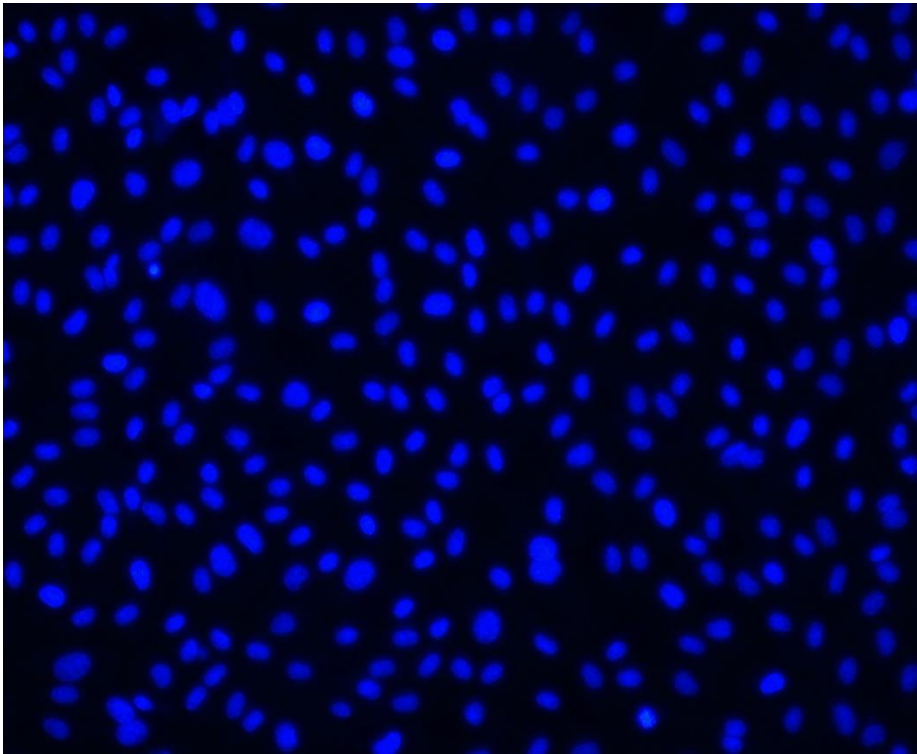


Abbildung 12: Zellkernfärbung mit DAPI  
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zellkernfärbung mit DAPI bei 10-facher Vergrößerung.

Die Zellkerne in blau sind deutlich abgegrenzt und gleichmäßig gefärbt. Die Anzahl der Zellkerne in diesem Bild entspricht der Zellzahl in Abbildung 11. In Abbildung 13 sind die fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen der Abbildungen 11 und 12 übereinandergelegt, sodass die Zellkerne in blau und das Zellplasma in rot zu sehen sind.

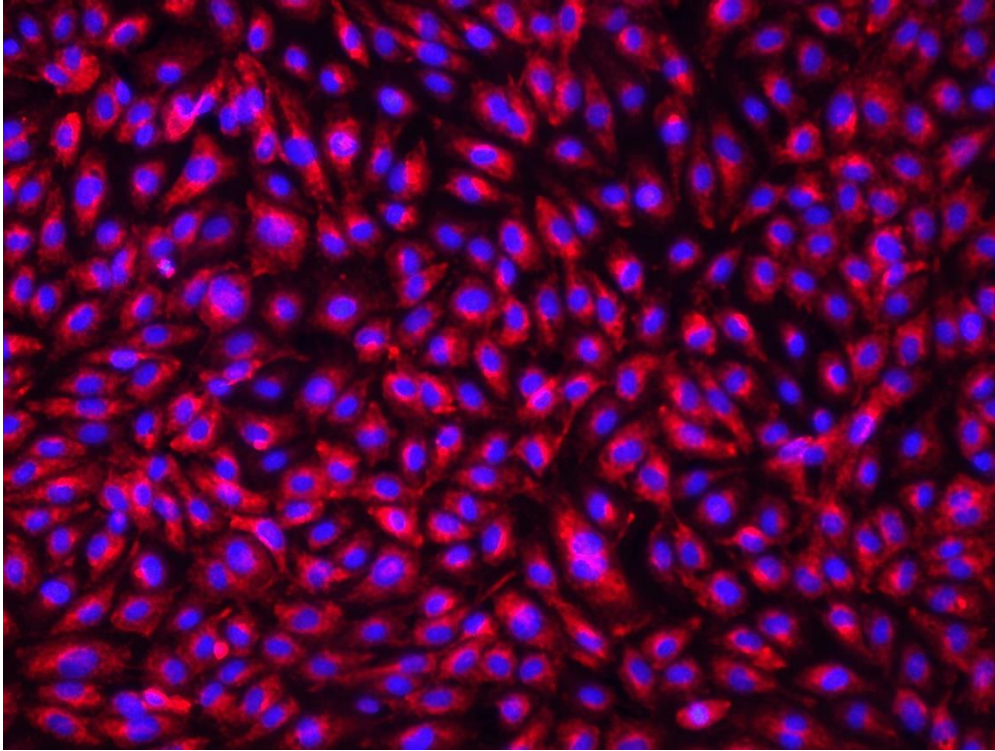


Abbildung 13: Übereinandergelegte Darstellung der vWF-Färbung und der DAPI-Zellkernfärbung

Die Zellkerne nehmen flächenmäßig durchschnittlich ein Drittel bis die Hälfte der Zellen ein. Dabei ist jedem blau-fluoreszierenden Zellkern eine rot-fluoreszierende Zelle zugeordnet. Dies lässt den Schluss zu, dass sich neben Endothelzellen keine anderen Zellen in der Zellkultur befinden. Die Zellkultur kann daher als frei von Kontaminationen mit Fremdzellen und somit als 100 % rein betrachtet werden.

## 4.2. Auswertungen der Zytokin- und Chemokinarrays mittels Chemilumineszenz

### 4.2.1. Invertierung und Bezeichnung der Membranen

Nach Zugabe von Entwicklerflüssigkeit wurden die Nitrozellulosemembranen mittels Chemilumineszenz im FUSION SOLO fotografiert. Abbildung 14 zeigt beispielhaft die Ansicht der Membranen in maximaler Lichtintensität. 'Zyt' steht für Zytokinarrays und 'Chem' für Chemokinarrays. Die Buchstaben M (male = männlich) und F (female = weiblich) stehen für das jeweilige Geschlecht.

Membran Zyt 1M



Membran Chem 1M



Membran Zyt 1F



Membran Chem 1F

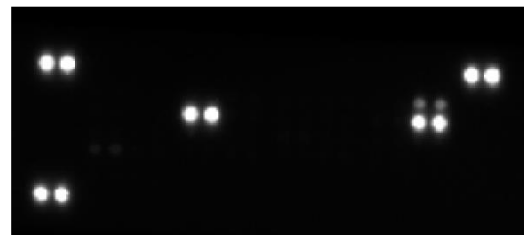
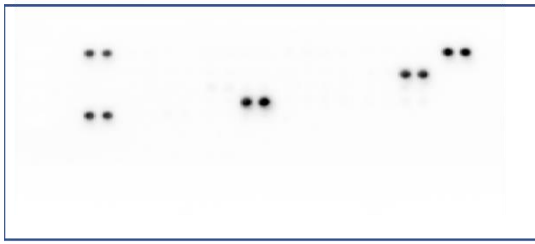


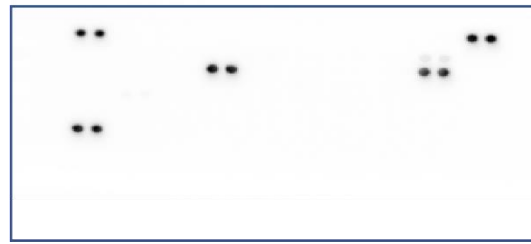
Abbildung 14: Originalaufnahmen von Membranen des Zytokin- und Chemokinarrays  
Links: Membranen Zyt 1M (männlich) und Zyt 1F (weiblich) des Zytokinarrays  
rechts: Membranen Chem 1M (männlich) und Chem 1F (weiblich) des Chemokinarrays.

Die Aufnahmen wurden invertiert, sodass die Signale in schwarz erscheinen (Abbildung 15). Dies erlaubt eine bessere Visualisierung der Lichtintensitäten. Nachfolgende Auswertungen der Membranen erfolgten immer anhand von invertierten Aufnahmen.

Zyt 1M (invertiert)



Membran Chem 1M (invertiert)



Zyt 1F (invertiert)



Membran Chem 1F (invertiert)

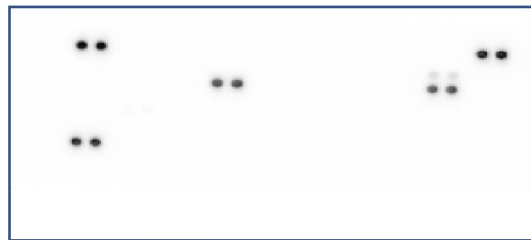


Abbildung 15: Invertierte Aufnahme der Originalaufnahmen der Membranen des Zytokin- und Chemokinarrays

Links: invertierte Membranen Zyt 1M (männlich) und Zyt 1F (weiblich) des Zytokinarrays, rechts: invertierte Membranen Chem 1M (männlich) und Chem 1F (weiblich) des Chemokinarrays.

#### 4.2.2. Prinzip der Zuordnung detektierter Signale

Die Signale sind paarweise angeordnet. Dabei entspricht ein Doppelsignal einem spezifisch detektierten Zytokin beziehungsweise Chemokin. Die in Abbildungen 6 und 7 dargestellten Schablonen wurden auf die Aufnahmen gelegt und mit Hilfe der Referenzpunkte korrekt adjustiert, sodass den Signalen korrespondierende Zytokine beziehungsweise Chemokine zugeordnet werden konnten. Abbildung 16 zeigt eine invertierte Aufnahme einer Membran mit der entsprechenden Schablone des Chemokinarrays.

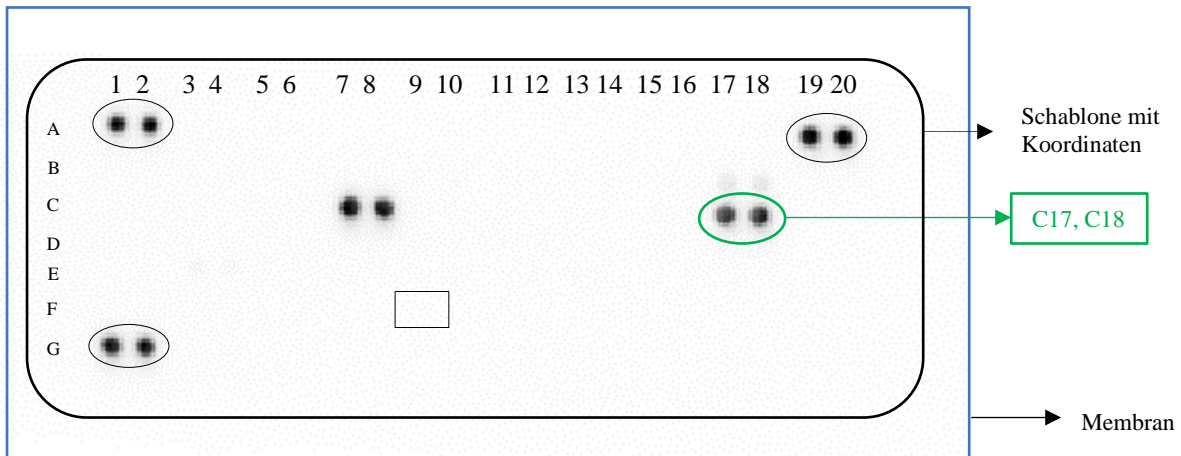


Abbildung 16: Membranskizze und Schablone des Chemokinarrays  
 Invertierte Aufnahme der Membran Chem 1M (männlich) sowie Schablone mit den Koordinaten des Chemokinarrays.

Die Referenzpunkte A1+A2, A19+A20 und G1+G2 (Abbildung 16, schwarz eingekreist) mussten korrekt auf die invertierten Aufnahmen der Membranen gelegt werden, sodass ein adäquates Ablesen der anderen Koordinaten erfolgen konnte. Nachdem die Positionen der Referenzpunkte und Negativkontrollen (F9 + F10 in Abbildung 16 mit Viereck umrandet) abgeglichen wurden, wurden den anderen Signalen die entsprechenden Chemokine zugeordnet. Das grün-markierte Koordinatenpaar C17+C18 in Abbildung 16 entsprach beispielsweise dem Chemokin MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1).

Abbildung 17 zeigt eine Aufnahme der Membran mit der entsprechenden Schablone des Zytokinarrays. Die Anordnung der Schablone sowie die Zuordnung der Signale erfolgte analog des Chemokinarrays.

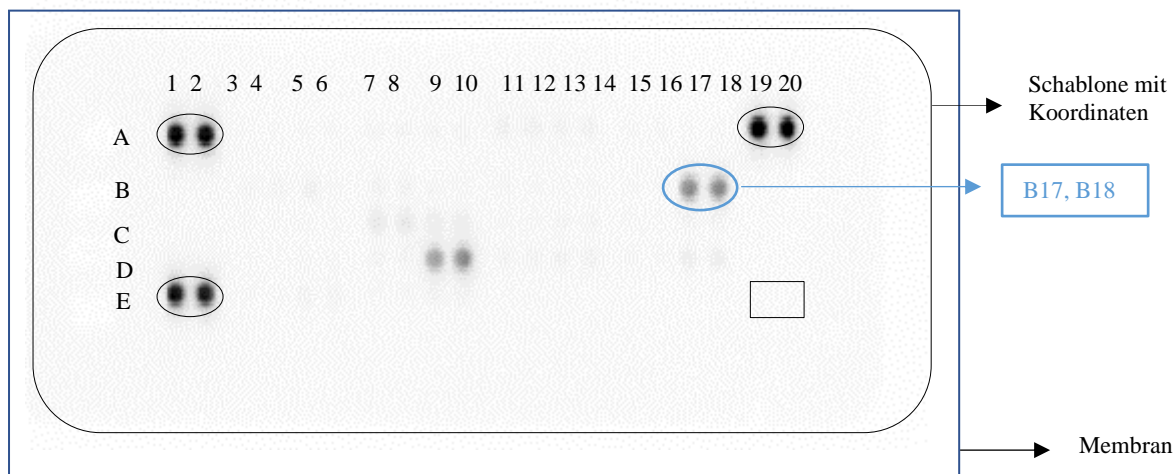


Abbildung 17: Skizze der Membran mit Schablone des Zytokinarrays  
 Invertierte Aufnahme der Membran Zyt 1F (weiblich) und Schablone mit den Koordinaten des Zytokinarrays.

Die Referenzpunkte in diesem Array entsprachen den Koordinaten A1+A2, A19+A20 und E1+E2 (Abbildung 17 eingekreist) und die Negativkontrollen entsprachen E19+E20 (Abbildung 17 mit Viereck umrandet). Das blau-markierte Koordinatenpaar B17+B18 entsprach in der Tabelle des Herstellers dem Zytokin IL-8 (Interleukin-8).

#### 4.2.3. Allgemeine Auswertungen der Membranen

Die Signale eines Koordinatenpaares der zwei Membranen (männlich und weiblich) wurden innerhalb des gleichen Arrays miteinander verglichen und quantifiziert. Dabei wurden jeweils die Membranen männlicher und weiblicher Proben nach identischen Entwicklungszeiten miteinander verglichen. Die Referenzpunkte sind exemplarisch in den beiden nachfolgenden Abbildungen rot umkreist, die Negativkontrollen viereckig umrandet. Die Anordnungen dieser Signale gelten für die darauffolgenden Abbildungen. Bei der Quantifizierung wurden die Signale der männlichen Proben jeweils 100 % gesetzt. Es wurden Unterschiede in der Art und Menge der Zytokine und Chemokine zwischen männlichen und weiblichen Zellen in Zellkulturüberständen und in Zelllysaten ermittelt. Durch die Verwendung von Pools aus mehreren Einzelproben ist keine Statistik möglich. Für eine Statistik braucht man eine gewisse

Anzahl an Einzelwerten. Aus einem Pool kann man für eine Statistik keinen Mittelwert oder Median bestimmen und Ausreißer nicht zuordnen. In dieser vorliegenden Pilotstudie wurden Intensitäten zwischen 95 und 105 % der weiblichen Zellen im Vergleich zu den männlichen Pools als kein geschlechtsspezifischer Unterschied definiert. Unterschiede über oder unter diesen Werten wurden als Geschlechtsunterschied gewertet.

### 4.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede sezernierter und intrazellulärer Zytokine und Chemokine in HUVEC

#### 4.3.1. Geschlechtsspezifische Unterschiede sezernierter Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC

Es sollte geprüft werden, ob es Unterschiede in der Art und Menge sezernierter Zytokine in Zellkulturüberständen männlicher und weiblicher HUVEC gibt. Die Zellen wurden für 48 Stunden in M199 mit 20 % FCS kultiviert. Die Proben bestanden aus einem Pool von jeweils 3 Zellkulturüberständen pro Geschlecht. Aufgrund limitierter Probenanzahl wurden bei allen Messungen Pools von mindestens  $n = 3$  HUVEC statt Einzelmessungen verwendet. Die Membranen wurden jeweils nach identischer Entwicklungszeit ausgewertet (Abbildung 18).

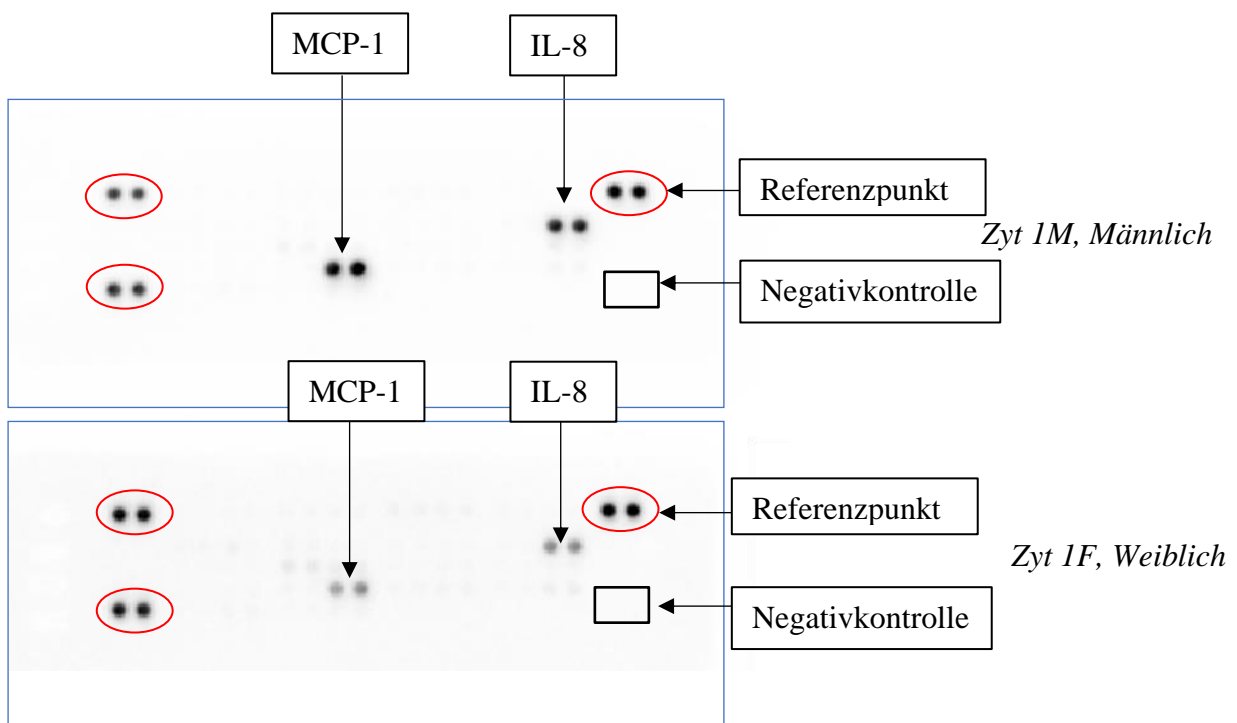


Abbildung 18: Sezernierte Zytokine unbehandelter HUVEC Membran Zyt 1M (männlich) und Zyt 1F (weiblich) aus Zellkulturüberständen mit Markierung sezernierter Zytokine. Pool aus 3 Zellkulturüberständen pro Geschlecht.

In diesem Versuch konnten nur zwei Zytokine detektiert werden: MCP-1 sowie IL-8 (Abbildung 18). Die Menge der sezernierten Zytokine MCP-1 und IL-8 war in Zellkulturüberständen männlicher HUVEC größer als in den weiblichen. Mit einer Intensität



von 34 % im Vergleich zu den männlichen Zellen lag Interleukin-8 in Überständen weiblicher HUVEC deutlich geringer vor. Auch das Zytokin MCP-1 wurde mit 25 % deutlich weniger in weiblichen Proben sezerniert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vergleich der Intensitäten sezernierter Zytokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC

<b>Koordinatenpaare zugeordneter Zytokine</b>	<b>Membran Zyt 1M (männlich) Intensität (%)</b>	<b>Membran Zyt 1F (weiblich) Intensität (%)</b>
B17, B18 = IL-8	100	34
D9, D10 = MCP-1	100	25

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Chemokinsekretion zwischen männlichen und weiblichen HUVEC gibt. Für diesen Versuch wurden die gleichen Proben wie unter 4.3.1 beschrieben verwendet und nach identischer Entwicklungszeit ausgewertet. Da Chemokine eine Untergruppe der Zytokine bilden (van der Vorst et al. 2015), enthalten die Chemokinarrays auch einige Proteine der Zytokinarrays.

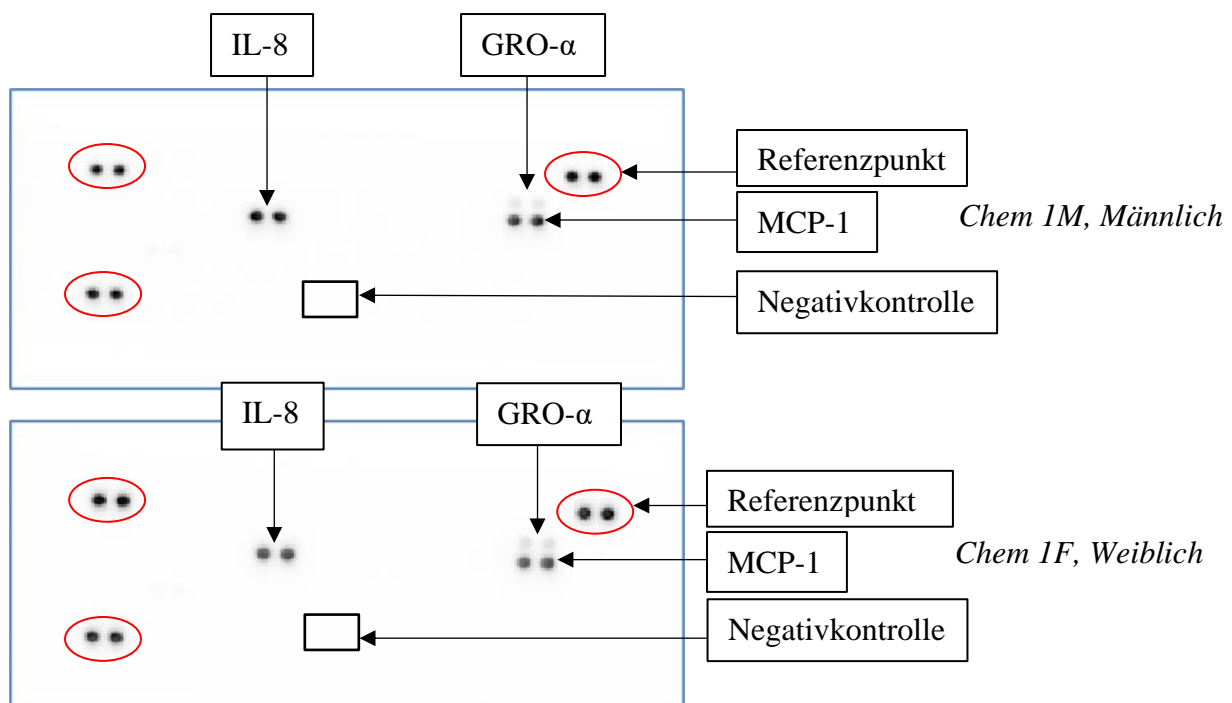


Abbildung 19: Sezernierte Chemokine unbehandelter HUVEC Membran Chem 1M (männlich) und Chem 1F (weiblich) aus Zellkulturüberständen mit Markierung sezernierter Chemokine. Pool aus 3 Zellkulturüberständen pro Geschlecht.

In diesem Array wurden die drei Chemokine IL-8 (Interleukin-8), GRO- $\alpha$  (Growth Regulated Alpha-Protein) und MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) nachgewiesen. Dabei war GRO- $\alpha$  das einzige von den drei Chemokinen, welches in höheren Mengen in Überständen weiblicher HUVEC vorhanden war (113 %, vergleiche Tabelle 4). IL-8 und MCP-1 wurden dahingegen in höheren Mengen in Überständen männlicher HUVEC nachgewiesen. In Überständen von weiblichen HUVEC lag die Intensität von IL-8 bei 81 % und von MCP-1 bei 83 % (Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich der Intensitäten sezernierter Chemokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC

<b>Koordinatenpaare zugeordneter Chemokine</b>	<b>Membran Chem 1M (männlich) Intensität (%)</b>	<b>Membran Chem 1F (weiblich) Intensität (%)</b>
B17, B18 = GRO- $\alpha$	100	113
C7, C8 = IL-8	100	81
C17, C18 = MCP-1	100	83

#### 4.3.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede intrazellulärer Zytokine und Chemokine in unbehandelten HUVEC

Nachdem geschlechtsspezifische Unterschiede sezernierter Zytokine in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC detektiert wurden, sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Art und Menge intrazellulärer Zytokine gibt. Dazu wurde jeweils ein Pool aus 3 Proben männlicher und weiblicher Zelllysate von unbehandelten HUVEC verwendet (Abbildung 20).

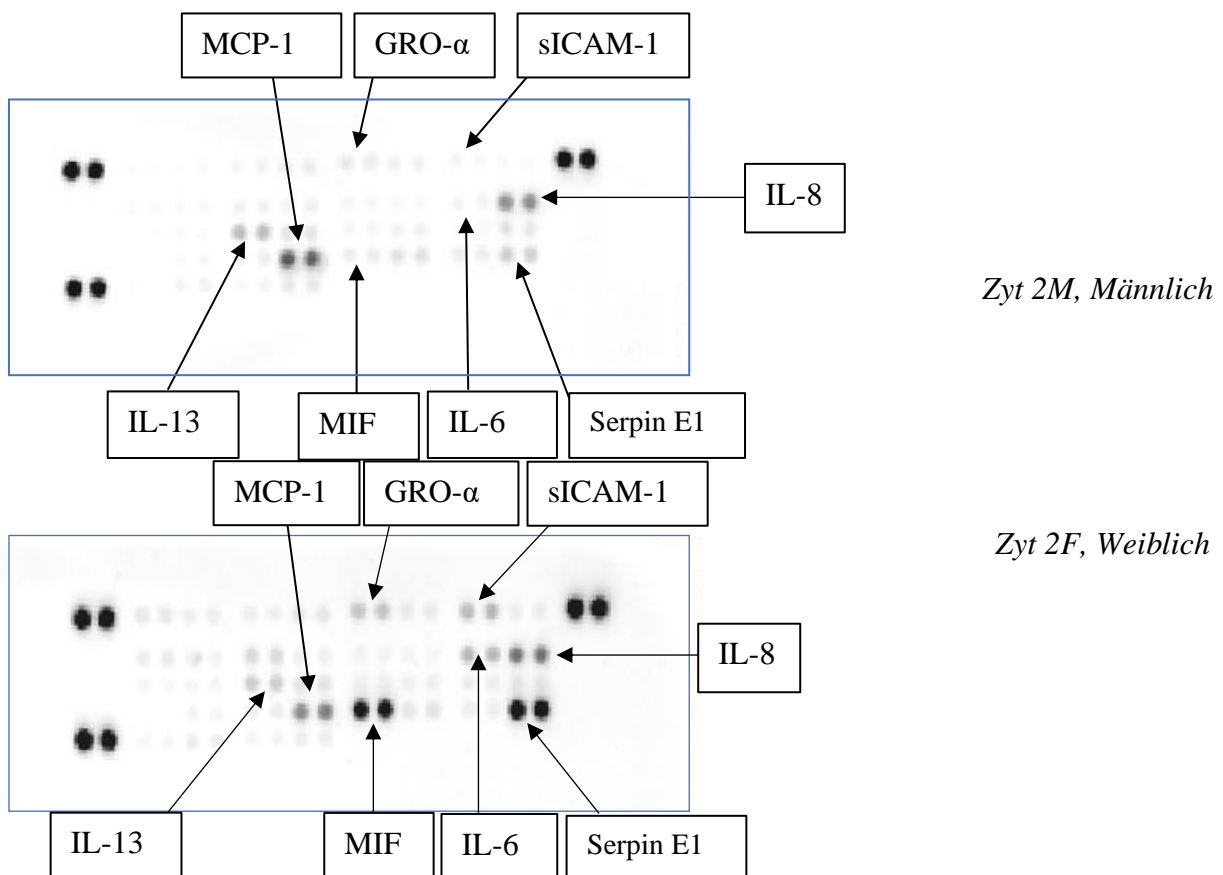


Abbildung 20: Detektierte Zytokine in Zelllysaten unbehandelter HUVEC Membran Zyt 2 (männlich) und Membran Zyt 2F (weiblich) aus Zelllysaten mit Markierung detektierter Zytokine. Pool aus 3 Zelllysaten pro Geschlecht.

Bei diesem Versuch wurden insgesamt acht Zytokine detektiert: MCP-1, GRO- $\alpha$ , sICAM-1, IL-8, IL-13, MIF, IL-6 und Serpin E1. Außer MCP-1 und IL-13 wurden alle detektierten Zytokine stärker in weiblichen Zellen exprimiert. MCP-1 lag im weiblichen Zelllysate bei 85 %

des männlichen Niveaus. Für IL-13 konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich der Intensitäten intrazellulärer Zytokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC

<b>Koordinatenpaare zugeordneter Zytokine</b>	<b>Membran Zyt 2M (männlich) Intensität (%)</b>	<b>Membran Zyt 2F (weiblich) Intensität (%)</b>
A11, A12 = GRO- $\alpha$	100	163
A15, A16 = sICAM-1	100	349
B15, B16 = IL-6	100	187
B17, B18 = IL-8	100	124
C7, C8 = IL-13	100	100
D9, D10 = MCP-1	100	85
D11, D12 = MIF	100	382
D17, D18 = Serpin E1	100	756

Serpin E1 wies den auffälligsten Geschlechtsunterschied auf. Es war in den weiblichen Zellen um mehr als das Siebenfache stärker exprimiert als in den männlichen Zellen. Auch MIF war in weiblichen HUVEC um nahezu das Vierfache erhöht. Das lösliche ICAM-1 (sICAM-1) lag mit ca. 350 % ebenfalls deutlich höher im Lysat weiblicher HUVEC vor. Die Proteine GRO- $\alpha$  und IL-6 waren 1,6 bzw. 1,9-fach höher in den weiblichen Zellen. Nur zwei der hier detektierten Zytokine wurden auch in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC gefunden: IL-8 und MCP-1 (vergl. Tabelle 3). Dort lagen beide Zytokine verstärkt in Überständen männlicher Zellen vor.

Im folgenden Versuch sollte geprüft werden, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in intrazellulären Chemokinen unbehandelter HUVEC gibt. Dabei wurden jeweils 3 Zelllysate männlicher und weiblicher HUVEC verwendet. Es handelte sich um dieselben Lysate, die für die Detektion von Zytokinen verwendet wurden (Abbildung 21).

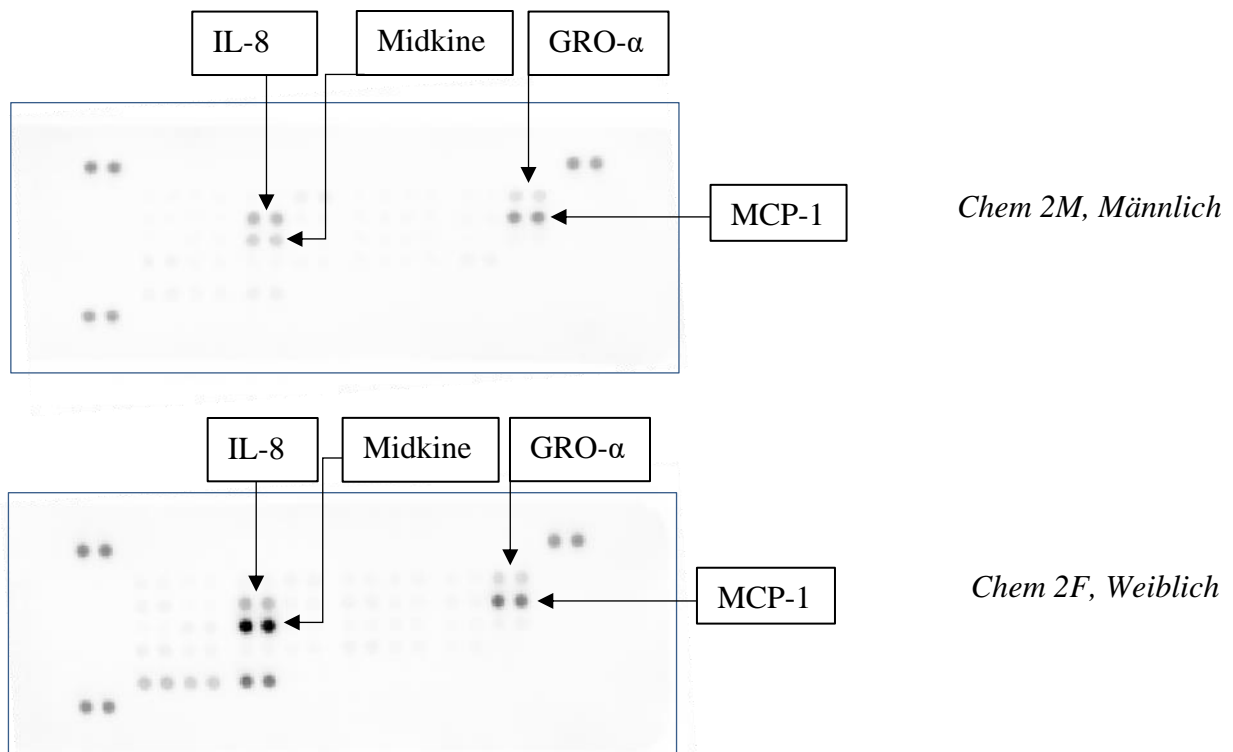


Abbildung 21: Detektierte Chemokine in Zelllysaten unbehandelter HUVEC Membran Chem 2M (männlich) und Membran Chem 2F (weiblich) aus Zelllysaten mit Markierung detektierter Chemokine. Pool aus 3 Zelllysaten pro Geschlecht.

Alle detektierten Chemokine (IL-8, Midkine, GRO- $\alpha$  und MCP-1) liegen in Zelllysaten weiblicher HUVEC in höheren Mengen vor. Besonders auffällig ist der starke geschlechtsspezifische Unterschied von Midkine. Dabei wurde das Chemokin Midkine mit einer Intensität von 629 % im Zelllysate weiblicher HUVEC gemessen, gefolgt von GRO- $\alpha$  mit 171 %. MCP-1 war mit 152 % und IL-8 mit 135 % höher in weiblichen Zellen vertreten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der Intensitäten intrazellulärer Chemokine zwischen männlichen und weiblichen unbehandelten HUVEC

<b>Koordinatenpaare zugeordneter Chemokine</b>	<b>Membran Chem 2M (männlich) Intensität (%)</b>	<b>Membran Chem 2F (weiblich) Intensität (%)</b>
B17, B18 = GRO- $\alpha$	100	171
C7, C8 = IL-8	100	135
C17, C18 = MCP-1	100	152
D7, D8 = Midkine	100	629

Drei der hier detektierten Chemokine wurden ebenfalls in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC nachgewiesen: GRO- $\alpha$ , IL-8 und MCP-1 (vergl. Tabelle 4 in 4.3.1.). Dabei wurde nur GRO- $\alpha$  verstärkt in Überstände weiblicher HUVEC sezerniert. Midkine hingegen wurde nicht in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC gefunden (vergl. Tabelle 4).

#### **4.3.3. Vergleich sezernierter Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen VEGF-behandelter männlicher und weiblicher HUVEC**

Der Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ist entscheidend bei der Regulation der Migration von Endothelzellen (Wang et al. 2011; Salajegheh 2016). In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Unterschied in der VEGF-induzierten Migration zwischen männlichen und weiblichen HUVEC gefunden (Lorenz et al. 2019). Es konnte gezeigt werden, dass weibliche Zellen eine höhere VEGF-induzierte Migrationsaktivität aufwiesen als männliche HUVEC. Der festgestellte Unterschied stellt daher die Basis für den Einschluss der VEGF-Behandlung in dieser Arbeit dar. Es sollte die Frage untersucht werden, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Zytokinsekretion in Zellkulturüberständen männlicher und weiblicher HUVEC nach Behandlung mit VEGF gibt. Die Zellen wurden zunächst für 4 Stunden in M199 mit 0,5 % FCS inkubiert und danach für 16 Stunden mit 2 nM VEGF behandelt. Die analysierten Proben bestanden aus einem Pool aus jeweils 5 Zellkulturüberständen pro Geschlecht (Abbildung 22).

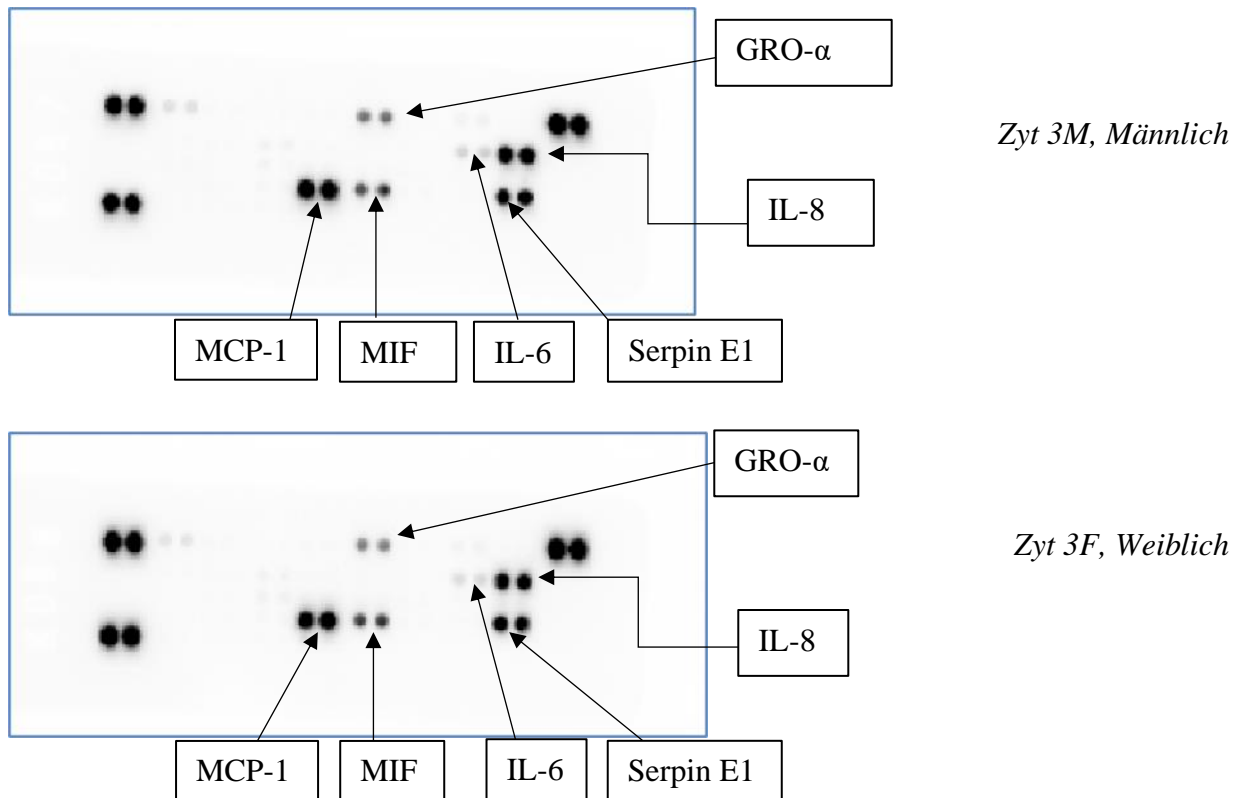


Abbildung 22: Sezernierte Zytokine nach Behandlung mit VEGF Membran Zyt 3M (männlich) und Zyt 3F (weiblich) aus Zellkulturüberständen mit Markierung sezernierter Zytokine. Pool aus 5 Zellkulturüberständen pro Geschlecht.

Es wurden insgesamt sechs Zytokine detektiert: GRO- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, MIF (Makrophage Migration Inhibitory Factor) IL-6 (Interleukin-6) und Serpin E1. Für die Zytokine MIF und Serpin E1 wurden nach VEGF keine Unterschiede in Überständen weiblicher und männlicher HUVEC nachgewiesen. Jedoch wurden höhere Level von GRO- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und MCP-1 in Überständen männlicher Zellen gefunden (Tabelle 7).



Tabelle 7: Vergleich der Intensitäten sezernierter Zytokine zwischen männlichen und weiblichen HUVEC nach VEGF-Behandlung

<b>Koordinatenpaare zugeordneter Zytokine</b>	<b>Membran Zyt 3M (männlich) Intensität (%)</b>	<b>Membran Zyt 3F (weiblich) Intensität (%)</b>
A11, A12 =GRO- $\alpha$	100	92
B15, B16 = IL-6	100	76
B17, B18 = IL-8	100	80
D9, D10 = MCP-1	100	86
D11, D12 = MIF	100	103
D17, D18 = Serpin E1	100	102

So lag das Zytokin IL-6 nach Behandlung mit VEGF in ca. 25 % höherer Konzentration in Zellkulturüberständen männlicher HUVEC vor. Die Menge an sezerniertem IL-8 und MCP-1 war in den Zellkulturüberständen männlicher HUVEC um ca. 15-20 % höher. Insgesamt wurden im Vergleich zu unbehandelten HUVEC (vergl. Tabelle 3) nach Behandlung mit VEGF wesentlich mehr Zytokine sezerniert.

Nach der Detektion geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Menge sezernerter Zytokine nach Behandlung mit VEGF wurden auch potentielle Unterschiede in der Chemokinsekretion untersucht. Dafür wurden die gleichen Zellkulturüberstände verwendet (Abbildung 23).

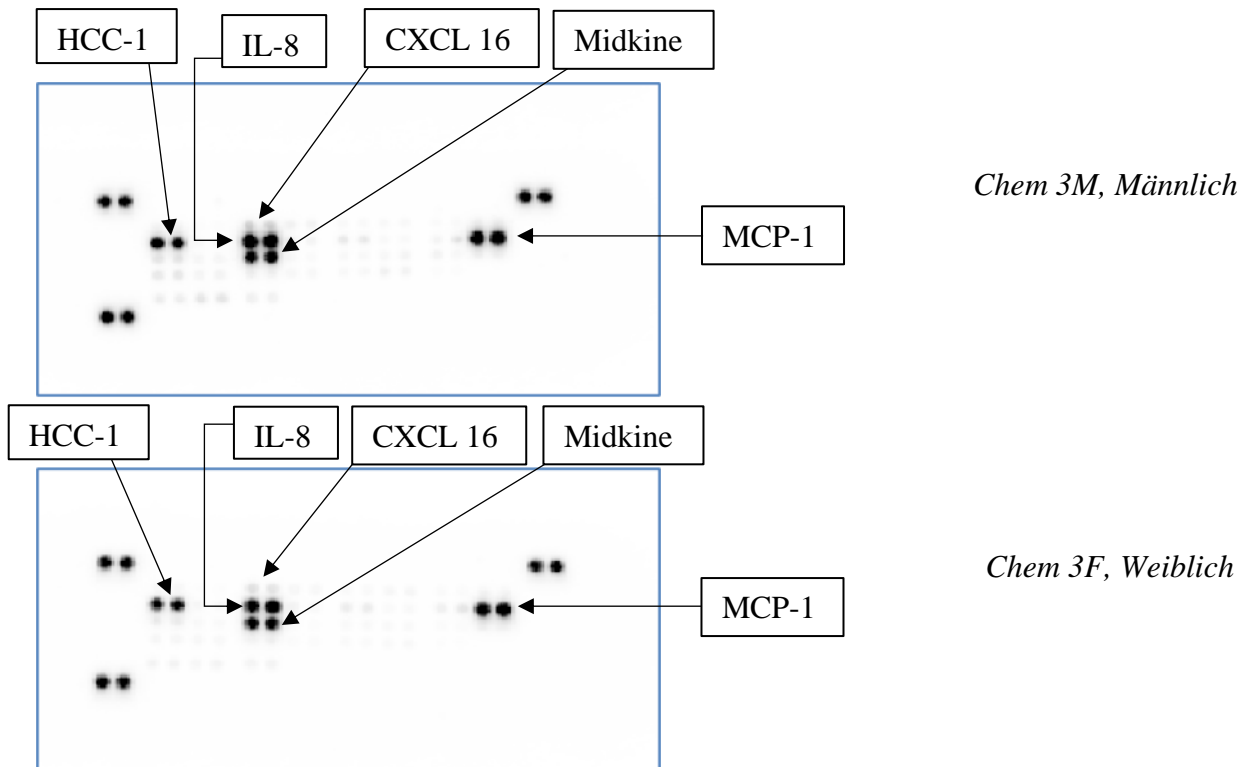


Abbildung 23: Sezernierte Chemokine nach Behandlung mit VEGF Membran Chem 3M (männlich) und Chem 3F (weiblich) aus Zellkulturüberständen mit Markierung sezernerter Chemokine. Pool aus 5 Zellkulturüberständen pro Geschlecht.

Nach VEGF-Behandlung konnten insgesamt fünf sezernierte Chemokine detektiert werden: HCC-1 (Hemofiltrate C-C Ligand Chemokin), IL-8 (Interleukin-8), CXCL 16 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 16), Midkine und MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (vergl. Tabelle 8). Dabei wurden alle Chemokine höher konzentriert in Überständen männlicher HUVEC nachgewiesen. Zwei Chemokine waren in den Überständen weiblicher Zellen im Vergleich zu den männlichen in wesentlich geringerer Konzentration vorhanden: CXCL 16 mit 60 % und IL-8 mit 57 %. Midkine, MCP-1 und HCC-1 waren in den Überständen männlicher Zellen moderat erhöht (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der Intensitäten sezernierter Chemokine zwischen männlichen und weiblichen HUVEC nach VEGF-Behandlung

<b>Koordinatenpaare zugeordneter Chemokine</b>	<b>Membran Chem3M (Männlich) Intensität (%)</b>	<b>Membran Chem 3F (Weiblich) Intensität (%)</b>
B7, B8 = CXCL 16	100	60
C3, C4 = HCC-1	100	75
C7, C8 = IL-8	100	57
C17, C18 = MCP-1	100	85
D7, D8 = Midkine	100	88

#### **4.4. Zusammenfassung aller Zytokin- und Chemokin-Auswertungen**

Insgesamt lässt sich feststellen, dass weibliche Zellen geringere Mengen an Zytokinen und Chemokinen in Zellkulturüberstände sezernieren als männliche. Dies trifft sowohl für unbehandelte HUVEC als auch für Behandlung mit VEGF zu. Intrazellulär wurden dagegen in unbehandelten weiblichen HUVEC höhere Zytokin- und Chemokin-Level gemessen als in männlichen.

Die nachfolgende Tabelle fasst alle Messungen identifizierter Proteine zusammen (Tabelle 9). Verglichen mit weiblichen Zellen wurden in Zellkulturüberständen männlicher un behandelter HUVEC eine größere Anzahl von Zytokinen und Chemokinen mit höheren Werten detektiert. Nur ein Chemokin (GRO- $\alpha$ ) lag im Überstand weiblicher un behandelter HUVEC in größerer Menge vor (Tabelle 9, 1. und 2. Spalte).

Intrazellulär enthielten dagegen un behandelte weibliche Zellen eine deutlich höhere Anzahl von Zytokinen und Chemokinen mit höheren Werten (Tabelle 9, 3. und 4. Spalte).

Nach VEGF-Behandlung wurden deutlich mehr Zytokine und Chemokine mit höheren Leveln in Zellkulturüberständen männlicher HUVEC gefunden (Tabelle 9, 5. und 6. Spalte). Von 6 detektierten Zytokinen wurden 4 Zytokine in höheren Mengen von männlichen HUVEC sezerniert (IL-8, MCP-1, GRO- $\alpha$ , IL-6). Die übrigen zwei detektierten Zytokine zeigten keinen Geschlechtsunterschied (MIF, Serpin E1). Alle 5 detektierten Chemokine wurden ebenfalls in höheren Mengen von männlichen HUVEC sezerniert.

Tabelle 9: Detaillierte Zusammenfassung der Zytokin- und Chemokin-Analysen

Zytokine und Chemokine	Zytokinarray		Chemokinarray		Zytokinarray		Chemokinarray		Zytokinarray		Chemokinarray	
	Zellkulturüberstände HUVEC unbehandelt		Zellkulturüberstände HUVEC unbehandelt		Zelllysate, HUVEC unbehandelt		Zelllysate, HUVEC unbehandelt		Zellkulturüberstände HUVEC nach VEGF		Zellkulturüberstände HUVEC nach VEGF	
	Pool aus 3 Überständen pro Geschlecht		Pool aus 3 Überständen pro Geschlecht		Pool aus 3 Zelllysaten pro Geschlecht		Pool aus 3 Zelllysaten pro Geschlecht		Pool aus 5 Überständen pro Geschlecht		Pool aus 5 Überständen pro Geschlecht	
	M %	F %	M %	F %	M %	F %	M %	F %	M %	F %	M %	F %
IL-8	100	34	100	81	100	124	100	135	100	80	100	57
MCP-1	100	25	100	83	100	85	100	152	100	86	100	85
GRO- $\alpha$			100	113	100	163	100	171	100	92		
Midkine							100	629			100	88
CXCL16											100	60
MIF					100	382			100	103		
Serpin E1					100	756			100	102		
IL-6					100	187			100	76		
sICAM-1					100	349						
IL-13					100	100						
HCC-1											100	75

Die männlichen Zellen (M) wurden 100 % gesetzt. Intensitätsunterschiede von 95% bis 105% wurden nicht als Geschlechtsunterschied definiert. Werte über bzw. unter diesen Grenzen wurden als Geschlechtsunterschied gewertet. Fettgedruckte blaue Zahlen zeigen höhere Werte in Zellkulturüberständen und Zelllysaten männlicher Zellen (M) an, fettgedruckte rote Zahlen zeigen höhere Werte in Zellkulturüberständen bzw. Zelllysaten entsprechend in weiblichen Zellen (F) an.

## 5. DISKUSSION

Sowohl bei Erkrankungen des Immunsystems als auch bei kardiovaskulären Erkrankungen spielen Zytokine und Chemokine eine bedeutsame Rolle. Da es bei beiden Erkrankungen Unterschiede zwischen Männern und Frauen gibt, sollten in dieser Arbeit geschlechtsspezifische Unterschiede in der Konzentration intrazellulärer und sezernierter Zytokine und Chemokine bei primären Endothelzellen untersucht werden. Endothelzellen sind einer der Hauptproduzenten von Zytokinen und Chemokinen. Daher spielt das Endothel im Prozess der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und Erkrankungen des Immunsystems eine wichtige Rolle. Die Chemokine stellen eine große Untergruppe der Zytokine dar. Durch ihre pleiotropen Eigenschaften begünstigen Zytokine inflammatorische und immunbedingte Prozesse oder hemmen diese. In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass intrazellulär in unbehandelten weiblichen HUVEC höhere Mengen an Zytokinen vorhanden sind als in männlichen. In Zellkulturüberständen hingegen wurden insgesamt höhere Zytokin-Mengen von männlichen Zellen sezerniert. Dies gilt sowohl für unbehandelte HUVEC als auch nach Behandlung mit VEGF.

Die Ursachen für geschlechtsspezifische Unterschiede sowohl bei kardiovaskulären wie auch bei Erkrankungen des Immunsystems werden bislang häufig den Geschlechtshormonen zugeschrieben. Mittlerweile gibt es Daten, dass Geschlechtsunterschiede nicht nur hormonell bedingt bestehen, sondern, dass es Geschlechtsunterschiede auf zellulärer Ebene gibt. Vorteile bei geschlechtsspezifischen Untersuchungen von HUVEC sind, dass die Zellen lediglich für die Dauer der Schwangerschaft unter mütterlichen Hormon- und Lebensstil-Einflüssen stehen. Auch nicht-hormonelle geschlechtsspezifische Umweltfaktoren (Lebensstil, Nebenerkrankungen, Risikofaktoren, Konzentration von Geschlechtshormonen), die die

zellulären Prozesse beeinflussen, werden aufgrund der Kürze der Schwangerschaft verringert. Daher lassen sich mit diesen Zellen sehr gut intrinsische Geschlechtsunterschiede untersuchen.

### **5.1. Die biologische Rolle von intra- und extrazellulären Zytokinen**

Zytokin-abhängige Effekte zeigen sich vor allem bei inflammatorischen Prozessen wie Autoimmunerkrankungen, Arteriosklerose oder Krebserkrankungen. Mit Ausnahme von Erythrozyten kann jede Zelle Zytokine produzieren oder auf Zytokine reagieren. Die meisten Zytokine sind lösliche Faktoren, die von Zellen sezerniert werden und zelluläre Mechanismen beeinflussen. Zur Pleiotropie trägt bei, dass einige Zytokine hingegen integralen Membranproteinen ähneln, die die Zelle nicht verlassen und intrazelluläre Signalkaskaden induzieren (Dinarello 2007). Zytokine werden in pro- und anti-inflammatorische Zytokine unterteilt und nach ihrer Rezeptorbindung mit der damit verbundenen intra- oder extrazellulären Wirkungsweise (Turner et al. 2014). Zur Komplexität trägt auch bei, dass einige Zytokin-Rezeptoren nur auf bestimmten Zellarten exprimiert werden (Dinarello 2007). In der Regel sind einzelne Zytokine Bestandteile von größeren Zytokin-Familien. Die TNF-Zytokin-Familie zum Beispiel enthält ca. 20 Mitglieder, die individuell durch verschiedene Gene kodiert werden und überlappende Funktionen aufweisen. Die IL-1-Familie besteht beispielsweise aus 11 Mitgliedern, darunter IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, die alle pro-inflammatorisch wirken. Zur Behandlung überschießender Zytokin-vermittelter Erkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Psoriasis, werden Anti-Zytokin-Therapien mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Adalimumab) eingesetzt, die bei diesen Erkrankungen zielgerichtet den inflammatorischen Effekten von TNF- $\alpha$  entgegenwirken (Dinarello 2007; Udalova et al. 2016). Es ist bekannt, dass Patienten mit chronischen Erkrankungen ein höheres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben. Wenn durch Anti-Zytokin-Therapien inflammatorische Effekte durch Mediatoren wie Prostaglandine, Nitratoxidase und ROS

reduziert werden, wird die Immunantwort bei chronischen Erkrankungen beeinflusst. Daher wirken Anti-Zytokin-Therapien sekundär kardioprotektiv (Steyers und Miller 2014). Die in der vorliegenden Arbeit detektierten intrazellulären und extrazellulären Zytokine werden im folgenden Abschnitt näher charakterisiert und in den Kontext geschlechtsspezifischer Unterschiede gestellt.

## **5.2. Zelluläre Funktionen detektierter intrazellulärer und sezernierter Zytokine**

### **I. Detektierte intrazelluläre Zytokine**

Intrazellulär wurden in dieser Arbeit die Zytokine IL-8, MCP-1, GRO- $\alpha$ , Midkine, MIF, Serpin E1, IL-6, sICAM-1 und IL-13 nachgewiesen. Dabei gab es den größten Geschlechtsunterschied für Serpin E1 und Midkine. Die Mehrheit der Zytokine lag in höheren Mengen in den Zelllysaten weiblicher HUVEC vor. Nur MCP-1 war bei männlichen HUVEC höher konzentriert. Die Funktionen einiger in den Arrays detektierter intrazellulärer Zytokine sind nachfolgend erläutert und mögliche Gründe für gefundene Geschlechtsunterschiede dargelegt. Da die meisten Zytokine extrazelluläre Funktionen besitzen, ist in der Literatur vergleichsweise wenig über Funktionen intrazellulärer Zytokine beschrieben. Daher konnten nicht alle in den Arrays detektierten intrazellulären Zytokine in Zusammenhang mit der in der Literatur beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschieden gestellt werden. Vielmehr wird von einer intrazellulären Speicherfunktion der Zytokine ausgegangen (van Mourik et al. 2002; Øynebråten et al. 2004; Tilstam et al. 2017; Lai et al. 2020).

### **II. Detektierte sezernierte Zytokine**

In Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC wurden die Proteine IL-8, MCP-1 und GRO- $\alpha$  detektiert. Die Konzentrationen von IL-8 und MCP-1 waren in Zellkulturüberständen männlicher Zellen höher als in weiblichen. Nach Behandlung mit VEGF nahm die Anzahl der extrazellulär detektierten Zytokine in den Zellkulturüberständen stark zu, sodass insgesamt 9



Proteine nachgewiesen werden konnten. Außer MIF und Serpin E1 waren die Konzentrationen der übrigen 7 Proteine (IL-8, MCP-1, GRO- $\alpha$ , Midkine, CXCL16, IL-6, HCC-1) in Zellkulturüberständen männlicher Zellen höher. Bei MIF und Serpin E1 konnten keine geschlechtsspezifischen Konzentrationsunterschiede festgestellt werden. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Funktionen der in den Arrays detektierten extrazellulären Zytokine diskutiert und in den Kontext geschlechtsspezifischer Unterschiede gestellt. In der Literatur wird das Zytokin HCC-1 eher in Verbindung mit dem hepatozellulären Karzinom gebracht und nicht im Zusammenhang mit der hier diskutierten Thematik. Daher wird HCC-1 in den folgenden Ausführungen nicht aufgeführt.

### **5.2.1. Makrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)**

#### **Intrazelluläre Funktionen von MIF**

In der vorliegenden Arbeit war das Zytokin MIF in den Zellen weiblicher unbehandelter HUVEC circa 4-fach höher konzentriert als in den männlichen. Allgemein kann MIF, anders als die meisten Zytokine, intrazellulär im Rahmen der Homöostase gespeichert werden. Durch die intrazelluläre Speicherfunktion kann eine schnelle Sekretion erfolgen, ohne vorherige de-novo-Synthese. MIF spielt nicht nur in Endothelzellen, sondern auch in Makrophagen, Blutplättchen und Epithelzellen eine Rolle (Lai et al. 2020). Intrazellulär hat MIF pluripotente Eigenschaften. Es moduliert die AP-1-Aktivität und den Zellzyklus durch die Interaktion mit im Zytosol befindlichem JAB-1 (Jun-Aktivations-Domänen-Bindungsprotein-1) (Lai et al. 2020). MIF begünstigt immunologische Funktionen und blockiert eine Glukokortikoid-bedingte Immunsuppression. Damit gehört es zu den pro-inflammatorischen Zytokinen (Calandra und Roger 2003). Eine Überexpression von MIF kann aber auch signifikant die p-53-abhängige Apoptose und die Stress-induzierte Apoptose supprimieren (Lai et al. 2020).

Intrazellulär wurde MIF in weiblichen HUVEC höher konzentriert detektiert. Wenn MIF eine intrazelluläre Speicherfunktion hat, so kann MIF möglicherweise von weiblichen

Zellen schneller sezerniert werden und pro-inflammatorisch wirken. Durch die Pleiotropie des Zytokins kann MIF aber auch apoptotische Vorgänge supprimieren, wodurch z.B. ein besseres Zellüberleben (Zellviabilität) bei weiblichen HUVEC erklärbar wäre, wofür es schon einige Hinweise gibt (Lorenz et al. 2015). Es wurden auch Geschlechtsunterschiede in der Apoptose bei Kardiomyozyten beobachtet. Weibliche Kardiomyozyten wiesen weniger Apoptosen nach einem Myokardinfarkt auf als männliche (Dunlay und Rogers 2012). Da MIF die Apoptose hemmt, könnte MIF auch bei Kardiomyozyten eine Rolle spielen und bei weiblichen Kardiomyozyten eine geringere Apoptoserate bewirken.

### **Extrazelluläre Funktionen von MIF**

In der vorliegenden Arbeit wurde MIF in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC nicht gefunden. In Zellkulturüberständen nach VEGF-Behandlung konnte MIF zwar detektiert werden, jedoch zeigte sich dabei kein Geschlechtsunterschied.

MIF wird von nahezu allen Immunzellen, sowie auch von Epithel- und Endothelzellen, Kardiomyozyten und Adipozyten exprimiert (Hansson et al. 2015). Einige Studien fanden heraus, dass MIF den Prozess der Plaque-Ruptur beim akuten Koronarsyndrom initiiert und dafür auch als Biomarker im Serum gemessen werden kann (Tilstam et al. 2017). Hohe Plasmakonzentrationen von MIF korrelieren mit Plaque-Ruptur bei Patienten mit ACS und sind andererseits mit erhöhten Konzentrationen von CRP, IL-6 und Troponin-I (der myokardiale Nekrose-Marker) assoziiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MIF bei allen Schritten der Arteriosklerose eine Rolle spielt (Initiation, Progression, Ruptur von arteriosklerotischen Plaques). Dabei basiert die Wirkung von MIF auf der Adhäsion von Monozyten an das Endothelium und korreliert mit der Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1 (Tilstam et al. 2017).

Ein Grund für die Nicht-Detektion von MIF in Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC könnte auf das Fehlen pro-inflammatorischer Stimuli zurückzuführen sein. Die

Sekretion von MIF wird durch verschiedene pro-inflammatorische Stimuli getriggert. Daher steht die Konzentration von im Blut zirkulierendem MIF im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom, Infektionskrankheiten und auto-inflammatorischen Erkrankungen (Tilstam et al. 2017).

Da in Zellkulturüberständen nach VEGF-Behandlung MIF detektiert werden konnte, liegt es nahe, dass VEGF durch eine Erhöhung der endothelialen Permeabilität und der Induktion von Adhäsionsproteinen die Sekretion von MIF stimuliert haben könnte (Camaré et al. 2017). Geschlechtsunterschiede in der MIF-Konzentration in Zellkulturüberständen VEGF-behandelter HUVEC konnten jedoch nicht festgestellt werden, sodass unklar bleibt, welche geschlechtsspezifischen Funktionen MIF in Endothelzellen hat.

### **5.2.2. Interleukin- 6 (IL-6)**

#### **Intrazelluläre Funktionen von IL-6**

In der vorliegenden Arbeit war IL-6 in Zelllysaten weiblicher unbehandelter HUVEC in doppelter Konzentration im Vergleich zu männlichen Zellen vorhanden. Allgemein wirkt IL-6 sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch und ist in der Pathogenese aller inflammatorischen Erkrankungen involviert. Die Produktion von IL-6 wird durch zahlreiche Stimuli wie Stresshormone, andere Zytokine und Erkennung pathogener Mikroorganismen durch Toll-like-Rezeptoren induziert (Verboogen et al. 2019). Der IL-6-Rezeptor besteht aus IL-6-Rezeptor- $\alpha$  (IL-6RA) und dem Glykoprotein gp130, der für die Signaltransduktion verantwortlich ist (Schaper und Rose-John 2015). Leukozyten (Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen), die IL-6 produzieren, synthetisieren auch IL-6RA, was eine autokrine Sekretion ermöglicht (Verboogen et al. 2019). IL-6 wird im Zytoplasma in Endosomen zu Zellmembranrezeptoren transportiert. Dort bindet IL-6 an IL-6RA bevor es sezerniert wird. Das extrazelluläre IL-6 kann auf derselben Zelle an IL-6RA binden, wird dabei endosomal aufgenommen und gespeichert. Das in Endosomen gespeicherte IL-6 aktiviert den

intrazellulären pY-STAT3-Signalweg, welcher als negativer Feedback die Transkription von IL-6 inhibiert (Verboogen et al. 2019). Die intrazelluläre Eigenhemmung der IL-6-Synthese durch den IL-6-Signalweg limitiert die exzessive Produktion von IL-6 und damit eine Gewebeschädigung zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis (Schulte et al. 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten bedeuten, dass weibliche HUVEC zwar eine höhere IL-6-Menge speichern, jedoch geringere IL-6 Mengen an die Umgebung abgeben, um pro-inflammatorischen Effekten entgegen zu wirken. Tatsächlich enthalten Zellkulturüberstände männlicher HUVEC eine höhere IL-6 Konzentration als weibliche. Dies könnte dafürsprechen, dass männliche HUVEC eine geringere Ausprägung des negativen Feedback Mechanismus aufweisen. In diesem Zusammenhang ist die Studie von Oettel et al. zu erwähnen, die zeigte, dass weibliche HUVEC eine stärkere Umwandlung von mütterlichen T-Zellen in regulatorische T-Zellen (Treg) induzieren als männliche, was zu einer immunologischen Toleranz beitragen könnte (Oettel et al. 2016). Die immunologische Toleranz spielt vor allem in der Schwangerschaft eine bedeutende Rolle. Dabei ist eine kontrollierte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen zum Schutz vor einer Abstoßungsreaktion des Fetus unerlässlich (Yockey und Iwasaki 2018). Der Mechanismus der Eigenhemmung könnte daher auch bei HUVEC eine Rolle spielen, da sie als Zellen der Nabelschnurgefäße als erste auf mütterliche Antigene treffen. Unterbleibt der negative Feedback Mechanismus könnte dies zu einer exzessiv gewebschädigenden Zytokin-Produktion führen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Konsequenzen des gefundenen Geschlechtsunterschieds der intrazellulären IL-6 Konzentration besser zu verstehen.

### **Extrazelluläre Funktionen von IL-6**

Als extrazelluläres Zytokin wurde IL-6 in dieser Arbeit in den Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC nicht detektiert. Grund dafür könnte sein, dass basal keine inflammatorischen Prozesse vorhanden waren, die die Sekretion stimulieren. Andere Zytokine, die die IL-6 Sekretion fördern, waren jedoch in den Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC vorhanden. Nach VEGF-Behandlung dagegen lag IL-6 in Zellkulturüberständen von HUVEC beider Geschlechter vor und war in höherer Konzentration in Überständen männlicher Zellen vorhanden. Möglicherweise ist VEGF daher ebenfalls ein Stimulator für die IL-6 Sekretion.

IL-6 bewirkt eine hepatische Stimulation der Synthese von Akute-Phase-Proteinen, eine Aktivierung von Endothelzellen, eine Steigerung der Koagulation, sowie die Proliferation von Lymphozyten (Hartman und Frishman 2014). Bindet IL-6 an Endothelzellen, werden Chemokine freigesetzt und die Expression von ICAM-1 wird erhöht. Dadurch werden Leukozyten rekrutiert. Neben Stresshormonen und anderen Zytokinen wird IL-6 vor allem als Folge von Infektionen (Sepsis, Atemwegsinfektionen) sezerniert (Hartman und Frishman 2014; Verboogen et al. 2019). Grund dafür ist die Reaktion von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) auf pathogene Mikroorganismen. Daher werden akute Atemwegsinfektionen auch mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkte in Verbindung gebracht. Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis werden hohe IL-6-Konzentrationen im Serum und in der Synovialflüssigkeit beobachtet (Hartman und Frishman 2014). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um potentielle Geschlechtsunterschiede detaillierter nachzuweisen.

### **5.2.3. Interleukin-8 (IL-8)**

#### **Intrazelluläre Funktionen von IL-8**

Intrazellulär wurde IL-8 in der vorliegenden Arbeit in höheren Mengen in weiblichen HUVEC detektiert (100% in M, 124% in F). In Endothelzellen wird IL-8 zusammen mit anderen

Proteinen wie P-Selectin, Endothelin und vWF (von-Willebrand-Faktor), der bei der Adhäsion und Thrombozytenaggregation nach Gefäßverletzungen eine wichtige Rolle spielt, in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. Durch inflammatorische Stimulation werden diese Proteine durch Fusion der Weibel-Palade-Körperchen mit der Zellmembran nach extrazellulär transportiert. Dabei stimulieren Stress, Histamin und Thrombin die IL-8 Produktion, was zu einer Rekrutierung von Leukozyten führt (Øynebråten et al. 2004; Li et al. 2005). Da Weibel-Palade-Körperchen IL-8 nur in Anwesenheit von vWF speichern (van Mourik et al. 2002) und alle Endothelzellen vWF exprimieren, war zu erwarten, dass IL-8 intrazellulär in HUVEC detektiert wurde. In Zelllysaten weiblicher HUVEC war die IL-8 Konzentration höher als in männlichen Zellen. Dadurch könnte als Reaktion auf inflammatorische Stimuli eine schnellere und stärkere IL-8 Sekretion durch weibliche Zellen erfolgen.

### **Extrazelluläre Funktionen von IL-8**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HUVEC IL-8 in den Zellkulturüberstand sezernieren. Dabei war die IL-8-Konzentration sowohl bei unbehandelten als auch bei VEGF-behandelten HUVEC in den Überständen männlicher Zellen höher als in den weiblichen.

Bei der Inflammation ist IL-8 für die Proliferation und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten verantwortlich (Casimir et al. 2010). IL-8 bindet dabei hauptsächlich an inflammatorische Zellen, die die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 exprimieren (Kany et al. 2019). IL-8 wird von vielen Zellen wie Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten produziert (Lefèvre et al. 2012). Außerdem wird die IL-8-Produktion durch andere Zytokine wie Midkine stimuliert (Aynacıoğlu et al. 2019). Des Weiteren ist mittlerweile bekannt, dass IL-8 autokrin (also auf die sezernierende Zelle selbst), wirkt, wodurch es die endotheliale Zellproliferation, Migration und Angiogenese fördert (Li et al. 2005). Auffällig ist, dass das Zytokin MCP-1 immer zusammen mit IL-8 in allen

Zellkulturüberständen detektiert wurde. Da MCP-1 ebenfalls die Angiogenese fördert (Deshmane et al. 2009), könnte es auf Endothelzellen eine parakrine Wirkungsweise haben, wodurch die IL-8-Sekretion stimuliert wird. So wäre zu erklären, dass die höheren MCP-1 Konzentrationen in Zellkulturüberständen männlicher HUVEC eventuell auch die höheren IL-8-Konzentrationen bedingen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten weitere Untersuchungen zur Auswirkung von MCP-1 auf die IL-8 Sekretion erfolgen.

#### **5.2.4. Midkine**

##### **Intrazelluläre Funktionen von Midkine**

In der vorliegenden Arbeit lag die Midkine-Konzentration in Zelllysaten weiblicher unbehandelter HUVEC mehr als 6-fach über der Konzentration der männlichen. Midkine haben im Zusammenhang mit LRP (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein) intrazelluläre Funktionen. Dabei vermittelt LRP1 die Endozytose von Midkine. Im Zellkern bewirkt Midkine anti-apoptotische Effekte (Shibata et al. 2002). Da die Midkine-Konzentration in der vorliegenden Arbeit in Zelllysaten weiblicher unbehandelter HUVEC deutlich höher war als in männlichen, kann diskutiert werden, ob anti-apoptotische Effekte in weiblichen HUVEC stärker ausgeprägt sind als in männlichen. Midkine könnte zum Beispiel dazu beitragen, dass weibliche Zellen allgemein resistenter und widerstandsfähiger sind und dadurch weniger Apoptose aufweisen als männliche. In der Literatur sind dazu bereits Hinweise bekannt. Einerseits wurde eine höhere Zellviabilität von weiblichen HUVEC gegenüber männlichen nach Serumentzug beschrieben (Lorenz et al. 2015). Dies könnte für eine bessere Widerstandsfähigkeit weiblicher HUVEC sprechen. Andererseits wiesen in klinischen Studien andere Zellen von Frauen wie Kardiomyozyten nach einem stattgehabten Myokardinfarkt weniger Apoptosen im Vergleich zu Herzmuskelzellen von Männern auf (Dunlay und Roger 2012), wodurch Kardiomyozyten von Frauen resistenter gegenüber den Auswirkungen eines Myokardinfarktes beschrieben werden könnten.

## **Extrazelluläre Funktionen von Midkine**

In der vorliegenden Arbeit wurde Midkine in Zellkulturüberständen von unbehandelten HUVEC nicht detektiert. Nach VEGF-Behandlung jedoch konnte Midkine in Zellkulturüberständen männlicher HUVEC vermehrt nachgewiesen werden.

Midkine stellt einerseits eines der wichtigsten Zytokine in der Progression von Immunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematosus (SLE), Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dar. Die Midkine-Konzentrationen bei gesunden Erwachsenen sind dahingegen sehr niedrig. Andererseits hat dieses Zytokin vor allem bei malignen und inflammatorischen Prozessen wichtige Funktionen. Als pro-inflammatorisches Zytokin beeinflusst es chronische Entzündungen via Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die das Gewebe infiltrieren (Aynacıoğlu et al. 2019). Außerdem stimuliert Midkine die Produktion weiterer inflammatorischer Mediatoren wie IL-6 und IL-8. Wie die meisten Zytokine, bindet Midkine an Zelloberflächenrezeptoren der Zielzellen und initiiert Signalkaskaden durch die Aktivierung von Kinasen. Im Allgemeinen fördert es in Zielzellen die Migration, Proliferation, Wachstum, Reproduktion, Angiogenese und Genexpression (Aynacıoğlu et al. 2019). Dadurch spielt Midkine vor allem auch bei der Embryogenese eine wichtige Rolle und die Midkine-Level sind während der Embryogenese erhöht. Auch der Wachstumsfaktor VEGF ist bei der Embryogenese vor allem für die Gefäßentwicklung unerlässlich (Aynacıoğlu et al. 2019).

Da Midkine und VEGF vor allem bei der Embryogenese und Migration eine Rolle spielen, könnte anzunehmen sein, dass Zusammenhänge zwischen Midkine und VEGF auch bei HUVEC bestehen. Aus vorliegenden Ergebnissen über eine stärkere Migration von weiblichen HUVEC nach VEGF (Lorenz et al. 2019), könnte eine höhere extrazelluläre Midkine-Konzentration in Zellkulturüberständen weiblicher VEGF-behandelter HUVEC zu erwarten sein. Allerdings zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine leicht höhere



Konzentration bei männlichen Zellen. Aus diesem Grund kann ein Zusammenhang zwischen Midkine und VEGF auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht belegt werden.

Jedoch wird die Annahme, dass Zusammenhänge zwischen Midkine und VEGF bei Zytokin-vermittelten Prozessen bestehen, in der Literatur erhärtet (Ghazali et al. 2017, Christou et al. 2019). Frauen leiden häufiger an SLE (Christou et al. 2019), bei der Midkine eine wichtige Rolle bei der Progression der Erkrankung spielt (Aynacıoğlu et al. 2019). Auch sind die Plasmalevel von VEGF bei SLE-Patienten erhöht (Ghazali et al. 2017). Daher wären auch aus diesem Grund höhere extrazelluläre Midkine-Konzentrationen in Überständen weiblicher VEGF-behandelter HUVEC zu erwarten, was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt werden konnte.

#### **5.2.5. Growth Regulated Alpha-Protein (GRO- $\alpha$ )**

##### **Intrazelluläre Funktionen von GRO- $\alpha$**

Intrazellulär wurde GRO- $\alpha$  in der vorliegenden Arbeit in den Zelllysaten beider Arrays (Chemokine und Zytokine) detektiert. Dabei war es in Zelllysaten weiblicher HUVEC deutlich höher konzentriert als in männlichen. GRO- $\alpha$  (Synonym CXCL1) ist ein Polypeptid, welches erstmals aus humanen Melanomzellen isoliert wurde. Über physiologische Funktionen von GRO- $\alpha$  ist bislang wenig bekannt. Pathophysiologisch spielt dieses Zytokin vor allem bei Arteriosklerose und bei verschiedenen Krebsarten wie zum Beispiel beim malignen Melanom eine Rolle. Mittlerweile ist bekannt, dass es zu den chemotaktischen Zytokinen gehört und für die Leukozytenrekrutierung im Rahmen der Inflammation verantwortlich ist (Lo et al. 2014). GRO- $\alpha$  wird zusammen mit MCP-1 intrazellulär in kleinen Vesikeln gespeichert, sodass eine kontrollierte Ausschüttung (ähnlich der IL-8- Sekretion) auch für diese beiden Zytokine erfolgt. Diese Vesikel speichern auch die antikoagulatorischen Proteine Tissue Factor Pathway Inhibitor, Protein S und t-PA (Tissue-type Plasminogen Activator). Weibel-Palade-Körperchen hingegen speichern prokoagulatorische Faktoren (Factor XIIIa und Factor VIII). Außerdem

fusionieren die Vesikel deutlich schneller mit der Zellmembran als die Weibel-Palade-Körperchen. Daher werden MCP-1 und GRO- $\alpha$  schneller sezerniert als IL-8 (Øynebråten et al. 2004). Durch die Speicherfunktion von GRO- $\alpha$  kann davon ausgegangen werden, dass weibliche HUVEC mehr GRO- $\alpha$  speichern und schneller sezernieren als männliche.

Die endotheliale Synthese von GRO- $\alpha$  wird durch TNF und andere Zytokine über verschiedene Signalwege getriggert (Lo et al. 2014). Da in weiblichen HUVEC höhere intrazelluläre Zytokinkonzentrationen gemessen wurde als in männlichen, und die endotheliale GRO- $\alpha$ -Synthese von TNF und anderen Zytokinen (ähnlich eines positiven Feedback-Mechanismus) getriggert wird, könnte dies für die höhere intrazelluläre GRO- $\alpha$ -Konzentration in weiblichen HUVEC verantwortlich sein. Welche Effekte die höheren GRO- $\alpha$ -Konzentrationen in weiblichen HUVEC haben, muss letztendlich weiter untersucht werden.

### **Extrazelluläre Funktionen von GRO- $\alpha$**

In Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC lag eine höhere GRO- $\alpha$  Konzentration bei weiblichen Zellen vor. Bei koronaren Herzerkrankungen steht bei Männern pathogenetisch die Ausbildung arteriosklerotischer Plaques und bei Frauen die endotheliale Dysfunktion im Vordergrund (Baker et al. 2018; Schmidt et al. 2018). Da GRO- $\alpha$  die endotheliale Dysfunktion beschleunigt, hätte man höhere GRO- $\alpha$  Konzentrationen in den Überständen weiblicher HUVEC vermuten können, was auch bestätigt wurde. Durch die pro-inflammatorischen Eigenschaften von GRO- $\alpha$  begünstigt es eine endotheliale Dysfunktion durch oxidativen Stress und Downregulation von eNOS (Bechara et al. 2007). Durch ROS erhöht sich die Expression inflammatorischer Gene, was zu einer Verminderung der eNOS-Aktivität führt (Yuan et al. 2019). Durch Entkopplung von eNOS entsteht Superoxid, was das Endothel schädigt und die Entwicklung der Arteriosklerose beschleunigt (Pascali et al. 2014; Li et al. 2015). Cattaneo et al. zeigten, dass weibliche Endothelzellen eine höhere eNOS-Expression und NO-Produktion aufweisen als männliche (Cattaneo et al. 2017). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt,

dass HUVEC auch ohne Exposition mit Risikofaktoren oder hormonellen Einflüssen GRO- $\alpha$  sezernieren. Da GRO- $\alpha$  aber bei beiden Geschlechtern die Pathogenese der Arteriosklerose begünstigt (Kleiner et al. 2013), ist der gemessene Geschlechtsunterschied eher gering (Differenz von 13 %).

In Zellkulturüberständen VEGF-behandelter HUVEC wurde hingegen eine geringere GRO- $\alpha$  Konzentration bei den weiblichen HUVEC gemessen. Dies verdeutlicht und zeigt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Reaktion auf bestimmte Stimuli wie VEGF gibt. Welche Bedeutung geringere GRO- $\alpha$  Level in Zellkulturüberständen weiblicher HUVEC nach VEGF hat, muss weiter untersucht werden.

#### **5.2.6. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)**

##### **Intrazelluläre Funktionen von MCP-1**

In der vorliegenden Arbeit zeigten die intrazellulären MCP-1-Messungen keine eindeutigen Geschlechtsunterschiede. Im Chemokinarray war die MCP-1 Konzentration in Zelllysaten weiblicher unbehandelter HUVEC höher, wohingegen sie im Zytokinarray bei männlichen höher war.

MCP-1 ist eines der wichtigsten Chemokine in der Regulation der Migration und Infiltration von Monozyten/Makrophagen. Neben Endothelzellen produzieren Fibroblasten, Epithelzellen, glatte Muskelzellen sowie viele weitere Zellen MCP-1, was eine Migration von Monozyten aus dem Blut zum Endothel stimuliert (Deshmane et al. 2009). Intrazellulär hat MCP-1 vor allem eine Speicherfunktion, wobei die Speicherung in kleinen Vesikeln zusammen mit antikoagulatorischen Proteinen und dem Zytokin GRO- $\alpha$  erfolgt. Durch die Speicherung kann die Ausschüttung dieser Proteine kontrolliert erfolgen (Øynebråten et al. 2004). Da MCP-1 zusammen mit GRO- $\alpha$  gespeichert wird (und GRO- $\alpha$  in weiblichen Zelllysaten deutlich höher konzentriert vorlag), könnte man davon ausgehen, dass weibliche HUVEC auch höhere MCP-1-Mengen speichern. In der Literatur sind bislang keine geschlechtsspezifischen

Unterschiede in der intrazellulären MCP-1-Konzentration in Endothelzellen bekannt, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind, um neben der Speicherfunktion mögliche intrazelluläre MCP-1-Funktionen aufzuzeigen.

### **Extrazelluläre Funktionen von MCP-1**

In der vorliegenden Arbeit konnte das Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) sowohl in Zellkulturüberständen unbehandelter als auch VEGF-behandelter HUVEC detektiert werden. Dies zeigt, dass MCP-1 sowohl ohne als auch mit VEGF von HUVEC in das Medium sezerniert wird. In den Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC war ein großer Geschlechtsunterschied feststellbar (100 % bei M, 25 % bei F im Zytokinarray und 100 % bei M, versus 83 % bei F im Chemokinarray). Nach VEGF war dieser Unterschied gering, aber immer noch konsistent vorhanden.

Eine Chemokin-vermittelte Migration inflammatorischer Zellen durch MCP-1 spielt bei der Pathogenese der Arteriosklerose und dem daraus resultierenden Myokardinfarkt sowie bei anderen inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle (Arakelyan et al. 2005). Arakelyan et al. untersuchten die MCP-1 Konzentrationen im Serum gesunder Probanden und bei Patienten mit Schlaganfall und Myokardinfarkt. Dabei waren die Serumkonzentrationen von MCP-1 bei Schlaganfallpatienten und bei Patienten mit Myokardinfarkt höher als bei gesunden Probanden. Die Ergebnisse zeigen, dass MCP-1 bei KHK oder allgemein bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielt (Arakelyan et al. 2005). Dies konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden, die erhöhte MCP-1-Konzentration auch bei Patienten mit Aortenstenose nachwies (Yousefzadeh et al. 2018). Beide Autoren schlossen in ihren Studien aus, dass andere Faktoren (kardiovaskuläre Risikofaktoren, Hormone, Alter) für die erhöhten Level von MCP-1 verantwortlich sind. Ob das Geschlecht eine Rolle für die unterschiedlichen MCP-1-Konzentrationen spielt, wurde in beiden Studien nicht untersucht.

Es stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus die MCP-1-Sekretion von HUVEC

in der vorliegenden Arbeit stimuliert wurde und weshalb vor allem bei unbehandelten HUVEC ein großer Geschlechtsunterschied festzustellen war. Auffällig ist, dass MCP-1 sowohl bei unbehandelten HUVEC als auch nach VEGF immer zusammen mit IL-8 sezerniert wurde (siehe Tabelle 9). Dies spricht dafür, dass IL-8 neben der bekannten autokrinen Wirkung (Li et al. 2005) möglicherweise durch eine parakrine Wirkungsweise die MCP-1-Sekretion stimuliert haben könnte. Da IL-8 ebenfalls pro-inflammatorisch wirkt (Casimir et al. 2010), könnte es, durch einen positiven Feedback-Mechanismus, die MCP-1-Sekretion induziert haben. In der vorliegenden Arbeit haben männliche HUVEC eine stärkere MCP-1-Sekretion als weibliche. Da MCP-1 vor allem bei der KHK eine Rolle spielt, könnte dies zum Teil eine Erklärung liefern, dass Männer häufiger an Myokardinfarkt erkranken als gleichaltrige Frauen (Kander et al. 2017).

### **5.2.7. Serpin E1**

#### **Extrazelluläre Funktionen von Serpin E1**

In der vorliegenden Arbeit konnte Serpin E1 (Synonym: Plasminogen-Activator-Inhibitor-1, PAI-1) in Zellkulturüberständen VEGF-behandelter HUVEC detektiert werden. Dabei konnte kein Geschlechtsunterschied in der sezernierten Serpin-E1-Menge festgestellt werden. In Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC wurde Serpin E1 nicht gefunden.

Serpin E1 ist bei Endothelzellen ein wichtiger Mediator der Angiogenese und fördert bei Krebspatienten die Tumorprogression. Es gibt Hinweise dafür, dass dieser Mechanismus durch die Serpin E1-abhängige Hemmung der Apoptose gesteuert wird. Daher liegt nahe, dass Serpin E1 ein Ziel für antiangiogene und antivaskuläre Therapien sein könnte (Bajou et al. 2008). In Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC konnte in der vorliegenden Arbeit keine Sekretion von Serpin E1 festgestellt werden. Nach VEGF wurde eine Serpin E1-Sekretion nachgewiesen, jedoch wurden keine Geschlechtsunterschiede gefunden. Daher müssen weitere

Untersuchungen folgen, um eine mögliche Rolle von VEGF bei der Serpin E1-Sekretion zu verstehen und potentielle Geschlechtsunterschiede zu begründen.

### **5.2.8. CXC Chemokine Ligand 16 (CXCL16)**

#### **Extrazelluläre Funktionen von CXCL16**

Das Zytokin CXCL16 wurde in der vorliegenden Arbeit in höheren Mengen in Zellkulturüberständen männlicher HUVEC nach Behandlung mit VEGF detektiert. In Zellkulturüberständen unbehandelter HUVEC lag es dagegen nicht vor.

CXCL16 ist bei den inflammatorischen Prozessen der Arteriosklerose beteiligt (Hofnagel et al. 2011; Gencer et al. 2021; Korbecki et al. 2021). In einer Studie an HUVEC konnte gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Expression von CXCL16 auf Endothelzellen erhöhen. CXCL16 trägt neben vielen weiteren Zytokinen und Faktoren bei der Entstehung arteriosklerotischer Plaques zur Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen bei (Gencer et al. 2021; Korbecki et al. 2021). Außerdem spielt CXCL16 in der Angiogenese eine Rolle und stellt daher bei HUVEC ein wichtiges Zytokin in der Proliferation und Migration dar (Zhuge et al. 2005). Lorenz et al untersuchten geschlechtsspezifische Unterschiede in der Migration von HUVEC. Dabei konnte festgestellt werden, dass weibliche HUVEC nach Behandlung mit VEGF eine bessere Migrationsfähigkeit aufwiesen als männliche (Lorenz et al. 2019). Da CXCL16 auch bei der Migration eine Rolle spielt (Gencer et al. 2021), wäre anzunehmen, dass in Zellkulturüberständen weiblicher HUVEC eine höhere CXCL16 Konzentration nach Behandlung mit VEGF vorliegt. In den Messungen der vorliegenden Arbeit lag CXCL16 nach VEGF jedoch in circa doppelt so hoher Konzentration in Überständen männlicher HUVEC vor.

Möglichweise ist der Zusammenhang von VEGF und der CXCL16 Konzentration zu monokausal, da es neben CXCL16 viele andere Mediatoren, wie MCP-1 (Deshmane et al. 2009), VEGF (Wang et al. 2011; Salajagheh 2016) und IL-8 (Li et al. 2005) gibt, die bei der

Migration wichtige Funktionen haben. Aus diesem Grund kann der Einfluss eines einzelnen Zytokins auf den Geschlechtsunterschied in der Migration schwer beurteilt werden. Dafür müssten weitere Analysen erfolgen, um ein Zusammenspiel mehrerer Zytokine auf die Migration detaillierter zu untersuchen.

### **5.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Zytokinsekretion im Blut**

Bislang wurden nur wenige Studien zu geschlechtsspezifischen Unterschieden sezernierter Zytokine und Chemokine im Blut veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe von Von Aulock et al. untersuchte Unterschiede der Zytokinsekretion im Blut weiblicher und männlicher Probanden nach Immunstimulation mit LPS (Lipopolysacchariden) oder LTA (Lipoteichonsäure). Das Blut männlicher Probanden enthielt nach Stimulation mit hoch-konzentriertem LPS oder LTA signifikant mehr IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, als das Blut weiblicher Spender (Von Aulock et al. 2006).

Interessanterweise existieren auch Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen im Blut schwangerer Frauen, die vom Geschlecht des Fetus abhängig sind (Mitchell et al. 2017). Blut von 80 Frauen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (am Anfang, in der Mitte und am Ende der Schwangerschaft) entnommen. Dabei wurden sowohl im nicht-behandelten wie auch im mit LPS-stimulierten Blut die Serumkonzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  gemessen. Im Vergleich zu Blut von Frauen mit männlichem Fetus, zeigte das LPS-stimulierte Blut von Frauen mit weiblichem Fetus eine erhöhte Produktion von IL-6 zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft. TNF- $\alpha$  war hingegen nur zum Anfang der Schwangerschaft erhöht und IL-1 $\beta$  in der Mitte- und der Spät-Schwangerschaft. Es ist bekannt, dass sich die Symptome einiger Erkrankungen (z.B. Asthma bronchiale) in der Schwangerschaft verschlimmern. Dabei ist der Schweregrad der Symptome häufig abhängig vom Geschlecht des Fetus. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass das fetale

Geschlecht die Zytokinproduktion beeinflusst und damit unterschiedlich auf die Gesundheit der Mutter und die fetale Entwicklung einwirkt (Mitchell et al. 2017). Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf die Bedeutung des Geschlechts bei der Bestimmung der Zytokin- und Chemokin-Spiegel im Blut hin. Bei der Bestimmung von Zytokinen im Blut spielen neben anderen Faktoren der zirkadiane Rhythmus eine große Rolle (Cardinali et al. 2008; Lange et al. 2010; Bhatia et al. 2014; Herr et al. 2017). So hängt die Produktion von Zytokinen vom zirkadianen Rhythmus ab, weshalb sich im Blut gemessene Zytokinkonzentrationen zu verschiedenen Tageszeiten ändern. Die Konzentration vom pro-inflammatorischen Interleukin-12 (IL-12) ist nachts höher als tagsüber und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird am Tage mehr produziert als nachts (Lange et al. 2010). Da der zirkadiane Rhythmus und der nächtliche Schlaf das endokrine System beeinflussen, kann die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen zur Nachtzeit induziert werden (Lange et al. 2010). Aufgrund des zirkadianen Rhythmus sollte bei der Bestimmung von Zytokinen im Blut die Blutentnahme bei jedem Probanden zeitgleich erfolgen.

#### **5.4. HUVEC als Zellkulturmodell zur Untersuchung von geschlechtsspezifischen Unterschieden**

##### **5.4.1. Vorteile von HUVEC bei der Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede**

In der kardiovaskulären Grundlagenforschung werden in großem Umfang HUVEC verwendet (Jiménez et al. 2013; Kocherova et al. 2019; Hartman et al. 2020). Der Vorteil von HUVEC-Zellen ist, dass sie zahlreiche Endothelmarker und Signalmoleküle exprimieren, die bei der Regulation der vaskulären Homöostase von Bedeutung sind. Darüber hinaus reagieren sie auf zahlreiche physiologische und pathophysiologische Stimuli wie hohe Glukosekonzentrationen, LPS oder Shear-Stress. Aufgrund der Möglichkeit HUVECs in 3D-Spheroïden darzustellen und sie mit anderen Zellen zu ko-kultivieren, besteht die Möglichkeit, die Zell-Zell-Kommunikation



von HUVEC mit anderen Zellen zu untersuchen (Kocherova et al. 2019). Da es sich um venöse Zellen handelt, muss beachtet werden, dass die hohe Sauerstoffkonzentration in venösen Nabelschnurgefäßen zelluläre Funktionen wie Proliferation und Chemotaxis beeinflusst (Franconi et al. 2017).

Die in der Literatur beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschiede in HUVEC sind in den folgenden Abschnitten den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt.

#### **5.4.2. Unterschiede von männlichen und weiblichen Endothelzellen bei der Migration**

Die Arbeitsgruppe von Addis et. al untersuchte geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen HUVEC in der Zellproliferation, Migration und Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase 3 (eNOS). Dabei war die Expression von eNOS bei weiblichen HUVEC höher als bei männlichen. Daneben wiesen weibliche HUVEC eine geringere Autophagie-Neigung auf. Auch die Zellproliferation und die Migration waren bei weiblichen HUVEC ausgeprägter als bei männlichen (Addis et al. 2014). Die in der vorliegenden Arbeit detektierten sezernierten Zytokine CXCL16, MCP-1 und IL-8 spielen eine Rolle bei der Migration und es wurden geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt. Jedoch wurden alle drei Zytokine nach VEGF in höheren Mengen von männlichen HUVEC sezerniert (siehe Tabelle 9), was eher auf eine bessere Migrationsfähigkeit männlicher Zellen hindeuten würde. Da aber auch das Zytokin Midkine (Aynacioglu et al. 2019), der Wachstumsfaktor VEGF (Wang et al. 2011; Salajegheh 2016) sowie viele weitere Faktoren wie autokrine Wirkungsmechanismen von Zytokinen (Li et al. 2019) und inflammatorische Prozesse (Arakelyan et al. 2005) die Migration beeinflussen, ist davon auszugehen, dass geschlechtsspezifische Unterschiede höchstwahrscheinlich durch ein Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Faktoren entstehen.

### **5.4.3. Geschlechtsunterschiede in der zellulären Reaktion auf Stress und Regulation der Apoptose bei HUVEC**

Eine aktuelle Studie von Cattaneo et al. untersuchte das Sekretom humaner männlicher und weiblicher HUVEC nach Serumreduktion. Dabei wurde im Medium männlicher Endothelzellen eine signifikante Anreicherung von Proteinen beobachtet, die mit zellulären Reaktionen auf Stress sowie mit der Regulation der Apoptose in Zusammenhang stehen (Cattaneo et al. 2021). Als Reaktion auf Serumentzug trat bei einem höheren Anteil der männlichen Zellen im Vergleich zu den weiblichen eine Apoptose auf. Unter den sezernierten Proteinen wurden insbesondere höhere Level an PTX3 (löslicher Rezeptor der Pentraxin-Familie, involviert in apoptotischen Prozessen) im Überstand männlicher Endothelzellen nachgewiesen. Der Prozess der Entfernung apoptotischer Zellbestandteile durch phagozytotische Zellen (Efferozytose) war bei männlichen Endothelzellen von der PTX3-Expression abhängig, bei den weiblichen hingegen nicht. Unterschiedliche Sekretionsmuster serumreduzierter männlicher und weiblicher Endothelzellen könnten zu einer geschlechtsspezifischen zellulären Stressantwort beitragen. Dabei wird PTX3 von den Autoren bei männlichen Zellen als wichtiger Regulator in der Stressantwort auf einen apoptotischen Reiz (hier Serumentzug) angesehen (Cattaneo et al. 2021). Diese Studie unterstützt die These, dass weibliche Zellen nach Serumentzug resistenter sind und eine höhere Zellviabilität aufweisen als männliche (Lorenz et al. 2015). Darüber hinaus betont sie die Bedeutung des Geschlechts der Zellen bei Zellkulturexperimenten.

### **5.4.4. Intrinsische Geschlechtsunterschiede von Zytokinen bei HUVEC**

Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von an der Immunantwort beteiligter Gene in weiblichen HUVEC höher exprimiert sind. Viele dieser Gene kodieren dabei für Zytokine und Chemokine (Lorenz et al. 2015). Höhere Zytokin- und Chemokin-Level im Blut könnten dazu

beitragen, dass Frauen eine effektivere Immunantwort besitzen als Männer. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich in weiblichen HUVEC intrazellulär insgesamt höhere Zytokin-Level befinden als in männlichen. Nach VEGF zeigten sich höhere Zytokin-Level in männlichen Überständen. Dies könnte Hinweis dafür sein, dass männliche HUVEC auf VEGF-Stimulation sensibler reagieren und höhere Zytokin-Mengen sezernieren als weibliche. Dadurch wäre eine ausgeprägtere immunologische Toleranz gegenüber verschiedenen Reizen wie VEGF bei weiblichen HUVEC erklärbar.

Im Zusammenhang mit der immunologischen Toleranz überprüften Oettel et al. welche Auswirkungen das Geschlecht der Zellen auf mütterliche immunologische T-Zellen hat. Sowohl weibliche als auch männliche HUVEC induzierten die Konversion mütterlicher naiver T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (Treg), wobei weibliche HUVECs eine stärkere Umwandlung bewirkten als männliche. Damit könnten HUVEC durch eine Erhöhung der Anzahl der Treg zur fetal-mütterlichen Toleranz beitragen. Der festgestellte Geschlechtsunterschied in der Treg-Zell-Induktion könnte laut den Autoren dabei zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Inzidenz von Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen in der Schwangerschaft oder Kindheit beitragen (Oettel et al. 2016).

#### **5.4.5. Notwendigkeit der Berücksichtigung des Geschlechts bei Experimenten mit Zellen**

In der Grundlagenforschung wird zunehmend gefordert, das Geschlecht der Zellen zu berücksichtigen. Es besteht mittlerweile Konsens, dass Geschlechtsunterschiede auch ohne hormonelle Einflüsse bestehen. Auf die Rolle des Geschlechts der Zellen weisen auch aktuelle Studien zu Geschlechtsunterschieden in HUVEC und in HAEC (Human Aortic Endothelial Cell) hin (Hartmann et al. 2020). Die Arbeitsgruppe verglich intrinsische mit erworbenen Geschlechtsunterschieden. Sie verglich die geschlechtsspezifische Genexpression von HUVEC

von Zwillingspaaren (Junge/Mädchen / Junge/Junge / Mädchen/Mädchen) mit der von HAEC aus nichtverwandten Erwachsenen. Durch Genexpressions-Daten aus zwei Lebensabschnitten (bei Geburt und im Erwachsenenalter) konnten Geschlechtsunterschiede identifiziert werden, die einerseits bereits bei der Geburt vorhanden waren und während des Lebens erhalten blieben. Andererseits wurden Geschlechtsunterschiede erfasst, die sich erst im Laufe der Zeit entwickelt hatten. Damit konnte mit einiger Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden, welche Genexpressionsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Zellen auf unterschiedliche Hormonexposition zurückzuführen sind. Eine weiterführende Analyse der Datensätze ergab, dass die gefundenen intrinsischen Expressionsunterschiede auch bei Erkrankungen der Herzkranzgefäße involviert sind (Hartman et al. 2020).

Die vorgestellten Studien stellen die Bedeutung des Geschlechts der Zellen bei experimentellen Arbeiten heraus. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden einerseits nur wenige Arbeiten zur Zytokin- und Chemokinproduktion in HUVEC publiziert (Nilsen et al. 1998; Goddard et al. 2013), und andererseits wird das Thema Geschlechtsunterschiede nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Unterschiede in intrazellulären und sezernierten Zytokinen und Chemokinen zwischen männlichen und weiblichen HUVEC untersucht. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen und man daher das Geschlecht als biologische Variable ansehen und berücksichtigen muss.

## 5.5. Limitationen der Arbeit

Da jede HUVEC von einem unterschiedlichen Spender stammt, ist mit hohen interindividuellen Variabilitäten der Ergebnisse zu rechnen. Daher ist bei der Verwendung von HUVEC eine hohe Anzahl nötig, um repräsentative Aussagen zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit konnten aufgrund des einmaligen Gebrauches der Nitrozellulosemembranen zur Messung der Zytokin- und Chemokin-Level keine Einzelmessungen durchgeführt werden. Daher wurden Pools, d.h. Proben aus mehreren Zellkulturüberständen bzw. Zelllysaten verwendet. Durch die Verwendung von HUVEC-Pools beiderlei Geschlechts ist die vorliegende Arbeit als Pilotstudie anzusehen. Daher sollten die gefundenen Ergebnisse der Zytokin- und Chemokin-Level in Nachfolgeuntersuchungen wie Western-Blots oder Messung der Transkription mittels Real-Time RT-PCR verifiziert werden.

Geringe hormonelle und Lebensstil-Einflüsse auf die Ergebnisse können nicht vollständig ausgeschlossen werden. Sowohl mütterliche hormonelle, als auch nicht-hormonelle Faktoren (kardiovaskuläre Risikofaktoren, Alter, Nebenerkrankungen, Medikamenteneinnahme, Umgebungssituation, Genetik) können sich auf zelluläre Parameter der HUVEC auswirken.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Rahman, A. (2017): Influence of sex on cardiovascular drug responses: role of estrogen. In: *Current Opinion in Pharmacology* 33, S. 1–5. DOI: 10.1016/j.coph.2017.02.002.
- Addis, R.; Campesi, I.; Fois, M.; Capobianco, M.; Dessole, S.; Fenu, G.; Montanella, A.; Cattaneo, M.; Vicentini, L.; Franconi, F. (2014): Human umbilical endothelial cells (HUVECs) have a sex: characterisation of the phenotype of male and female cells. In: *Biology of Sex Difference eCollection* 2014. Dec 14;5(1):18. Doi: 10.1186/s13293-014-0018-2.
- Anastasiadis, K.; Tagarakis, G.; Antonitsis, P. (2016): Arterial Coronary Bypass Grafting: Targeting the Interventricular Septum. In: *Journal of the American College of Cardiology* 67 (17), S. 2086–2087. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.11.074.
- Appelman, Y.; van Rijn, B.; ten Haaf, M.; Boersma, E.; Peters, S. (2015): Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. In: *Atherosclerosis* 241 (1), S. 211–218. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.027.
- Arakelyan, A.; Petrkova, J.; Hermanova, Z.; Boyajyan, A.; Lukl, J.; Petrek, M. (2005): Serum levels of the MCP-1 chemokine in patients with ischemic stroke and myocardial infarction. In: *Mediators of Inflammation* 2005 (3), S. 175–179. DOI: 10.1155/MI.2005.175.
- Arora, S.; Stouffer, G.; Kucharska-Newton, A.; Vaduganathan, M.; Qamar, A.; Matsushita, K.; Kolte, D.; Reynolds, H.; Bangalore, S.; Rosamond, W.; Bhatt, D.; Caughey, M. (2018): Fifteen-Year Trends in Management and Outcomes of Non-ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction Among Black and White Patients: The ARIC Community Surveillance Study, 2000-2014. In: *Journal of the American Heart Association* 7 (19), e010203. DOI: 10.1161/JAHA.118.010203.
- Assad, S.; Khan, H.; Ghazanfar, H.; Khan, Z.; Mansoor, S.; Rahman, M.; Khan, G.; Zafar, B.; Usman T.; Malik, S. (2017): Role of Sex Hormone Levels and Psychological Stress in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. In: *Cureus* 9 (6), e1315. DOI: 10.7759/cureus.1315.
- Aynacıoğlu, A.; Bilir, A.; Tuna, M. (2019): Involvement of midkine in autoimmune and autoinflammatory diseases. In: *Modern Rheumatology* 29 (4), S. 567–571. DOI: 10.1080/14397595.2018.1523701.
- Bajou, K.; Peng, H.; Laug, W.; Maillard, C.; Noel, A.; Foidart, J.; Martial, J.; DeClerck, Y. (2008): Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. In: *Cancer Cell* 14 (4), S. 324–334. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.08.012.
- Baker, E.; Hayati, Y.; Parveen, Y.; Miles, E.; Calder, P. (2018): Omega-3 fatty acids and leukocyte-endothelium adhesion: Novel anti-atherosclerotic actions. In: *Molecular Aspects of Medicine* 64, S. 169–181. DOI: 10.1016/j.mam.2018.08.002.
- Bechara, C.; Wang, X.; Chai, H.; Lin, P.; Yao, Q.; Chen, C. (2007): Growth-related oncogene- $\alpha$  induces endothelial dysfunction through oxidative stress and downregulation of eNOS in porcine coronary arteries. In: *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (5), H3088-95. DOI: 10.1152/ajpheart.00473.2007.

Benjamin, E.; Virani, S.; Callaway, C.; Chamberlain, A.; Chang, A.; Cheng, S.; Chiuve, S.; Cushman, M.; Dellinger, F.; Deo, R.; de Ferranti, S.; Fornage, M.; Gillespie, C.; Isasi, C.; Jiménez, M.; Jordan, L.; Judd, S.; Lackland, D.; Lichtman, J.; Lynda, L.; Liu, S.; Longenecker, C.; Lutsey, P.; Macker, J.; Matchar, D.; Matsushita, K.; Mussolino, M.; Nasir, K.; O'Flaherty, M.; Palaniappan, L.; Pandey, A.; Pandey, D.; Reeves, M.; Ritchey, M.; Rodriguez, C.; Roth, G.; Rosamond, W.; Sampson, U.; Satou, G.; Shah, S.; Spartano, N.; Tirschwell, D.; Tsao C.; Voeks, J.; Willey, J.; Wilkins, J.; Wu, J.; Alger, H.; Wong, S.; Muntner, P. (2018): Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. In: *Circulation* 137 (12), e67-e492. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558.

Bhatia, A.; Sekhon, H.; Kaur, G. (2014): Sex hormones and immune dimorphism. In: *The Scientific World Journal* 2014, S. 159150. DOI: 10.1155/2014/159150.

Biwer, L.; Taddeo, E.; Kenwood, B.; Hoehn, K.; Straub, A.; Isakson, B. (2016): Two functionally distinct pools of eNOS in endothelium are facilitated by myoendothelial junction lipid composition. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1861 (7), S. 671–679. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2016.04.014.

Blanchet, X.; Cesarek, K.; Brandt, J.; Herwald, H.; Teupser, D.; Küchenhoff, H.; Karshovska, E.; Mause, S.; Siess, W.; Wasmuth, H.; Soehnlein, O.; Koenen, R.; Weber, C.; von Hundelshausen, P. (2014): Inflammatory role and prognostic value of platelet chemokines in acute coronary syndrome. In: *Thrombosis and Haemostasis* 112 (6), S. 1277–1287. DOI: 10.1160/TH14-02-0139.

Boardman, H.; Hartley, L.; Eisinga, A.; Main, C.; Roqué i Figuls, M.; Bonfill Cosp, X.; Sanchez, R.; Knight, B. (2015): Hormone therapy for preventing cardiovascular disease in postmenopausal women. In: *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (3), CD002229. DOI: 10.1002/14651858.CD002229.pub4.

Bugiardini, R.; Manfrini, O.; Cenko, E. (2019): Female sex as a biological variable: A review on younger patients with acute coronary syndrome. In: *Trends in Cardiovascular Medicine* 29 (1), S. 50–55. DOI: 10.1016/j.tcm.2018.06.002.

Calandra, R.; Roger, T. (2003): Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. In: *Nature Reviews. Immunology* 3 (10), S. 791–800. DOI: 10.1038/nri1200.

Camaré, C.; Pucelle, M.; Nègre-Salvayre, A.; Salvayre, R. (2017): Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. In: *Redox Biology* 12, S. 18–34. DOI: 10.1016/j.redox.2017.01.007.

Canto, J.; Rogers, W.; Goldberg, R.; Peterson, E.; Wenger, N.; Vaccarino, V.; Kiefe, C.; Paul, D.; Sopko, G.; Zheng, Z. (2012): Association of age and sex with myocardial infarction symptom presentation and in-hospital mortality. In: *JAMA* 307 (8), S. 813–822. DOI: 10.1001/jama.2012.199.

Cardinali, D.; Esquifino, A.; Srinivasan, V.; Pandi-Perumal, S. (2008): Melatonin and the immune system in aging. In: *Neuroimmunomodulation* 15 (4-6), S. 272–278. DOI: 10.1159/000156470.

Carter, B.; Abnet, C.; Feskanich, D.; Freedman, N.; Hartge, P.; Lewis, C.; Ockene, J.; Prentice, R.; Speizer, F.; Thun, M.; Jacobs, E. (2015): Smoking and mortality--beyond established causes. In: *The New England Journal of Medicine* 372 (7), S. 631–640. DOI: 10.1056/NEJMsa1407211.

- Casimir, G.; Mulier, S.; Hanssens, L.; Zylberberg, K.; Duchateau, J. (2010): Gender differences in inflammatory markers in children. In: *Shock* (Augusta, Ga.) 33 (3), S. 258–262. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181b2b36b.
- Cattaneo, M.; Banfi, C.; Brioschi, M.; Lattuada, D.; Vicentini, L. (2021): Sex-dependent differences in the secretome of human endothelial cells. In: *Biology of sex differences* 12 (1), S. 7. DOI: 10.1186/s13293-020-00350-3.
- Cattaneo, M.; Vanetti, C.; Decimo, I.; Di Chio, M.; Martano, G.; Garrone, G.; Bifari, F.; Vicentini, L. (2017): Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 9612. DOI: 10.1038/s41598-017-10139-x.
- Cheetham, T.; An, J.; Jacobsen, S.; Niu, F.; Sidney, S.; Quesenberry, C.; Van Den Eeden, S. (2017): Association of Testosterone Replacement With Cardiovascular Outcomes Among Men With Androgen Deficiency. In: *JAMA Internal Medicine* 177 (4), S. 491–499. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016.9546.
- Chinwong, D.; Mookmanee, N.; Chongpornchai, J.; Chinwong, S. (2018): A Comparison of Gender Differences in Smoking Behaviors, Intention to Quit, and Nicotine Dependence among Thai University Students. In: *Journal of Addiction* 2018, S. 8081670. DOI: 10.1155/2018/8081670.
- Christou, E.; Banos, A.; Kosmara, D.; Bertsiias, G.; Boumpas, D. (2019): Sexual dimorphism in SLE: above and beyond sex hormones. In: *Lupus* 28 (1), S. 3–10. DOI: 10.1177/0961203318815768.
- Dal Lin, C.; Tona, F.; Osto, E. (2015): Coronary Microvascular Function and Beyond: The Crosstalk between Hormones, Cytokines, and Neurotransmitters. In: *International Journal of Endocrinology* 2015, S. 312848. DOI: 10.1155/2015/312848.
- Deshmane, S.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. (2009): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. In: *Journal of Interferon & Cytokine Research The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29 (6), S. 313–326. DOI: 10.1089/jir.2008.0027.
- Dinareello, C. (2007): Historical insights into cytokines. In: *European Journal of Immunology* 37 Suppl 1, S34–45. DOI: 10.1002/eji.200737772.
- Dunlay, S.; Roger, V. (2012): Gender differences in the pathophysiology, clinical presentation, and outcomes of ischemic heart failure. In: *Current Heart Failure Reports* 9 (4), S. 267–276. DOI: 10.1007/s11897-012-0107-7.
- Edwards, E.; Sackett, S. (2016): Psychosocial Variables Related to Why Women are Less Active than Men and Related Health Implications. In: *Clinical Medicine Insights. Women's Health* 9 (Suppl 1), S. 47–56. DOI: 10.4137/CMWH.S34668.
- Fatkhullina, A.; Peshkova, I.; Koltsova, E. (2016): The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 81 (11), S. 1358–1370. DOI: 10.1134/S0006297916110134.
- Ferreira L.; Vinicius, H.; Borba, H.; Bonetti, A.; Leonart, L.; Pontarolo, R. (2019): Cytokines and Interferons: Types and Functions. In: Wahid Ali Khan (Hg.): *Autoantibodies and Cytokines: IntechOpen*.



- Finkle, W.; Greenland, S.; Ridgeway, G.; Adams, J.; Frasco, M.; Cook, M.; Fraumeni, J.; Hoover, R. (2014): Increased risk of non-fatal myocardial infarction following testosterone therapy prescription in men. In: *PloS One* 9 (1), e85805. DOI: 10.1371/journal.pone.0085805.
- Franconi, F.; Rosano, G.; Basili, S.; Montella, A.; Campesi, I. (2017): Human cells involved in atherosclerosis have a sex. In: *International Journal of Cardiology* 228, S. 983–1001. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.11.118.
- Gencer, S.; Evans, B.; van der Vorst, E.; Döring, Y.; Weber, C. (2021): Inflammatory Chemokines in Atherosclerosis. In: *Cells* 10 (2). DOI: 10.3390/cells10020226.
- Ghazali, W.; Ibrahīm, R.; Ashari, N. (2017): Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Biomarker for Disease Activity in Lupus Nephritis. In: *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS* 24 (5), S. 62–72. DOI: 10.21315/mjms2017.24.5.7
- Goddard, L.; Ton, A.; Org, T.; Mikkola, H.; Iruela-Arispe, M. (2013): Selective suppression of endothelial cytokine production by progesterone receptor. In: *Vascular Pharmacology* 59 (1-2), S. 36–43. DOI: 10.1016/j.vph.2013.06.001.
- Griffith, J.; Sokol, C.; Luster, A. (2014): Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. In: *Annual Review of Immunology* 32, S. 659–702. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
- Gubbels Bupp, M. (2015): Sex, the aging immune system, and chronic disease. In: *Cellular Immunology* 294 (2), S. 102–110. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.02.002.
- Hansson, G.; Libby, P.; Tabas, I. (2015): Inflammation and plaque vulnerability. In: *Journal of Internal Medicine* 278 (5), S. 483–493. DOI: 10.1111/joim.12406.
- Hartman, J.; Frishman, W. (2014): Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. In: *Cardiology in Review* 22 (3), S. 147–151. DOI: 10.1097/CRD.0000000000000021.
- Hartman, R.; Kapteijn, D.; Haitjema, S.; Bekker, M.; Mokry, M.; Pasterkamp, G.; Civelek, M.; den Ruijter, H. (2020): Intrinsic transcriptomic sex differences in human endothelial cells at birth and in adults are associated with coronary artery disease targets. In: *Scientific Reports* 10 (1), S. 12367. DOI: 10.1038/s41598-020-69451-8.
- Hedayati, T.; Yadav, N.; Khanagavi, J. (2018): Non-ST-Segment Acute Coronary Syndromes. In: *Cardiology Clinics* 36 (1), S. 37–52. DOI: 10.1016/j.ccl.2017.08.003.
- Herder, C.; Peeters, W.; Illig, T.; Baumert, J.; de Kleijn, D.; Moll, F.; Poschen, U.; Klopp, N.; Müller-Nurasyid, M.; Roden, M.; Preuss, M.; Karakas, M.; Meisinger, C.; Thorand, B.; Pasterkamp, G.; Koenig, W. (2011): RANTES/CCL5 and risk for coronary events: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort, Athero-Express and CARDIoGRAM studies. In: *PloS one* 6 (12), e25734. DOI: 10.1371/journal.pone.0025734.
- Herr, N.; Bode, C.; Duerschmied, D. (2017): The Effects of Serotonin in Immune Cells. In: *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 4, S. 48. DOI: 10.3389/fcvm.2017.00048.
- Hofnagel, O.; Engel, T.; Severs, N.; Robenek, H.; Buers, I. (2011): SR-PSOX at sites predisposed to atherosclerotic lesion formation mediates monocyte-endothelial cell adhesion. In: *Atherosclerosis* 217 (2), S. 371–378. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.021.

- Iorga, A.; Cunningham, C.; Moazeni, S.; Ruffenach, G.; Umar, S.; Eghbali, M. (2017): The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. In: *Biology of Sex Differences* 8 (1), S. 33. DOI: 10.1186/s13293-017-0152-8.
- Ismail, N.; Abd El Baky, A.; Ragab, S.; Hamed, M.; Hashish, M.; Shehata, A. (2016): Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage migration inhibitory factor in children with type 1 diabetes. In: *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 29 (6), S. 641–645. DOI: 10.1515/jpem-2015-0340.
- Jahic, E. (2017): Experience and Outcomes of Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction of Tertiary Care Center in Bosnia and Herzegovina. In: *Medical Archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)* 71 (3), S. 183–187. DOI: 10.5455/medarh.2017.71.183-187.
- Jiang, S.; Tsai, P.; Peng, S.; Chang, C.; Chung, Y.; Tsao, H.; Huang, H.; Chen, S.; Hsu, H. (2019): A potential peptide derived from cytokine receptors can bind proinflammatory cytokines as a therapeutic strategy for anti-inflammation. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 2317. DOI: 10.1038/s41598-018-36492-z.
- Jiménez, N.; Krouwer, V.; Post, J. (2013): A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. In: *Cytotechnology* 65 (1), S. 1–14. DOI: 10.1007/s10616-012-9459-9.
- Kander, M.; Cui, Y.; Liu, Z. (2017): Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21 (5), S. 1024–1032. DOI: 10.1111/jcmm.13038.
- Kany, S.; Vollrath, J.; Relja, B. (2019): Cytokines in Inflammatory Disease. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (23). DOI: 10.3390/ijms20236008.
- Kattoor, A.; Pothineni, N.; Palagiri, D.; Mehta, J. (2017): Oxidative Stress in Atherosclerosis. In: *Current Atherosclerosis Reports* 19 (11), S. 42. DOI: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- Kawamoto, K.; Davis, M.; Duvernoy, C. (2016): Acute Coronary Syndromes: Differences in Men and Women. In: *Current Atherosclerosis Reports* 18 (12), S. 73. DOI: 10.1007/s11883-016-0629-7.
- Khan, D.; Ansar A. (2015): The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. In: *Frontiers in Immunology* 6, S. 635. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00635.
- Kleiner, G.; Marcuzzi, A.; Zanin, V.; Monasta, L.; Zauli, G. (2013): Cytokine levels in the serum of healthy subjects. In: *Mediators of Inflammation* 2013, S. 434010. DOI: 10.1155/2013/434010.
- Kocherova, I.; Bryja, A.; Mozdziak, P.; Angelova, V.; Dyszkiewicz-Konwińska, M.; Piotrowska-Kempisty, H.; Antosik, P.; Bruska, M.; Iżycki, D.; Zabel, M.; Nowicki, M.; Kempisky, B. (2019): Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. In: *Journal of Clinical Medicine* 8 (10). DOI: 10.3390/jcm8101602.

- Korbecki, J.; Bajdak-Rusinek, K.; Kupnicka, P.; Kapczuk, P.; Simińska, D.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. (2021): The Role of CXCL16 in the Pathogenesis of Cancer and Other Diseases. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7). DOI: 10.3390/ijms22073490.
- Kosmas, C.; Silverio, D.; Sourlas, A.; Montan, P.; Guzman, E.; Garcia, M. (2019): Anti-inflammatory therapy for cardiovascular disease. In: *Annals of Translational Medicine* 7 (7), S. 147. DOI: 10.21037/atm.2019.02.34.
- Lai, Y.; Chao, C.; Yeh, T. (2020): Roles of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Dengue Pathogenesis: From Pathogenic Factor to Therapeutic Target. In: *Microorganisms* 8 (6). DOI: 10.3390/microorganisms8060891.
- Lange, T.; Dimitrov, S.; Born, J. (2010): Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1193, S. 48–59. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x.
- Lefèvre, N.; Corazza, F.; Duchateau, J.; Desir, J.; Casimir, G. (2012): Sex differences in inflammatory cytokines and CD99 expression following in vitro lipopolysaccharide stimulation. In: *Shock* (Augusta, Ga.) 38 (1), S. 37–42. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182571e46.
- Li, A.; Varney, M.; Valasek, J.; Godfrey, M.; Dave, B.; Singh, R. (2005): Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. In: *Angiogenesis* 8 (1), S. 63–71. DOI: 10.1007/s10456-005-5208-4.
- Li, Q.; Youn, J.; Cai, H. (2015): Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. In: *Journal of Hypertension* 33 (6), S. 1128–1136. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000587.
- Li, Z.; Bai, Y.; Guo, X.; Zheng, L.; Sun, Y.; Roselle, A. (2016): Alcohol consumption and cardiovascular diseases in rural China. In: *International Journal of Cardiology* 215, S. 257–262. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.04.095.
- Lin, C.; Pan, C.; Wang, C.; Liu, S.; Hsiao, L.; Yang, C. (2015): Tumor necrosis factor-alpha induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblasts. In: *Journal of Biomedical Science* 22, S. 53. DOI: 10.1186/s12929-015-0165-8.
- Lin, F.; Young, H. (2014): Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25 (4), S. 369–376. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.015.
- Lo, H.; Lai, T.; Li, C.; Wu, W. (2014): TNF- $\alpha$  induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. In: *Acta Pharmacologica Sinica* 35 (3), S. 339–350. DOI: 10.1038/aps.2013.182.
- Lobo, R. (2017): Hormone-replacement therapy: current thinking. In: *Nature Reviews. Endocrinology* 13 (4), S. 220–231. DOI: 10.1038/nrendo.2016.164.
- Lorenz, M.; Blaschke, B.; Benn, A.; Hammer, E.; Witt, E.; Kirwan, J.; Fritsche-Guenther, R.; Gloaguen, Y.; Bartsch, C.; Vietzke, A.; Kramer, F.; Kappert, K.; Brunnder, P.; Nguyen, H.; Dreger, H.; Stangl, K.; Knaus, P.; Stangl, V. (2019): Sex-specific metabolic and functional differences in human umbilical vein endothelial cells from twin pairs. In: *Atherosclerosis* 291, S. 99–106. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.10.007.

- Lorenz, M.; Koschate, J.; Kaufmann, K.; Kreye, C.; Mertens, M.; Kuebler, W.; Baumann, G.; Gossing, G.; Marki, A.; Zakrzewicz A.; Miéville C.; Benn, A.; Horbelt, D.; Wratil, R.; Stangl, K.; Stangl, V. (2015): Does cellular sex matter? Dimorphic transcriptional differences between female and male endothelial cells. In: *Atherosclerosis* 240 (1), S. 61–72. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.018.
- Maas, A.; Appelman, Y. (2010): Gender differences in coronary heart disease. In: *Netherlands heart journal: monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 18 (12), S. 598–602. DOI: 10.1007/s12471-010-0841-y.
- Madonna, R.; Balistreri, C.; de Rosa, S.; Muscoli, S.; Selvaggio, S.; Selvaggio, G.; Ferdinandy, P.; De Caterina, R. (2019): Impact of Sex Differences and Diabetes on Coronary Atherosclerosis and Ischemic Heart Disease. In: *Journal of Clinical Medicine* 8 (1). DOI: 10.3390/jcm8010098.
- Medina-Leyte, D.; Domínguez-Pérez, M.; Mercado, I.; Villarreal-Molina, M.; Jacobo-Albavera, L. (2020): Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. In: *Applied Sciences* 10 (3), S. 938. DOI: 10.3390/app10030938.
- Mitchell, A.; Palettas, M.; Christian, L. (2017): Fetal sex is associated with maternal stimulated cytokine production, but not serum cytokine levels, in human pregnancy. In: *Brain, Behavior, and Immunity* 60, S. 32–37. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.06.015.
- Miura, S.; Shiga, Y.; Ike, A.; Iwata, A. (2019): Atherosclerotic Coronary Artery Disease in Patients With Cardiometabolic Syndrome. In: *Cardiology Research* 10 (2), S. 69–73. DOI: 10.14740/cr857.
- Moroni, F.; Ammirati, E.; Norata, G.; Magnoni, M.; Camici, P. (2019): The Role of Monocytes and Macrophages in Human Atherosclerosis, Plaque Neoangiogenesis, and Atherothrombosis. In: *Mediators of Inflammation* 2019, S. 7434376. DOI: 10.1155/2019/7434376.
- Ngo, S.; Steyn, F.; McCombe, P. (2014): Gender differences in autoimmune disease. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* 35 (3), S. 347–369. DOI: 10.1016/j.yfrne.2014.04.004.
- Nilsen, E.; Johansen, F.; Jahnsen, F.; Lundin, K.; Scholz, T.; Brandtzaeg, P.; Haraldsen, G. (1998): Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. In: *Gut* 42 (5), S. 635–642. DOI: 10.1136/gut.42.5.635.
- Noels, H.; Weber, C.; Koenen, R. (2019): Chemokines as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39 (4), S. 583–592. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.312037.
- Oettel, A.; Lorenz, M.; Stangl, V.; Costa, S.; Zenclussen, A.; Schumacher, A. (2016): Human Umbilical Vein Endothelial Cells foster conversion of CD4+CD25-Foxp3- T cells into CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells via Transforming Growth Factor- $\beta$ . In: *Scientific Reports* 6, S. 23278. DOI: 10.1038/srep23278.
- Ortona, E.; Pierdominici, M.; Maselli, A.; Veroni, C.; Aloisi, F.; Shoenfeld, Y. (2016): Sex-based differences in autoimmune diseases. In: *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 52 (2), S. 205–212. DOI: 10.4415/ANN\_16\_02\_12.

- Øynebråten, I.; Bakke, O.; Brandtzaeg, P.; Johansen, F.; Haraldsen, G. (2004): Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. In: *Blood* 104 (2), S. 314–320. DOI: 10.1182/blood-2003-08-2891.
- Pace, S.; Sautebin, L.; Werz, O. (2017): Sex-biased eicosanoid biology: Impact for sex differences in inflammation and consequences for pharmacotherapy. In: *Biochemical Pharmacology* 145, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.06.128.
- Palomino, D.; Marti, L. (2015): Chemokines and immunity. In: *Einstein (Sao Paulo, Brazil)* 13 (3), S. 469–473. DOI: 10.1590/S1679-45082015RB3438.
- Pascali, F.; Hemann, C.; Samons, K.; Chen, C.; Zweier, J. (2014): Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. In: *Biochemistry* 53 (22), S. 3679–3688. DOI: 10.1021/bi500076r.
- Polsky, S.; Akturk, H. (2017): Alcohol Consumption, Diabetes Risk, and Cardiovascular Disease Within Diabetes. In: *Current Diabetes Reports* 17 (12), S. 136. DOI: 10.1007/s11892-017-0950-8.
- Raman, D.; Sobolik-Delmaire, T.; Richmond, A. (2011): Chemokines in health and disease. In: *Experimental Cell Research* 317 (5), S. 575–589. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.01.005.
- Ramji, D.; Davies, T. (2015): Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26 (6), S. 673–685. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.003.
- Rauch, I.; Müller, M.; Decker, T. (2013): The regulation of inflammation by interferons and their STATs. In: *JAK-STAT* 2 (1), e23820. DOI: 10.4161/jkst.23820.
- Ray, A. (2016): Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. In: *MOJI* 4 (2). DOI: 10.15406/moji.2016.04.00121.
- Rodgers, J.; Jones, J.; Bolleddu, S.; Vanthenapalli, S.; Rodgers, L.; Shah, K.; Karia, K.; Panguluri, S. (2019): Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging. In: *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 6 (2). DOI: 10.3390/jcdd6020019.
- Rosano, G.; Spoletini, I.; Vitale, C. (2017): Cardiovascular disease in women, is it different to men? The role of sex hormones. In: *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society* 20 (2), S. 125–128. DOI: 10.1080/13697137.2017.1291780.
- Sabat, R.; Grütz, G.; Warszawska, K.; Kirsch, S.; Witte, E.; Wolk, K.; Geginat, J. (2010): Biology of interleukin-10. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21 (5), S. 331–344. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002.
- Salajegheh, A. (2016): Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). In: Ali Salajegheh (Hg.): *Angiogenesis in Health, Disease and Malignancy*, Bd. 119. Cham: Springer International Publishing, S. 363–374.
- Sanghavi, M.; Gulati, M. (2015): Sex differences in the pathophysiology, treatment, and outcomes in IHD. In: *Current Atherosclerosis Reports* 17 (6), S. 511. DOI: 10.1007/s11883-015-0511-z.

- Schaper, F.; Rose-John, S. (2015): Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26 (5), S. 475–487. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.004.
- Schmidt, K.; Nan, J.; Scantlebury, D.; Aggarwal, Ni. (2018): Stable Ischemic Heart Disease in Women. In: *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 20 (9), S. 72. DOI: 10.1007/s11936-018-0665-4.
- Schulte, W.; Bernhagen, J.; Bucala, R. (2013): Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. In: *Mediators of Inflammation* 2013, S. 165974. DOI: 10.1155/2013/165974.
- Schwinge, D.; Schramm, C. (2019): Sex-related factors in autoimmune liver diseases. In: *Seminars in Immunopathology* 41 (2), S. 165–175. DOI: 10.1007/s00281-018-0715-8.
- Shibata, Y.; Muramatsu, T.; Hirai, M.; Inui, T.; Kimura, T.; Saito, H.; McCormick, L.; Bu, G.; Kadomatsu, K. (2002): Nuclear targeting by the growth factor midkine. In: *Molecular and Cellular Biology* 22 (19), S. 6788–6796. DOI: 10.1128/mcb.22.19.6788-6796.2002.
- Sinitski, D.; Kontos, C.; Krammer, C.; Asare, Y.; Kapurniotu, A.; Bernhagen, J. (2019): Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)-Based Therapeutic Concepts in Atherosclerosis and Inflammation. In: *Thrombosis and Haemostasis* 119 (4), S. 553–566. DOI: 10.1055/s-0039-1677803.
- Siragusa, M.; Fleming, I. (2016): The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. In: *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 468 (7), S. 1125–1137. DOI: 10.1007/s00424-016-1839-0.
- Sisto, M.; Lisi, S. (2015): New insights into ADAMs regulation of the GRO- $\alpha$ /CXCR2 system: focus on Sjögren's syndrome. In: *International Reviews of Immunology* 34 (6), S. 486–499. DOI: 10.3109/08830185.2014.975892.
- Sokol, C.; Luster, A. (2015): The chemokine system in innate immunity. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (5). DOI: 10.1101/cshperspect.a.016303.
- Steyers, C.; Miller, F. (2014): Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. In: *International Journal of Molecular Sciences* 15 (7), S. 11324–11349. DOI: 10.3390/ijms150711324.
- Straface, E.; Gambardella, L.; Brandani, M.; Malorni, W. (2012): Sex differences at cellular level: "cells have a sex". In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (214), S. 49–65. DOI: 10.1007/978-3-642-30726-3\_3.
- Sun, R.; Tian, J.; Zhang, J.; Wang, L.; Guo, J.; Liu, Y. (2017): Monitoring inflammation injuries in the progression of atherosclerosis with contrast enhanced ultrasound molecular imaging. In: *PloS One* 12 (10), e0186155. DOI: 10.1371/journal.pone.0186155.
- Taqueti, V. (2018): Sex Differences in the Coronary System. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1065, S. 257–278. DOI: 10.1007/978-3-319-77932-4\_17.
- Thüsen, J.; Kuiper, J.; van Berkel, T.; Biessen, E. (2003): Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. In: *Pharmacological Reviews* 55 (1), S. 133–166. DOI: 10.1124/pr.55.1.5.

- Tilstam, P.; Qi, D.; Leng, L.; Young, L.; Bucala, R. (2017): MIF family cytokines in cardiovascular diseases and prospects for precision-based therapeutics. In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21 (7), S. 671–683. DOI: 10.1080/14728222.2017.1336227.
- Tousoulis, D.; Oikonomou, E.; Economou, E.; Crea, F.; Kaski, J. (2016): Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches. In: *European Heart Journal* 37 (22), S. 1723–1732. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv759.
- Turner, M.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D. (2014): Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1843 (11), S. 2563–2582. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
- Udalova, I.; Monaco, C.; Nanchahal, J.; Feldmann, M. (2016): Anti-TNF Therapy. In: *Microbiology Spectrum* 4 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0022-2015.
- Valencak, T.; Osterrieder, A.; Schulz, T. (2017): Sex matters: The effects of biological sex on adipose tissue biology and energy metabolism. In: *Redox Biology* 12, S. 806–813. DOI: 10.1016/j.redox.2017.04.012.
- van der Vorst, E.; Döring, Y.; Weber, C. (2015): Chemokines and their receptors in Atherosclerosis. In: *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 93 (9), S. 963–971. DOI: 10.1007/s00109-015-1317-8.
- van Mourik, J.; Romani de Wit, T.; Voorberg, J. (2002): Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. In: *Histochemistry and Cell Biology* 117 (2), S. 113–122. DOI: 10.1007/s00418-001-0368-9.
- Ventura-Clapier, R.; Dworatzek, E.; Seeland, U.; Kararigas, G.; Arnal, J.-F.; Brunelleschi, S.; Carpenter, T.; Erdmann, J.; Franconi, F.; Giannetta, E.; Glezerman, M.; Hofmann, S.; Junien, C.; Katai, M.; Kublickiene, K.; König, I.; Majdic, G.; Malorni, W.; Mieth, C.; Miller, V.; Reynolds, R.; Shimokawa, H.; Tannenbaum, C.; D'Ursi, A.; Regitz-Zagrosek, V. (2017): Sex in basic research: concepts in the cardiovascular field. In: *Cardiovascular Research* 113 (7), S. 711–724. DOI: 10.1093/cvr/cvx066.
- Verboogen, D.; Revelo, N.; Ter Beest, M.; van den Bogaart, G. (2019): Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes. In: *Journal of Molecular Cell Biology* 11 (2), S. 144–157. DOI: 10.1093/jmcb/mjy038.
- Voloshyna, I.; Littlefield, M.; Reiss, A. (2014): Atherosclerosis and interferon- $\gamma$ : new insights and therapeutic targets. In: *Trends in Cardiovascular Medicine* 24 (1), S. 45–51. DOI: 10.1016/j.tcm.2013.06.003.
- Von Aulock, S.; Deininger S.; Draing C.; Gueinzius K.; Dehus O.; Hermann C. (2006): Gender Difference in Cytokine Secretion on Immune Stimulation with LPS and LTA i. In: *Journal of Interferon & Cytokine Resarch* 2006 Dec;26(12):887-92. DOI:10.1089/jir.2006.26.887.
- Wada, H.; Miyauchi, K.; Daida, H. (2019): Gender differences in the clinical features and outcomes of patients with coronary artery disease. In: *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 17 (2), S. 127–133. DOI: 10.1080/14779072.2019.1561277.

- Wallis, C.; Lo, K.; Lee, Y.; Krakowsky, Y.; Garbens, A.; Satkunasivam, R.; Herschorn S.; Kodama, R.; Cheung, P.; Narod, S.; Nam, R. (2016): Survival and cardiovascular events in men treated with testosterone replacement therapy: an intention-to-treat observational cohort study. In: *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 4 (6), S. 498–506. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)00112-1.
- Wang, Y.; Zang, Q.; Liu, Z.; Wu, Q.; Maass, D.; Dulan, G.; Shaul, P.; Melito, L.; Frantz, D.; Kilgore, J.; Williams, N.; Terada, L.; Nwariaku, F. (2011): Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. In: *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 301 (3), C695-704. DOI: 10.1152/ajpcell.00322.2010.
- Webb, C.; Collins, P. (2017): Role of Testosterone in the Treatment of Cardiovascular Disease. In: *European Cardiology Review* 12 (02), S. 1. DOI: 10.15420/ecr.2017:21:1.
- Yang, Z.; Kang, L.; Wang, Y.; Xiang, J.; Wu, Q.; Xu, C.; Zhou, Y.; Chen, S.; Fang, H.; Liu, J.; Dong, M. (2019): Role of IL-37 in Cardiovascular Disease Inflammation. In: *The Canadian Journal of Cardiology* 35 (7), S. 923–930. DOI: 10.1016/j.cjca.2019.04.007.
- Yockey, L.; Iwasaki, A. (2018): Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. In: *Immunity* 49 (3), S. 397–412. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.07.017.
- Yousefzadeh, M.; Schafer, M.; Noren Hooten, N.; Atkinson, E.; Evans, M.; Baker, D.; Quarles E.; Robbins, P.; Ladiges, W.; LeBrasseur, N.; Niedernhofer, L. (2018): Circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 as a potential measure of biological age in mice and frailty in humans. In: *Aging Cell* 17 (2). DOI: 10.1111/accel.12706.
- Yuan, T.; Yang, T.; Chen, H.; Fu, D.; Hu, Y.; Wang, J.; Yuan, Q.; Yu, H.; Xu, W.; Xie, X. (2019): New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. In: *Redox Biology* 20, S. 247–260. DOI: 10.1016/j.redox.2018.09.025.
- Zhao, D.; Guallar, E.; Ouyang, P.; Subramanya, V.; Vaidya, D.; Ndumele, C.; Lima, J.; Allison, M.; Shah, S.; Bertoni, A.; Budoff, M.; Post, W.; Michos, E. (2018): Endogenous Sex Hormones and Incident Cardiovascular Disease in Post-Menopausal Women. In: *Journal of the American College of Cardiology* 71 (22), S. 2555–2566. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.01.083.
- Zhuge, X.; Murayama, T.; Arai, H.; Yamauchi, R.; Tanaka, M.; Shimaoka, T.; Yonehara, S.; Kume, N.; Yokede, M.; Kita, T. (2005): CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 (4), S. 1295–1300. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.03.200.



[Bestandteil der Dissertation]

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, [Dania van de Maat], versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Geschlechtsspezifische Unterschiede in intrazellulären und sezernierten Zytokinen und Chemokinen in Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) (Sex-specific differences in intracellular and secreted cytokines and chemokines in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC))] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

[Sollten bereits Teile aus Ihrer Monographie publiziert worden sein, dann müssen Sie dies im Vorwort nach dem Deckblatt erklären und diese Anteilserklärung ausfüllen.

Die Anteile an den etwaigen Publikationen sind so deutlich und detailliert zu erklären, dass es der Promotionskommission und den wissenschaftlichen Gutachtern ohne Probleme möglich ist zu erkennen, was Sie selbst dazu beigetragen haben. Wünschenswert wäre ein konkreter Bezug zur Publikation wie z. B.: „aus meiner statistischen Auswertung sind die Tabellen 1, 4, 47 und 60 entstanden.“]

[Name des Doktoranden/der Doktorandin] hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: [Autoren], [Titel], [Zeitschrift], [Erscheinungsjahr]  
Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

Publikation 2: [Autoren], [Titel], [Zeitschrift], [Erscheinungsjahr]  
Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

Publikation 3: [Autoren], [Titel], [Zeitschrift], [Erscheinungsjahr]  
Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste Dania van de Maat (geb. Al-Romhein)

Die vorliegende Liste enthält alle referierten Zeitschriftenartikel und Posterpräsentationen.

### Publikation

Dania Al-Romhein (2019): Kutane Leishmaniose durch die in Europa seltene Subspezies *Leishmania donovani*. In: Derm Praktische Dermatologie, 6. Ausgabe 2019 Dezember

### Poster

Posterpräsentation, 50. Tagung der DDG (Deutsche Dermatologischen Gesellschaft e.V.)  
01.-04.Mai 2019 Berlin, Thema: Kutane Leishmaniose durch die in Europa seltene Subspezies  
*Leishmania donovani*

## DANKSAGUNG

Mein außerordentlicher Dank richtet sich an Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl für die Überlassung des Themas und die Vertretung dieser Dissertation an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie an der Charité-Universitätsmedizin in Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Mario Lorenz für die ausgezeichnete Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Ich bedanke mich für seine unendliche Geduld und seinen kritischen Anmerkungen, die zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Außerdem möchte ich Cornelia Bartsch meinen Dank aussprechen für das Beibringen der Methoden und die zuverlässige Hilfe. Ich bedanke mich für die lehrreiche, intensive und schöne Zusammenarbeit im Labor.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ohne die Unterstützung hätte ich das Studium der Humanmedizin und die Promotionszeit nicht absolvieren können. Ohne euren Glauben an mich und euren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Jörg van de Maat bedanken, der mich auf dem langen Weg der Promotion begleitet und mir den Rücken gestärkt hat.