

**Einfluss von Kakao-Flavanolen auf den
L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen
und Erythrozyten**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tatjana Brossette

aus Dillingen/Saar

Düsseldorf

Mai 2009

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W. Stahl
Koreferent: Prof. Dr. J. Jose

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.09

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
1	Die Aminosäure L-Arginin: Transport und Metabolismus.....	1
2	Die Enzyme Arginase und Stickstoffmonoxid-Synthase.....	3
2.1	Arginase	3
2.2	Stickstoffmonoxid-Synthase	4
2.2.1	Biochemische Eigenschaften und zelluläre Wirkmechanismen von NO ...	6
3	L-Argininstoffwechsel in Endothelzellen	7
4	L-Arginin/NO-Stoffwechsel in Erythrozyten	10
5	Kakao - nicht nur ein Genussmittel.....	15
5.1	Flavonoide in Kakaobohnen	18
5.2	Physiologische Effekte von Flavonoiden	23
5.3	Biokinetik der Flavonoide	24
5.3.1	Präresorptionsereignisse	25
5.3.2	Resorption und Metabolisierung im Dünndarm.....	25
5.3.3	Resorption und Metabolismus im Kolon.....	27
5.3.4	Metabolismus in der Leber.....	27
5.3.5	Verteilung und Eliminierung der Metabolite	28
5.4	Verarbeitung der Kakaobohnen - eine alte/neue Wissenschaft.....	30
6	Ziel und Fragestellung.....	32
II	MATERIAL UND METHODEN	33
1	Chemikalien, Geräte und andere Materialien.....	33
1.1	Chemikalien.....	33
1.2	Geräte	34
1.3	Verbrauchsmaterialien.....	35
1.4	Gase.....	36
1.5	Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	36
1.6	Enzyme, Inhibitoren und Zytokine	37

1.7 Kits	37
1.8 Software	37
2 Puffer und Lösungen	38
3 Kakao-Flavanole.....	39
3.1 Einzelne Flavanole	40
3.2 Flavanol-Gemisch.....	40
4 Zellkultur.....	40
4.1 Zellen.....	40
4.1.1 HUVEC – <i>human umbilical vein endothelial cells</i>	40
4.1.2 A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen	40
4.2 Kultivierung der Zellen.....	41
4.2.1 HUVEC	41
4.2.2 A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen	41
4.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	42
4.4 Inkubation mit Substanzen	42
4.4.1 Kakao-Flavanole	42
4.4.2 Zytokinaktivierung	43
4.5 Mykoplasmentest.....	43
5 Bestimmung der Zellviabilität mittels SRB-Assay	44
5.1 Vorbereitung der Zellen	44
5.2 Sulforhodamin B - Assay	44
6 Isolierung und Quantifizierung zellulärer Gesamt-RNA	45
6.1 Isolierung von Gesamt-RNA.....	45
6.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	45
7 Reverse Transkription	46
8 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR	46
8.1 Vorbereitung der Zellen	47
8.2 Real-Time PCR	47
8.3 Agarosegelelektrophorese.....	49

9	Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit mittels Actinomycin D	50
10	Proteinbestimmung nach Lowry.....	51
11	Bestimmung der Arginase-Aktivität	51
11.1	Vorbereitung der Zellen	51
11.2	Arginase-Assay	52
12	Bestimmung der eNOS-Aktivität.....	52
12.1	reduktive Chemilumineszenzdetektion (CLD).....	52
12.1.1	Vorbereitung der Zellen	53
12.1.2	Nitritbestimmung im Kulturüberstand	53
12.2	Direkter Nachweis von NO mittels Fluoreszenzmikroskopie	54
12.2.1	Herstellung der MNIP-Cu-Lösung	54
12.2.2	Vorbereitung der Zellen und Detektion der Fluoreszenz im Mikroskop...	55
12.2.3	Fluoreszenzmessung der MNIP-Cu-Lösungen mittels Fluorimeter.....	55
13	Bestimmung der NF-κB-Aktivität mittels Reporter-gen-Assay	55
13.1	Vorbereitung der Zellen	56
13.2	Luziferase-Reporter-gen-Assay	56
14	Humane Interventionsstudie	56
14.1	Studienprotokoll.....	56
14.2	Probandenkollektiv	57
14.3	Herstellung und Zusammensetzung des Kakaos	57
14.4	Blutabnahme und Probenaufarbeitung	58
14.4.1	Erythrozytenisolierung zur Bestimmung der Arginase-Aktivität.....	58
14.4.2	Serumgewinnung zur Bestimmung des Gesamt-epicatechins	59
15	Instrumentelle Analytik mittels RP-HPLC	59
15.1	Vorbereitung der Proben und HPLC-Bedingungen.....	59
16	Statistik	60
III	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	61
1	Einfluss von (-)-Epicatechin auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen.....	61

1.1	Effekt von (-)-Epicatechin auf die Zellviabilität.....	62
1.2	Effekt von (-)-Epicatechin auf die mRNA-Expression der Arginase-2 und eNOS.....	63
1.3	Effekt von (-)-Epicatechin auf die Aktivität der Arginase und eNOS	65
1.4	Bestimmung der NO-Synthese mittels Fluoreszenzmikroskopie	67
1.4.1	Untersuchung zur Stabilität des MNIP-Cu-Komplexes in Zellkulturmedien.....	67
1.4.2	Einfluss von (-)-Epicatechin und β -Östradiol auf die MNIP-Cu-Stabilität.	68
1.4.3	Effekt von (-)-Epicatechin auf die NO-Produktion in HUVEC	70
1.5	Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit von Arginase-2 und eNOS.....	72
2	Einfluss des Flavanol-Gemisches auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen.....	74
2.1	Effekt des Flavanol-Gemisches auf die mRNA-Expression der Arginase-2 und eNOS.....	75
2.2	Effekt des Flavanol-Gemisches auf die Aktivität der Arginase und eNOS....	77
3	Einfluss von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen.....	79
3.1	Effekt von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf die Arginase-2 mRNA-Expression.....	79
3.2	Effekt von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid, Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid und (+)-Catechin auf die eNOS-Aktivität.....	81
4	Einfluss von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen unter inflammatorischen Bedingungen	83
4.1	Effekt von (-)-Epicatechin auf die zytokininduzierte CAT-2B und iNOS mRNA-Expression	83
4.2	Effekt des Flavanol-Gemisches auf die zytokininduzierte CAT-2B und iNOS mRNA-Expression	86
5	Einfluss von Kakao-Flavanolen auf die NF-κB-Aktivität.....	88
5.1	Effekt von (-)-Epicatechin auf die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität	88
5.2	Effekt des Flavanol-Gemisches auf die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität....	89

5.3	Effekt von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid auf die zytokin-induzierte NF- κ B-Aktivität.....	90
6	Effekte von Kakao-Flavanolen <i>in vivo</i> (Humanstudie).....	92
6.1	Bestimmung der Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten.....	92
6.2	Humane Interventionsstudie I.....	93
6.3	Humane Interventionsstudie II.....	95
6.3.1	Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten.....	96
6.3.2	Bestimmung des Gesamtepicatechins im Serum nach Kakao-Einnahme.....	99
IV	DISKUSSION.....	103
1	Einfluss von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen.....	104
1.1	Methoden zur Bestimmung der eNOS-Aktivität: Vor- und Nachteile.....	105
1.2	Effekt von (-)-Epicatechin auf den L-Argininstoffwechsel in HUVEC	107
1.2.1	Regulation der Arginase-Expression.....	107
1.2.2	Regulation der eNOS-Aktivität.....	108
1.3	Effekt des Flavanol-Gemisches auf den L-Argininstoffwechsel in HUVEC	110
1.4	Die Rolle der eNOS und Arginase bei der endothelialen Dysfunktion	112
2	Einfluss von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel unter inflammatorischen Bedingungen	113
2.1	Regulation der iNOS und CAT-2B mRNA-Expression.....	114
2.2	Die Rolle der iNOS bei chronischen Entzündungen	115
3	Einfluss von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten	116
3.1	Bestimmung von Gesamtepicatechin im Serum	117
3.2	Regulation der Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten.....	118
4	Bedeutung der Regulation des L-Argininstoffwechsels <i>in vivo</i>	119
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	121

VI SUMMARY	123
VII LITERATURVERZEICHNIS	125
VIII ANHANG	147
1 Abkürzungsverzeichnis.....	147
2 Danksagung	149
3 Eidesstattliche Erklärung	151

I Einleitung

1 Die Aminosäure L-Arginin: Transport und Metabolismus

Neben der klassischen Bedeutung von L-Arginin als zentraler Metabolit im Harnstoffzyklus und in der Proteinbiosynthese ist sie die Aminosäure mit der höchsten Anzahl an Stickstoffatomen und repräsentiert daher den effektivsten Stickstoffträger des Intermediärstoffwechsels (vgl. Abbildung 1). Darüber hinaus wirkt L-Arginin als Zellmodulator, der die Sekretion anaboler Hormone wie z.B. *Insulin-like Growth Factor 1* stimuliert. Weiterhin spielt L-Arginin eine wichtige Rolle in der Immunantwort, da es die Freisetzung von T-Helfer Zytokinen wie Interleukin-2 und Interferon- γ fördert (Roth and Wessner, 2005).

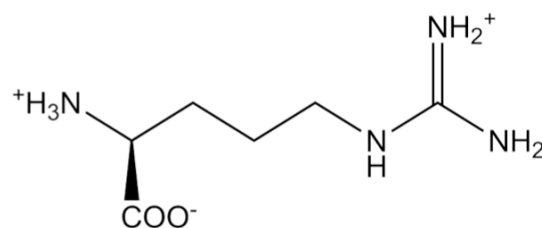


Abbildung 1: Strukturformel von L-Arginin. Molekulargewicht 174,20 g/mol.

Innerhalb des Körpers stammt freies L-Arginin entweder aus der Nahrung, dem Abbau von körpereigenem Protein oder der endogenen Synthese, wobei der Großteil des endogen synthetisierten L-Arginins durch Zusammenwirken von Dünndarm und Niere, der so genannten intestinal-renalen Achse, entsteht (Wu and Morris, 1998). Bei Neugeborenen und Heranwachsenden oder bei Trauma, Infektion und Dysfunktion der Niere ist die endogene Synthese nicht ausreichend, um den Bedarf vollständig zu decken. Deshalb wird L-Arginin beim Menschen als semiessentielle oder bedingt essentielle Aminosäure klassifiziert (Barbul, 1986; Flynn *et al.*, 2002).

Die L-Arginin-Konzentration im Plasma beträgt beim Menschen ca. 0,1 mM. Die intrazelluläre Konzentration in Endothelzellen liegt je nach Stoffwechsellaage zwischen 0,1 mM und 1,0 mM (Arnal *et al.*, 1995; Boger *et al.*, 1997). Im Plasma zirkulierendes L-Arginin passiert die für Aminosäuren impermeable Plasmamembran der Zellen über spezifische Transportproteine. Obwohl die Aufnahme über mehrere, unabhängig voneinander agierende Transportsysteme erfolgen kann, wird in den

meisten Zellen zur Passage der Plasmamembran das γ^+ -System verwendet. Charakteristisch für dieses System ist ein pH- und natriumunabhängiger Transport von kationischen Aminosäuren (L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin) über integrale Membranproteine, den CATs (*cationic amino acid transporter*) (White *et al.*, 1982). Das System umfasst drei Familienmitglieder; CAT-1, CAT-2 und CAT-3. Für einen vierten Vertreter (CAT-4) wird die Zugehörigkeit noch diskutiert, da das Protein zwar Homologien zu den CATs aufweist (Sperandeo *et al.*, 1998), jedoch keine ausreichende Transportaktivität zeigt (Wolf *et al.*, 2002). Untereinander unterscheiden sich die CAT-Proteine hinsichtlich ihres Expressionsmusters und der Transportkapazitäten (Closs and Graf, 1999; Closs and Mann, 1999). CAT-1 wird mit Ausnahme adulter Hepatozyten ubiquitär exprimiert. CAT-2 wird in die beiden Spleißvarianten CAT-2A und CAT-2B unterteilt. Diese unterscheiden sich lediglich in einer Sequenz von 42 Aminosäuren. CAT-2A wird hauptsächlich in Hepatozyten exprimiert, weist jedoch im Vergleich zu den anderen CAT-Proteinen eine zehnmal geringere Affinität zu kationischen Aminosäuren auf (Kavanaugh *et al.*, 1994). CAT-2B kommt in Muskel- und Hautzellen vor und ist zudem in verschiedenen Zellen und Geweben unter inflammatorischen Bedingungen induzierbar (Closs *et al.*, 1997). Die CAT-3 Expression findet hauptsächlich im Thymus statt. Während über die Funktion im adulten Organismus wenig bekannt ist, scheint CAT-3 eine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung zu besitzen (Vekony *et al.*, 2001).

In Säugern wird das intrazelluläre L-Arginin von verschiedenen Enzymsystemen als Substrat genutzt. Die Arginase, ein Enzym des Harnstoffzyklus, metabolisiert L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin. Letzteres bildet wiederum die Vorstufe für L-Glutamat, L-Prolin und für Polyamine, die wichtige Mediatoren des Zellwachstums und der -differenzierung sowie der Proliferation darstellen. Die Stickstoffmonoxid-Synthase bildet aus L-Arginin den vasoaktiven Mediator Stickstoffmonoxid. Weitere Enzyme des L-Argininstoffwechsels sind die Arginin-Decarboxylase, welche die Bildung von Agmatin katalysiert und die Arginin:Glycin-Amidino transferase, die L-Arginin zu Kreatin umsetzt. Damit zählt L-Arginin zu einer der metabolisch vielseitigsten Aminosäuren (Wu and Morris, 1998). Die Komplexität des L-Argininstoffwechsels ist nicht nur auf die Diversität der Enzyme zurückzuführen, sondern auch auf die Tatsache, dass diese ein zellspezifisches Expressionsmuster besitzen. Aufgrund dieser Vielseitigkeit ist es schwierig ein allgemeingültiges Schema der

L-Argininmetabolisierung *in vivo* zu erstellen. In Abbildung 2 ist ein vereinfachtes Übersichtsschema dargestellt, bei dem einzelne Isoenzyme, die gewebespezifische Expression und zelluläre Lokalisation der Enzyme nicht berücksichtigt werden.

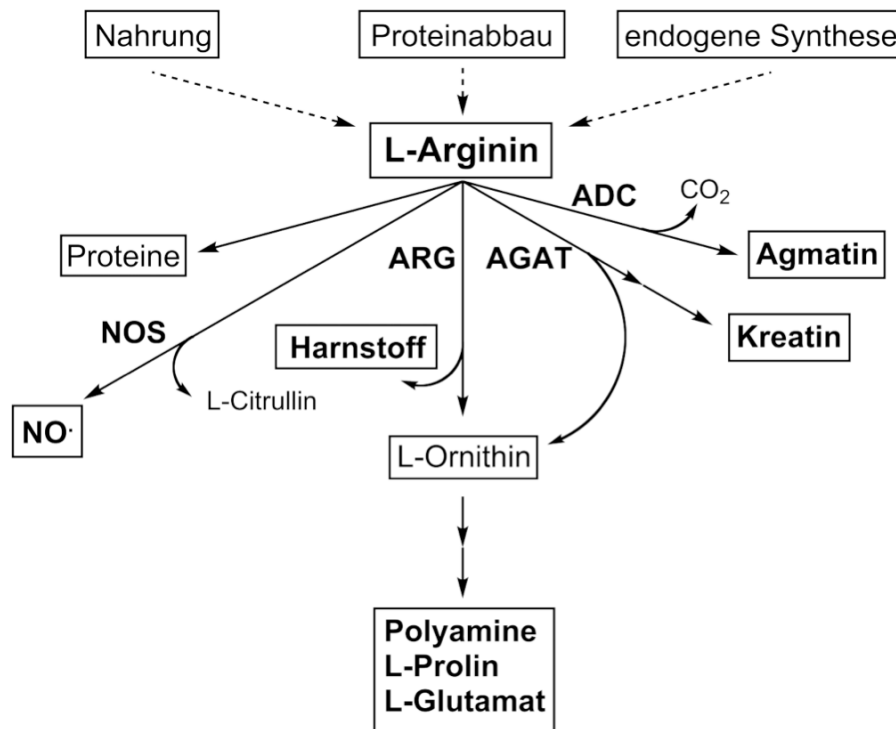


Abbildung 2: Schematische Darstellung des L-Argininstoffwechsels im Menschen. Gezeigt sind die Enzyme, die L-Arginin als Substrat nutzen: ADC: Arginin-Decarboxylase; AGAT: Arginin:Glycin-Amidino-transferase; ARG: Arginase; NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase.

2 Die Enzyme Arginase und Stickstoffmonoxid-Synthase

2.1 Arginase

Bei der Arginase handelt es sich um ein Metalloenzym, welches die manganabhängige Hydrolyse von L-Arginin zu Harnstoff und der nichtproteinogenen Aminosäure L-Ornithin katalysiert (vgl. Abbildung 3). Der Reaktionsmechanismus beruht auf einem nukleophilen Angriff auf die Guanidin-Gruppe des L-Arginins durch ein Metall-aktiviertes Hydroxidion. Das dabei entstehende Intermediat wird durch das Mangan-Zentrum des Enzyms stabilisiert. Unter Beteiligung von Wasser werden anschließend die Reaktionsprodukte Harnstoff und L-Ornithin freigesetzt (Kanyo *et al.*, 1996). Das pH-Optimum dieser Reaktion liegt bei pH 9,0-9,5 (Roholt and Greenberg, 1956). Das

aktive Enzym liegt als Homotrimer vor, wobei jede Untereinheit ein Mangan-Zentrum aufweist (Kanyo *et al.*, 1996).

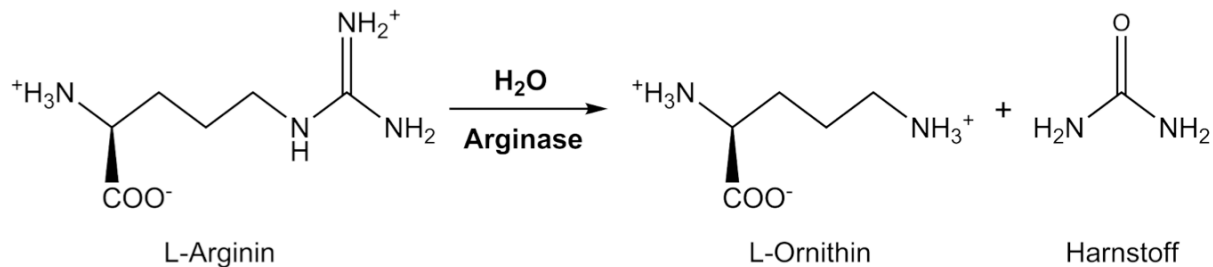


Abbildung 3: Hydrolyse von L-Arginin durch die Arginase.

In Säugern existieren zwei Isoformen, die von verschiedenen Genen kodiert werden und sich hinsichtlich ihrer molekularen und immunologischen Eigenschaften sowie Gewebeverteilung, zellulären Lokalisation und Regulation unterscheiden (Jenkinson *et al.*, 1996). Bei der Arginase-1 handelt es sich um ein zytoplasmatisches Enzym, welches hauptsächlich in der Leber konstitutiv exprimiert wird. Weiterhin kann das Enzym in anderen Geweben durch $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β sowie durch Glukokortikoide induziert werden. Im Gegensatz dazu ist Arginase-2 im Mitochondrium lokalisiert und extrahepatisch vor allem in Niere, Gehirn, Monozyten und Makrophagen konstitutiv exprimiert. Beide Arginase-Isoformen stimmen in 59% ihrer Aminosäuresequenz überein. Die aktive Arginase-1 weist ein Molekulargewicht von 105 kDa auf, während es sich bei der aktiven Arginase-2 um ein 129 kDa großes Enzym handelt. Arginase-1 katalysiert in der Leber die Reaktion von L-Arginin zu Harnstoff und ist somit an der Stickstoffausscheidung beteiligt. Die Hauptfunktion der Arginase-2 liegt dagegen in der Aufrechterhaltung der L-Arginin-Homöostase und der Kontrolle der L-Argininverfügbarkeit für metabolische Reaktionen wie der Polyamin-, Glutamat- oder Prolin-Synthese aus L-Ornithin (Haraguchi *et al.*, 1987; Kanyo *et al.*, 1992; Vockley *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1997; Colletuori *et al.*, 2001).

2.2 Stickstoffmonoxid-Synthase

Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) ist ein Flavoprotein, welches unter Verwendung von molekularem Sauerstoff und NADPH die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) katalysiert (Villiotou and Deliconstantinos, 1995). Im ersten Schritt der Reaktion wird die terminale Guanidin-Gruppe des

L-Arginins hydroxyliert. Das daraus gebildete N-Hydroxy-L-Arginin wird anschließend oxidiert, was zu der Produktion von L-Citrullin und NO führt.

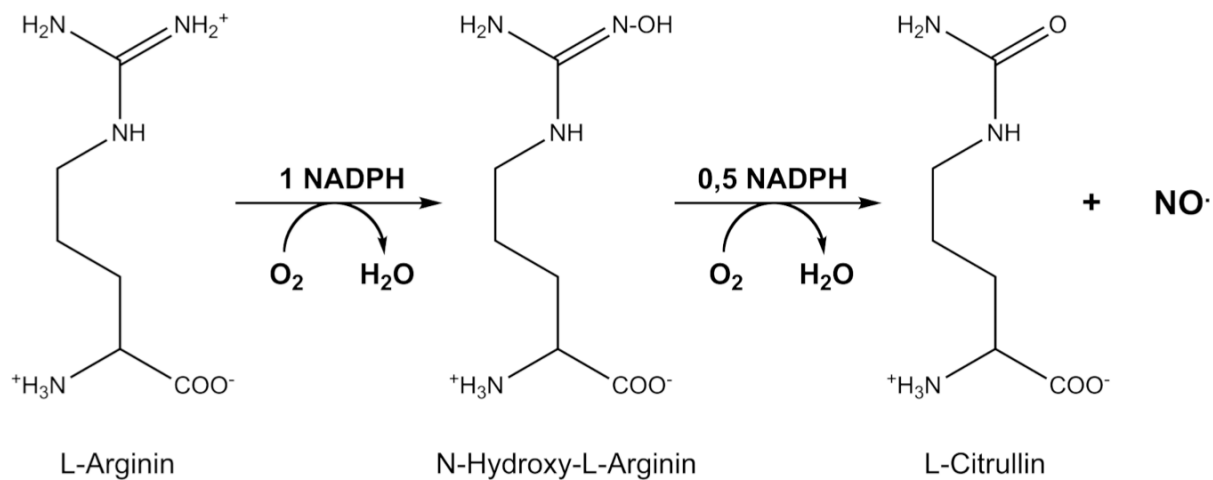


Abbildung 4: Biosynthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin, katalysiert durch die Stickstoffmonoxid-Synthase.

Für die NO-Synthese aus L-Arginin, bei der insgesamt fünf Elektronen übertragen werden, benötigt das Enzym neben NADPH die fest gebundenen Kofaktoren Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD), Häm und Tetrahydrobiopterin (BH₄) (Knowles and Moncada, 1994; Marletta, 1994; Nathan and Xie, 1994a). In der aktiven Form liegt das Enzym als Homodimer vor, wobei jede Untereinheit eine charakteristische bidomäne Struktur aufweist. Die N-terminale Oxygenase-Domäne besitzt die Bindungsstellen für Häm, BH₄ und L-Arginin und ist über die Calmodulin-Bindungsstelle mit der C-terminalen Reduktase-Domäne verbunden, welche die Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH beinhaltet. (Ghosh and Stuehr, 1995).

In Säugern sind drei Isoformen bekannt, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden und sich hinsichtlich ihrer Lokalisation, Regulation, katalytischen Eigenschaften und Inhibitorsensitivität unterscheiden. Nahezu alle Zellen enthalten eine der NOS-Isoformen (Forstermann *et al.*, 1994; Michel and Feron, 1997). Die neuronale (nNOS) und endotheliale Isoform (eNOS) werden konstitutiv exprimiert. Das gebildete NO dient als Neurotransmitter bzw. der Regulation von Blutfluss und Thrombozytenfunktion. Außer im Hirngewebe und in peripheren Nervenzellen ist die nNOS auch in Muskelzellen lokalisiert. Die eNOS konnte in Endothelzellen, Epithelzellen (z.B. Keratinozyten), Herzmyozyten, Thrombozyten und neuronalen

Zellen nachgewiesen werden (Bredt *et al.*, 1990; Marsden *et al.*, 1992; Nakane *et al.*, 1993). Die NO-Synthese der beiden konstitutiv exprimierten Isoformen erfolgt pulsativ im picomolaren Bereich und wird über die Enzymaktivität reguliert. Diese wiederum ist abhängig vom intrazellulären Kalziumspiegel, da eine Erhöhung der Kalziumkonzentration die vermehrte Bildung und anschließende Bindung von Kalzium-Calmodulin-Komplexen an das Enzym und damit dessen Aktivierung induziert (Moncada and Higgs, 1991). Weiterhin wird die Enzymaktivität über die Phosphorylierung an bestimmten Serin- und Threoninresten moduliert. Die Expression der dritten Isoform wird durch Endotoxine und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und IL-2 in vielen Geweben und Zellen induziert und wird daher als induzierbare NO-Synthase (iNOS) bezeichnet (Liew *et al.*, 1991). Die NO-Synthese erfolgt unter Stimulation kontinuierlich über Stunden bis hin zu Tagen und liegt im mikromolaren Bereich. Das in großen Mengen synthetisierte NO hat sowohl eine zyto- als auch bakteriotoxische Wirkung und dient somit der unspezifischen Immunantwort (Green and Nacy, 1993; Karupiah *et al.*, 1993; Nussler and Billiar, 1993). Im Gegensatz zu den beiden konstitutiv exprimierten NOS ist Calmodulin ohne vorhergehende Bildung eines Kalzium-Calmodulin-Komplexes fest ans Enzym gebunden, so dass die Enzymaktivität der iNOS von der intrazellulären Kalziumkonzentration unabhängig ist. Die Regulation erfolgt in diesem Falle nicht über die Enzymaktivität sondern über die Genexpression (Xie and Nathan, 1994). Die Aminosäuresequenzen der drei Isoenzyme stimmen zu 52-58% überein. Das Molekulargewicht der aktiven NOS (Homodimer) liegt zwischen 260 und 320 kDa (iNOS: 262 kDa; eNOS: 266 kDa; nNOS: 322 kDa) (Forstermann *et al.*, 1994; Geller and Billiar, 1998).

2.2.1 Biochemische Eigenschaften und zelluläre Wirkmechanismen von NO

NO besitzt eine ungerade Elektronenzahl und zählt somit zu den Radikalen. Das ungepaarte Elektron ist für die hohe Reaktionsfähigkeit und damit kurze Halbwertszeit des Moleküls in biologischen Systemen verantwortlich. NO besitzt eine hohe Membrangängigkeit, die trotz der kurzen Halbwertszeit neben autokrinen auch parakrine Wirkungen erlaubt (Moncada and Higgs, 1991). NO weist eine hohe Affinität zu Hämgruppen auf, was entscheidend für viele seiner physiologischen Funktionen ist, da Hämgruppen oder verwandte eisenhaltige prosthetische Gruppen essentiell für die Aktivität vieler Enzyme sind (Stamler, 1994). Neben eisenhaltigen

Proteinen reagiert NO auch mit schwefelhaltigen Aminosäuren und Proteinen im Blut zu S-Nitroso-Verbindungen, aus denen wieder NO freigesetzt werden kann (Stamler *et al.*, 1992b). Ein weiterer Reaktionspartner ist molekularer Sauerstoff, der NO zu Nitrit und Nitrat oxidiert, welche über die Niere ausgeschieden werden (Kelm, 1999). Das Ausmaß jeder dieser Reaktionen ist abhängig von den Bedingungen unter denen NO freigesetzt wird (physiologisch oder pathophysiologisch) und von der Konzentration der Reaktionspartner.

3 L-Argininstoffwechsel in Endothelzellen

Als Endothel wird die einzellige Schicht bezeichnet, mit der die Innenwände der Gefäße ausgekleidet sind. Es stellt ein wichtiges Gewebe mit autokrinen und parakrinen Eigenschaften dar und besitzt eine zentrale Bedeutung in der Gefäßhomöostase. Durch seine Lage zwischen vorbeiströmendem Blut und Gefäßwand interagiert das Endothel mit den zellulären und humoralen Bestandteilen beider Kompartimente. Neben der bedeutenden Barrierefunktion gehört zu den wichtigsten physiologischen Funktionen des Endothels die Regulation des Gefäßtonus und der Gefäßpermeabilität, die Kontrolle des Gefäßwachstums, die Vermittlung leukozytenadhäsiver Prozesse, sowie die Aufrechterhaltung eines antithrombotischen und profibrinolytischen Zustandes (Furchgott and Zawadzki, 1980; Vane *et al.*, 1990; Peiro *et al.*, 1995).

Eine der zentralen und bis heute am besten charakterisierten Substanzen die vom Endothel gebildet wird und die an einer Vielzahl der humoralen und zellulären Interaktionen beteiligt ist, stellt NO dar. Erst 1987 wurde entdeckt, dass das zuvor nur als Umweltgift bekannte NO vom Säuger produziert wird. Grundlegend waren dafür die Versuche von Furchgott und Zawadzki im Jahre 1980, die einen kurzlebigen Botenstoff entdeckten, der nach Stimulation mit Acetylcholin und Bradykinin vom intakten Endothel gebildet wurde und gemäß seines vasodilatierenden Effektes als *Endothelium-Derived-Relaxing-Factor* (EDRF) bezeichnet wurde (Furchgott and Zawadzki, 1980). Palmer *et al.* und Ignarro *et al.* konnten 1987 dann den Nachweis erbringen, dass es sich bei EDRF um NO handelt (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Funktionen des endothelial gebildeten NO aufgeklärt. Neben der direkten Relaxation der glatten Gefäßmuskulzellen limitiert NO auch die Proliferation dieser Zellen (Garg and Hassid, 1989).

Geringe Mengen von NO wirken außerdem antiinflammatorisch, indem die Expression von Adhäsionsmolekülen für Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten reduziert wird (Kubes *et al.*, 1991; De Caterina *et al.*, 1995). Ebenso wird die Thrombozytenadhäsion und -aggregation gesenkt und die Permeabilität der Membran vermindert (Sneddon and Vane, 1988; Radomski *et al.*, 1993). Viele der Zellantworten wie Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Wachstumsinhibierung werden über cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*) vermittelt. Die Synthese dieses „*second messenger*“ erfolgt nach Aktivierung der NO-sensitiven zytoplasmatischen Guanylatzyklase durch Wechselwirkung zwischen NO und der Hämgruppe dieses Enzyms, welches in glatten Gefäßmuskelzellen und Thrombozyten exprimiert wird (Nathan, 1992; Clementi *et al.*, 1995; Denninger and Marletta, 1999). Obwohl NO mit einer Halbwertszeit von ca. 25 ms ein extrem kurzlebiges Molekül ist, wirkt es sowohl autokrin als auch parakrin und bildet zusammen mit cGMP ein universelles Signaltransduktionssystem (Lancaster, 1994).

Zu den wichtigsten Stimuli einer NO-Bildung im Endothel zählen neben einer Reihe von zirkulierenden und lokal freigesetzten Substanzen wie Acetylcholin insbesondere auch physikochemische Stimuli wie pulsative Dehnung der Gefäßwand und Scherkräfte (Cooke *et al.*, 1991; Moncada *et al.*, 1991). Katalysator der NO-Produktion ist die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), ein Enzyme des L-Argininstoffwechsels (vgl. Kapitel I.2.2). Im Endothel sind zwei Isoformen identifiziert worden. Die konstitutiv exprimierte eNOS, die NO in physiologischen Mengen für die Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase produziert und die iNOS, welche durch proinflammatorische Stimulation (z.B. IL-1 β) induziert werden kann (Kanno *et al.*, 1994; Nathan and Xie, 1994a). Die dabei erreichte intrazelluläre NO-Konzentration übersteigt die NO-Synthese durch die eNOS um das 100 bis 1000-fache, was zur Abwehr von Mikroorganismen genutzt wird, aber auch Zelltod und Gewebeschädigung zur Folge hat (Stenger *et al.*, 1994; Pfeilschifter *et al.*, 1996). Unter physiologischen Bedingungen gelangt das Substrat L-Arginin über den kationischen Aminosäuretransporter 1 (CAT-1) in die Zellen. Während einer Entzündung wird mit der iNOS der kationische Aminosäuretransporter 2B (CAT-2B) koexprimiert, sodass vermehrt L-Arginin in die Zelle transportiert werden kann, welches bevorzugt zu NO (durch die iNOS) umgesetzt wird (Nathan and Xie, 1994a; Closs *et al.*, 1997; Bansal and Ochoa, 2003).

Das Endothel reagiert kontinuierlich auf unterschiedliche Einflüsse und garantiert somit eine an den jeweiligen Bedarf angepasste NO-Freisetzung.

Der größte Teil des intrazellulären L-Arginins wird nicht von der eNOS, sondern der Arginase metabolisiert. Humane Endothelzellen exprimieren grundsätzlich beide Arginase-Isoformen (Arginase-1 und -2) (Buga *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001; Bachetti *et al.*, 2004), hauptsächlich ist aber die Arginase-2 vorhanden, die überwiegend mitochondrial lokalisiert ist (Lim *et al.*, 2007). Aufgrund der Beeinflussung der intrazellulären L-Argininverfügbarkeit ist die Arginase in der Lage die NO-Synthese zu regulieren. So führen hohe endotheliale Arginase-Aktivitäten zu einem verminderten L-Arginin-Angebot für die eNOS, was mit einer reduzierten NO-Synthese einhergeht. Das umgekehrte Phänomen, eine Regulation der Arginase durch die eNOS, konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden (Ming *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007). Eine weitere Funktion der Arginase liegt in der Bereitstellung von L-Ornithin, einem Produkt der L-Arginin-Umsetzung (vgl. Abbildung 3). Diese nichtproteinogene Aminosäure dient der Polyaminsynthese, die essentiell für die Proliferation von Endothelzellen ist (Morrison and Seidel, 1995; Li *et al.*, 2002). Des Weiteren kann L-Ornithin zu L-Prolin umgewandelt werden, das für die Biosynthese von Kollagen, einem Prolin-reichen Protein, genutzt wird. Kollagen wiederum ist ein wichtiges Strukturprotein des Bindegewebes, das sich zwischen Endothelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen befindet (Li *et al.*, 2001).

Die Arginase spielt somit eine wichtige Rolle für die Endothelfunktion durch Regulation der NO-Synthese über die L-Argininverfügbarkeit sowie für Wundheilung und Angiogenese durch Bereitstellung von L-Ornithin.

In Abbildung 5 ist eine vereinfachte Zusammenfassung des L-Argininstoffwechsels in humanen Endothelzellen gegeben.

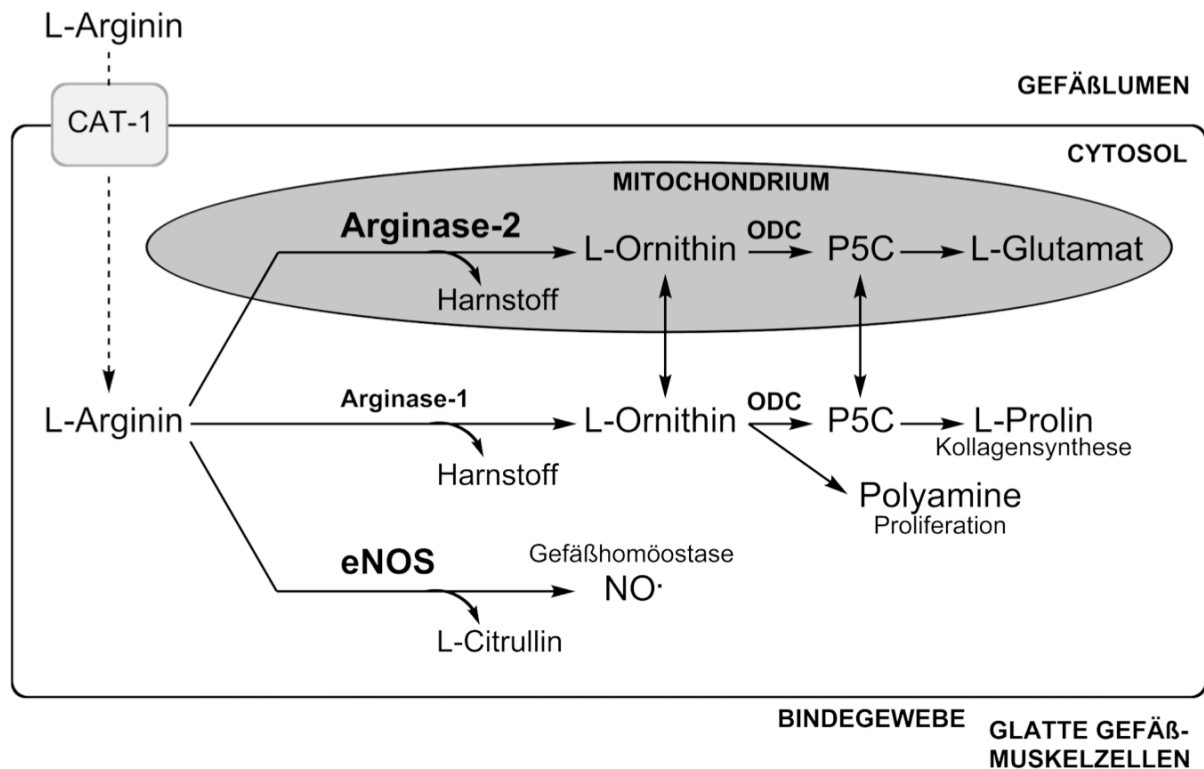


Abbildung 5: Schematische Darstellung des L-Argininstoffwechsels in humanen Endothelzellen. Die iNOS und CAT-2B, welche erst unter inflammatorischen Bedingungen koexprimiert werden, sind nicht dargestellt. CAT-1: kationischer Aminosäuretransporter 1; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; NO: Stickstoffmonoxid; ODC: Ornithin-Decarboxylase; P5C: Pyrrolin-5-Carboxylat. Verändert nach Huynh and Chin-Dusting, 2006.

4 L-Arginin/NO-Stoffwechsel in Erythrozyten

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass endothelial gebildetes NO aufgrund der äußerst geringen Halbwertszeit ausschließlich parakrin in der Gefäßwand wirkt und somit für die lokale Kontrolle des Gefäßtonus und des Blutflusses wichtig ist. Der größte Teil des im Endothel gebildeten NO reagiert im Plasma in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff unmittelbar zu Nitrit. Dieses diffundiert in Erythrozyten und wird anschließend in Gegenwart von oxygeniertem Hämoglobin (Häm-Fe²⁺) im Erythrozyten unter Methämoglobinbildung (Häm-Fe³⁺) zu Nitrat kooxidiert. Nitrat stellt das stabile vasoinaktive Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges dar und wird mit dem Urin ausgeschieden. Alternativ kann NO direkt in Erythrozyten diffundieren und dort mit oxygeniertem Hämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin reagieren (Kelm, 1999). Neben molekularem Sauerstoff können auch reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale,

die in unterschiedlichen Konzentrationen und in verschiedenen Zellen und Organen vorkommen, am Abbau von NO beteiligt sein (Sies, 1991). Mittlerweile gibt es jedoch Hinweise, dass NO in bioaktiver Form an Thiole gebunden gespeichert, transportiert und somit auch systemisch (endokrin) wirksam werden kann (Stamler *et al.*, 1992b). Im humanen Plasma wurden langlebige S-Nitrosothiole im nano- bis mikromolaren Bereich nachgewiesen, die eine Halbwertszeit von bis zu 40 min aufweisen. Sie entstehen durch Reaktion von NO mit den Thiolgruppen von im Plasma zirkulierenden Proteinen oder freien Aminosäuren (Kelm, 1999; Rassaf *et al.*, 2002). Mit mehr als 80% stellt S-Nitrosoalbumin den größten Teil der S-Nitrosothiole im Plasma dar (Stamler *et al.*, 1992a). In niedrigeren Konzentrationen liegen S-Nitrosoglutathion und S-Nitrosocystein vor (Butler and Rhodes, 1997). Die NO-Freisetzung aus den plasmatischen Speichern erfolgt durch Reaktion mit Übergangsmetallen (v.a. Cu^{2+} -Ionen) (Al-Sa'doni *et al.*, 1997) oder Ascorbat (Scorza *et al.*, 1997).

Primär erfüllen Erythrozyten im Organismus die lebenswichtige Aufgabe des Gastransportes. Sauerstoff, welcher reversibel an das zweiwertige Häm-Eisen angelagert ist (Oxygenierung), wird ins Gewebe und im Austausch ein Teil des dort entstandenen Kohlendioxids zur Lunge transportiert. Bei Erythrozyten handelt es sich um zellorganellfreie Blutzellen, die lediglich durch ihre Membran vom Blutplasma abgegrenzt sind. Sie besitzen eine bikonkave Form, wodurch sie verglichen mit runden Zellen, besser deformierbar sind. Aufgrund des hohen Hämoglobingehaltes (ca. 66% der erythrozytären Proteine) und der Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin zu Nitrit und Nitrat, wurden Erythrozyten im Zusammenhang mit NO ausschließlich als NO-abbauende Blutbestandteile betrachtet (Doyle and Hoekstra, 1981; Lancaster, 1994; Kelm, 1999). Kürzlich wurde gezeigt, dass Erythrozyten NO auch reversibel binden können, transportieren und innerhalb des kardiovaskulären Systems wieder freisetzen (Jia *et al.*, 1996; Gow *et al.*, 1999; Wolzt *et al.*, 1999; Gladwin *et al.*, 2000; McMahon *et al.*, 2000; McMahon *et al.*, 2002; Schechter and Gladwin, 2003). Dies erfolgt nach Oxygenierung des Häms in der Lunge durch Bindung von NO an das Cystein-93 des Hämoglobins, was in einer Bildung von S-Nitrosohämoglobin (SNO-Hb) resultiert, wodurch das NO in einem bioaktiven Status bleibt. In der Peripherie wird der Sauerstoff wieder abgegeben und das Oxyhämoglobin geht von der entspannten Form in die gespannte Desoxyhämoglobin-Form über. Diese Strukturänderung führt auch zur Freisetzung

des am Cystein-93 gebundenen NO, was wiederum eine Gefäßdilatation zur Folge hat (Jia *et al.*, 1996; Stamler *et al.*, 1997; Singel and Stamler, 2005). Neben den Thiolgruppen im Hämprotein bindet NO auch an das zweiwertige Eisen im Desoxyhämoglobin, wodurch Nitrosylhämoglobin (Hb(FeII)-NO) entsteht (Gross and Lane, 1999). Beide Intermediate (Nitroso- und Nitrosylhämoglobin) dienen als stabile Speicher von NO, die später bioaktives NO freisetzen können. Dabei ist die arterielle und venöse Verteilung von Hb(FeII)-NO umgekehrt zu jener von SNO-Hb. Die Konzentration von Hb(FeII)-NO ist in desoxygenierten Erythrozyten höher, was darauf hindeutet, dass der Anteil an nitrosylierten Hämprotein-Thiolen und nitrosyliertem Häm-Eisen vom Oxygenierungsstatus des Blutes abhängig ist (Jia *et al.*, 1996). Neben dem Hämoglobin ist auch Glutathion (GSH), welches ebenfalls in hoher Konzentration im Erythrozyten vorkommt, am NO-Stoffwechsel beteiligt. Die Thiolgruppe des GSH reagiert mit NO zu S-Nitrosoglutathion (GSNO). Dieses kann NO später unter sauren Bedingungen wieder abgeben (Hogg *et al.*, 1996).

Erythrozyten scheinen jedoch nicht nur passiv über SNO-Hb, Hb(FeII)-NO und GSNO am NO-Stoffwechsel beteiligt zu sein. Neuere Untersuchungen bestätigen eine ältere Hypothese von Doyle *et al.*, nach der auch im humanen Organismus NO aus Nitrit gebildet werden kann (Doyle and Hoekstra, 1981). Es konnte gezeigt werden, dass intraerythrozytär gespeichertes Nitrit nichtenzymatisch durch das reduktive Potential von Desoxyhämoglobin bei niedriger Sauerstoffkonzentration in NO umgewandelt wird (Reutov and Sorokina, 1998; Cosby *et al.*, 2003; Dejam *et al.*, 2004; Robinson and Lancaster, 2005; Singel and Stamler, 2005). Die enzymatische Synthese des in der Blutzirkulation befindlichen NO wurde bis vor kurzem ausschließlich dem Endothel zugeschrieben. Kleinbongard *et al.* konnten zeigen, dass neben den Endothelzellen auch humane Erythrozyten eine aktive und funktionelle NOS besitzen, die NO aus L-Arginin in physiologisch relevanten Mengen synthetisiert und zum zirkulierenden NO-Pool beiträgt (Kleinbongard *et al.*, 2006). In mittels *Gold-Labeling* untersuchten Gefrierschnitten konnte die erythrozytäre NOS sowohl im Zytoplasma als auch in der Plasmamembran von Erythrozyten lokalisiert werden. Reguliert wird sie wie die endotheliale Isoform durch die Konzentration ihres Substrats L-Arginin, durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration und Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten. Das synthetisierte NO dient nicht nur zur Aufrechterhaltung des zirkulierenden NO-Pools und der Vasodilatation, sondern

inhibiert auch die Thrombozytenaggregation (Radomski *et al.*, 1992; de Belder *et al.*, 1994). Weiterhin hat es Einfluss auf die Deformierbarkeit der Erythrozytenmembran, was entscheidend für die Passage durch die Mikrovaskulation ist (Bor-Kucukatay *et al.*, 2003; Kleinbongard *et al.*, 2006).

Neben der eNOS weisen humane Erythrozyten noch ein weiteres Enzym des L-Argininstoffwechsels auf. Verschiedene Veröffentlichungen belegen das Vorhandensein der Arginase. Ihr gemeinsames Substrat L-Arginin gelangt wie auch bei Endothelzellen über den kationischen Aminosäuretransporter-1 (CAT-1) in die Erythrozyten (Angelo *et al.*, 1996; Shima *et al.*, 2006). Die kernhaltigen Vorläuferzellen exprimieren beide Isoformen (Arginase-1 und -2), während in reifen Erythrozyten ausschließlich die Arginase-1 detektiert wird (Azizi *et al.*, 1970; Beruter *et al.*, 1978; Spector *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 2002). Die Bestimmung der Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten dient z.B. zur Diagnose der selten vererbten Harnstoffzyklus-Stoffwechselkrankheit Hyperargininämie (Arginase-1-Defizienz) (Michels and Beaudet, 1978; Grody *et al.*, 1989).

In Abbildung 6 ist der L-Arginin- und NO-Stoffwechsel in Erythrozyten zusammengefasst.

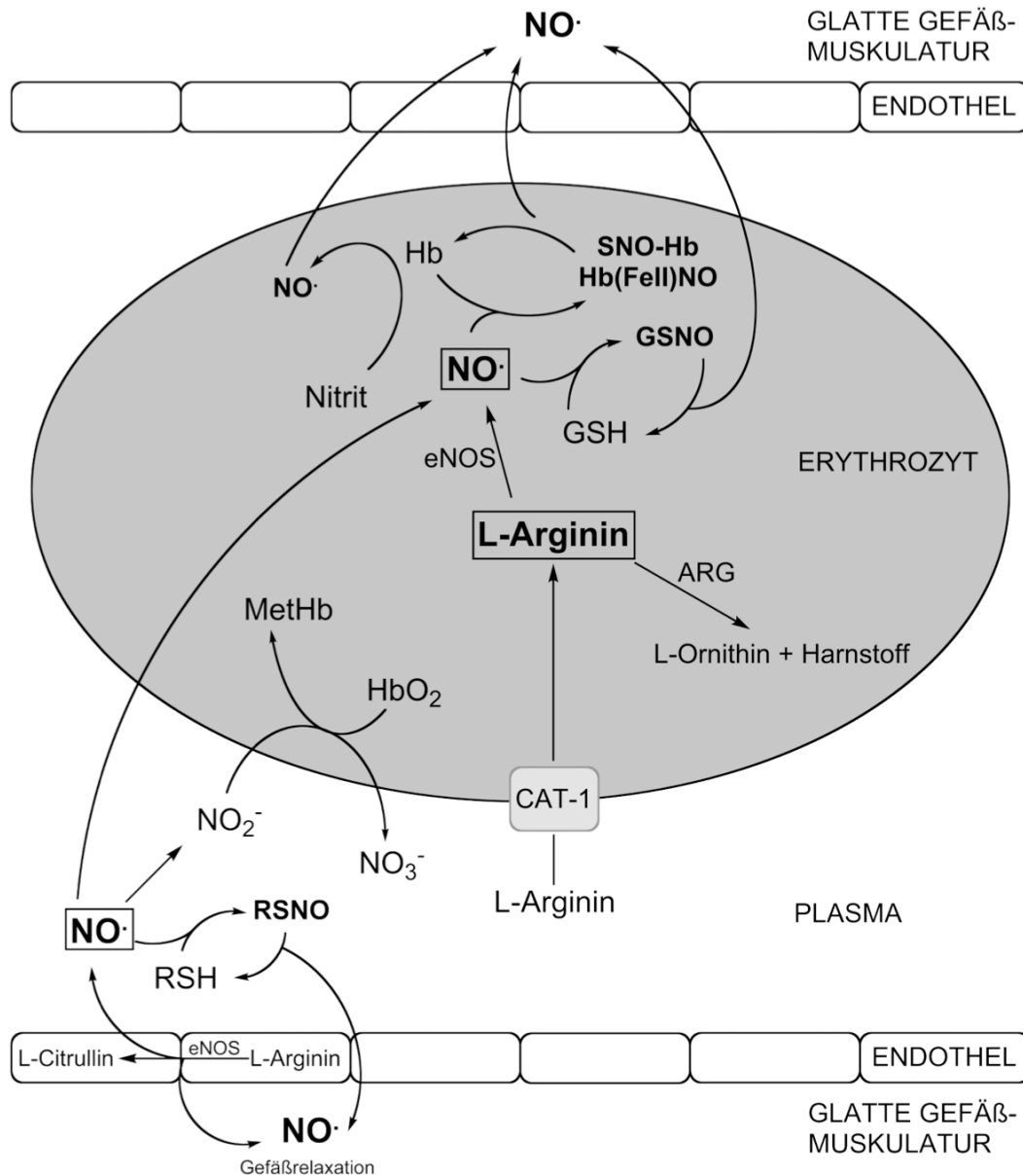


Abbildung 6: Schematische Darstellung des L-Arginin/NO-Stoffwechsels in humanen Erythrozyten. ARG: Arginase-1; CAT-1: kationischer Aminosäuretransporter 1; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; GSH: Glutathion; GSNO: S-Nitrosoglutathion; Hb: Hämoglobin; HbO₂: Oxyhämoglobin (Fe²⁺); MetHb: Methämoglobin (Fe³⁺); SNO-Hb: S-Nitrosohämoglobin (am Cystein-93); Hb(Fell)-NO: Nitrosylhämoglobin; NO: Stickstoffmonoxid; NO₂⁻: Nitrit; NO₃⁻: Nitrat (stabiles Oxidationsprodukt von NO); RSH: Thiolgruppen in Plasmaproteinen oder freien Aminosäuren; RSNO: S-Nitrosothiole (S-Nitrosoalbumin, -cystein und -glutathion).

Erythrozyten sind somit nicht nur Abbauort von NO, sondern auch ein regulatorischer Bestandteil der vaskulären NO-Verfügbarkeit. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation des Gefäßtonus und Thrombozytenaggregation ein und tragen damit neben dem Endothel zur Gefäßhomöostase bei.

5 Kakao - nicht nur ein Genussmittel

Der uns heute bekannte Kakao wird durch Röstung der getrockneten und anschließend fermentierten Kakaobohnen (Samen) des Kakaobaums *Theobroma cacao* gewonnen. Bereits mehr als tausend Jahre v. Chr. wurde Kakao von den Olmeken in der Region am Golf von Mexiko konsumiert. Bei mittelamerikanischen Kulturen wie den Mayas und Azteken war 600 v. Chr. der Genuss von Kakao nur Mitgliedern des höheren Standes vorbehalten (Hurst *et al.*, 2002). Aus diesem Grund gab der schwedische Botaniker Carl von Linné dem Kakaobaum den Namen *Theobroma cacao* (aus griech. *theos*: „Gott“ und *broma*: „Speise“). Mit der Eroberung des Aztekenreiches durch die Spanier gelangte der Kakao im 16. Jahrhundert nach Europa. Schon seit mehreren Jahrhunderten wird dem Kakao eine heilende Wirkung zugeschrieben. Bei den Mayas und Azteken handelte es sich quasi um ein „Allround-Heilmittel“, welches bei Magenschmerzen, Darmblutungen, Wunddesinfektionen, aber auch zur Geburtseinleitung und zur Behandlung von äußeren Entzündungen und Wundstellen verwendet wurde. Auch die Europäer verwendeten den Kakao zu medizinischen Zwecken wie z.B. zur Gewichtszunahme, zur Stimulation des Nervensystems und zur Verbesserung der Nieren- und Blasenfunktion. Mehr als 100 Indikationen für den medizinischen Einsatz des Kakaos sind überliefert (Dillinger *et al.*, 2000).

Die gesundheitsfördernde Wirkung des Kakaos wird heutzutage bestimmten Inhaltsstoffen zugeschrieben, u.a. den Flavonoiden. Dabei handelt es sich um sekundäre Pflanzenstoffe, die neben Phenolsäuren, Lignanen und Stilbenen zu den pflanzlichen Polyphenolen gehören. Sie sind ubiquitär in pflanzlicher Nahrung (Gemüse, Obst, Nüssen, Getreide, Hülsenfrüchten etc.) und in Getränken (Wein, Bier, Tee, Kakao etc.) vorhanden (Scalbert and Williamson, 2000). Als Farb- oder Geschmacksstoffe dienen sie den Pflanzen zur Abwehr von Fraßfeinden oder zum Anlocken von Insekten für die Bestäubung. Weiterhin schützen Flavonoide die Pflanze gegen Schädigung durch UV-Licht und dienen als Abwehrstoffe gegen Pilz- und Bakterien-Infektionen. Allen gemein ist das trizyklische Grundgerüst (C₆-C₃-C₆), dem Flavan (2-Phenylchroman), eine aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) aufgebaute C₁₅-Struktur (vgl. Abbildung 7).

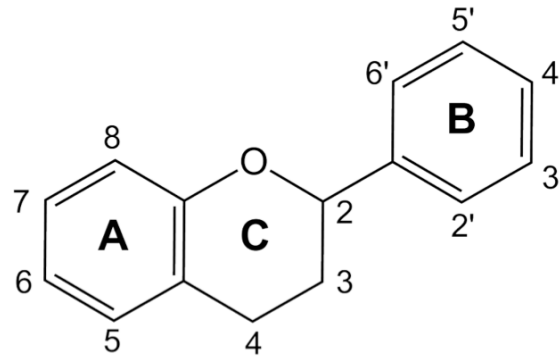
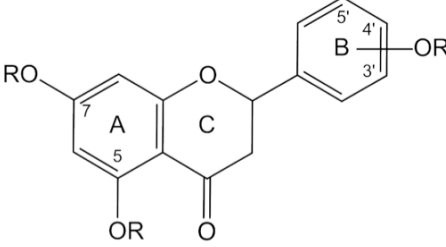
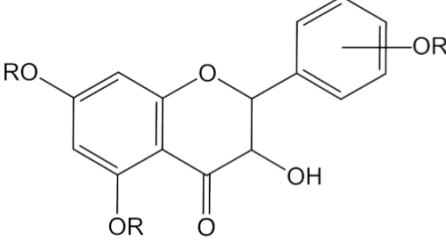
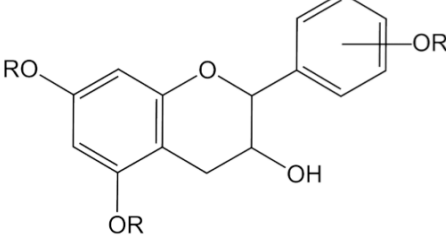
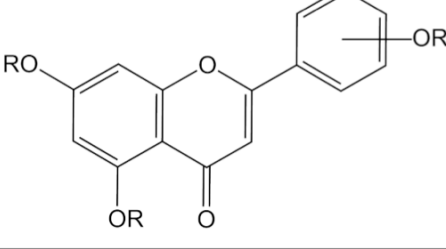
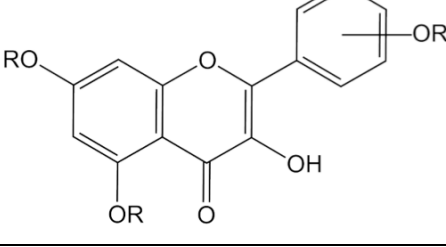
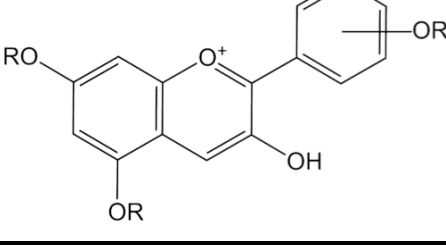


Abbildung 7: Flavan (2-Phenylchroman): Das Grundgerüst der Flavonoide .

Die Flavonoide werden nach dem Oxidationsgrad des C-Rings in verschiedene Klassen eingeteilt: Flavanone, Flavanonole, Flavanole, die auch als Catechine bezeichnet werden, Flavone, Flavonole und Anthocyanidine (vgl. Tabelle 1). Das Grundgerüst kann zahlreiche Substituenten tragen. Ring A weist in vielen Fällen Hydroxylgruppen an den Positionen 5 und 7 auf, Ring B kann in 4'-Position, 3',4'-Position oder in 3',4',5'-Position hydroxyliert sein, wobei meist die 3',4'-Dihydroxylierung vorliegt (Rice-Evans *et al.*, 1996; Croft, 1998). Die Hydroxylgruppen können wiederum alkyliert, acyliert, sulfatiert oder mit Mono-, Di- und seltener auch Trisacchariden verknüpft sein. Während Hydroxylgruppen und Zuckerreste die Wasserlöslichkeit erhöhen, machen andere Substituenten wie Methoxy- oder Acylgruppen Flavonoide lipophil. Derzeit sind etwa 6500 verschiedene Flavonoide bekannt.

Tabelle 1: Flavonoid-Klassen mit dem typischen Hydroxylierungsmuster. Die Einteilung erfolgt anhand des Oxidationsgrades des C-Rings. Die Hydroxylierung im B-Ring kann in 4'-, 3',4'- oder 3',4',5'-Position erfolgen. R = H, Alkylrest, Acylrest, Sulfat oder Zucker. Verändert nach Watzl and Rechkemmer, 2001.

Flavonoid	Struktur	Beispiel	Vorkommen (z.B.)
Flavanone		Hesperidin Naringenin	Orange Grapefruit
Flavanonole		Taxifolin	Ginkgo
Flavanole (Catechine)		Catechin Epicatechin	Rotwein Dunkle Schokolade
Flavone		Apigenin Luteolin	Paprika Sellerie
Flavonole		Kämpferol Quercetin	Endivie Zwiebeln
Anthocyanidine		Cyanidin Malvidin	Kirschen Rote Trauben

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens werden Flavonoide mit nahezu jedem pflanzlichen Nahrungsmittel eingenommen. Die tägliche Aufnahme ist jedoch abhängig von der Esskultur in verschiedenen geographischen Regionen und verbunden mit den verwendeten Nahrungsmitteln. Eine Bestimmung der täglichen Flavonoidaufnahme ist daher schwierig. In der Literatur schwanken die Angaben bezüglich der Flavonoidaufnahme zwischen 20 mg und 1 g pro Tag (Kühnau, 1976; Hertog *et al.*, 1993). Hollman und Katan beschreiben eine durchschnittliche Flavonoidaufnahme von mehreren hundert Milligramm pro Tag (Hollman and Katan, 1999). Nach Scalbert und Williamson werden mit der Nahrung (insbesondere Früchte und Getränke) pro Tag ca. 1 g Polyphenole aufgenommen. Ein Drittel davon machen Phenolsäuren aus, bei den restlichen zwei Dritteln handelt es sich um Flavonoide. Unter den Flavonoiden werden hauptsächlich Flavanole in monomerer und polymerer Form (Procyanidine), sowie Anthocyane konsumiert (Scalbert and Williamson, 2000). Die tägliche Anthocyanaufnahme (vorwiegend über Beeren, Rotwein und Säfte) beträgt ungefähr 80 mg. Die durchschnittliche Flavanolaufnahme beläuft sich auf ca. 18-50 mg/d (Monomere) und 100-500 mg/d (Procyanidine) (Deprez *et al.*, 2000; Manach *et al.*, 2005). Die vorherrschenden Aufnahmequellen sind dabei Beeren, Rotwein, Tee, Äpfel und Kakao (Sanoner *et al.*, 1999; Foo *et al.*, 2000; Auger *et al.*, 2004).

5.1 Flavonoide in Kakaobohnen

Innerhalb der Kakaobohne werden Flavonoide in so genannten Polyphenolspeicherezellen (Pigmentzellen) der Kotyledonen (Keimblätter) gespeichert. Der Flavonoidanteil in unfermentierten (frischen) Kakaobohnen beträgt 12-18% der entfetteten Trockenmasse (im Folgenden abgekürzt als ff TM) (Bravo, 1998). Ausgehend vom Gesamtflavonoidgehalt gehören 37% zu den Flavanolen, 58% zu den aus ihnen gebildeten oligo- und polymeren Procyanidinen und 4% zu den Anthocyanen. Das restliche 1 % setzt sich aus verschiedenen Flavonoidklassen zusammen, die nur einen geringen Gehalt in Kakaobohnen aufweisen (Adamson *et al.*, 1999; Hammerstone *et al.*, 1999; Lazarus *et al.*, 1999; Hammerstone *et al.*, 2000).

Unter den Flavanolen dominiert das, in Kakaobohnen 1931 erstmals identifizierte, monomere (-)-Epicatechin (Adam *et al.*, 1931). Der Anteil in unfermentierten Kakaobohnen schwankt in Abhängigkeit von der Kakaosorte, dem Reifegrad und der

Anbautechnik zwischen dem niedrigsten gemessenen Wert von 15 g und dem höchsten von 43 g pro kg ff TM. Der Gehalt des entsprechenden diastereomeren Moleküls (+)-Catechin ist im Keimblatt unfermentierter reifer Kakaobohnen deutlich geringer (0,14 bis 0,65 g pro kg ff TM) (Kim and Keeney, 1984; Gotti *et al.*, 2006; Tomas-Barberán *et al.*, 2007). Neben den monomeren Flavanolen (-)-Epicatechin und (+)-Catechin enthält das Speicherkeimblattgewebe der Kakaobohnen auch oxidativ oligomerisierte Flavanole, die Proanthocyanidine. Solche, die nur aus Catechin- und/oder Epicatechin-Untereinheiten bestehen, bezeichnet man als Procyanidine. Anhand der Polymerisierungsposition unterscheidet man den A-Typ und den in der Natur weitaus häufigeren B-Typ. Bei letzterem findet die oxidative Kondensation der Flavanol-Untereinheiten zwischen dem Kohlenstoff C4 und dem Kohlenstoff C6 oder C8 der benachbarten Flavanoleinheit statt. Aufgrund der Dominanz von (-)-Epicatechin setzen sich die Procyanidine in Kakaobohnen hauptsächlich aus (-)-Epicatechin-Untereinheiten zusammen. In der Literatur werden Procyanidine mit bis zu 12 Untereinheiten (Dodecamer) in unfermentierten reifen Kakaobohnen beschrieben (Porter *et al.*, 1991; Hammerstone *et al.*, 1999). Das mengenmäßig wichtigste Procyanidin in Kakaobohnen stellt das Dimer B2 dar, gefolgt von dem Trimer C1 und dem Dimer B5 (vgl. Abbildung 8).

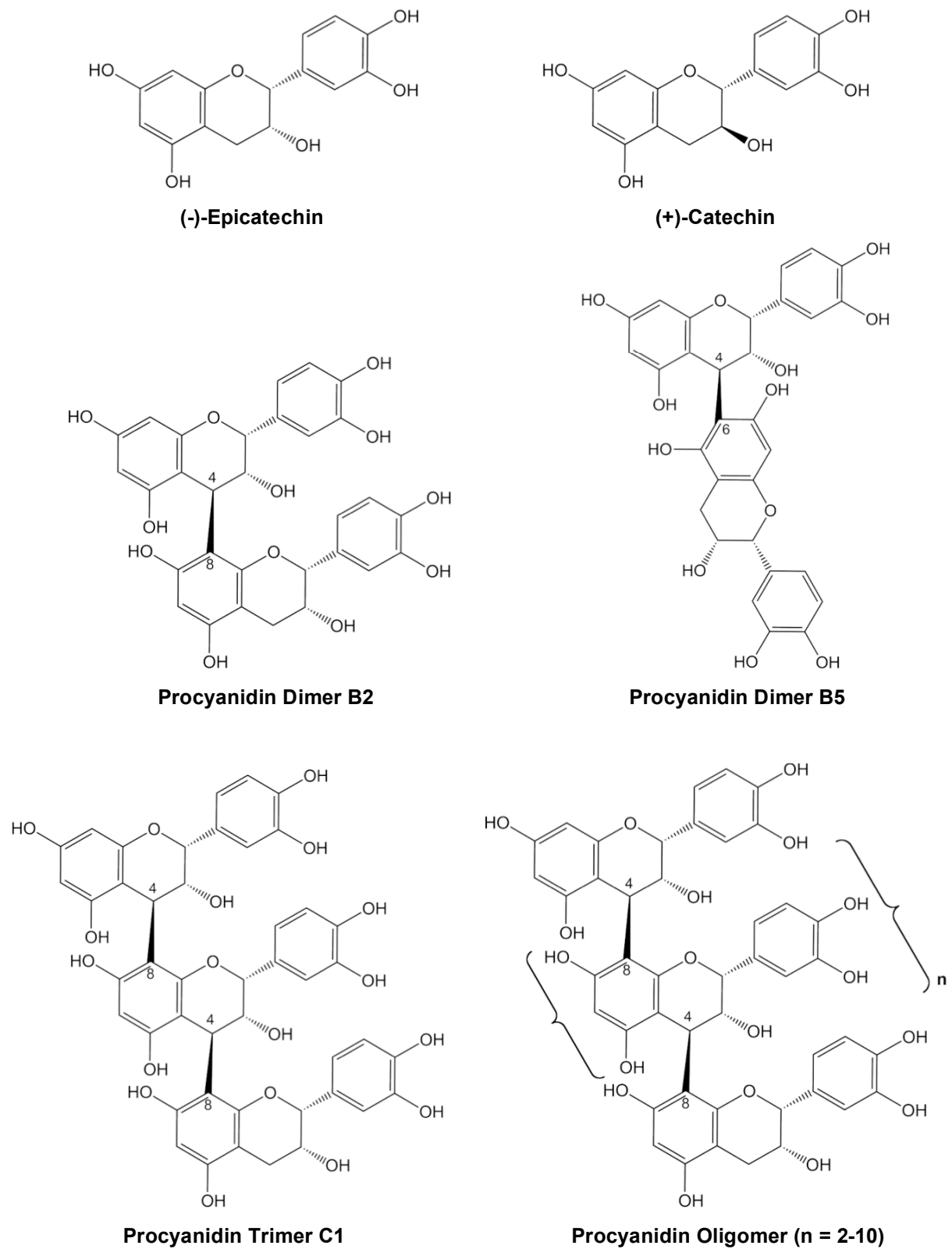


Abbildung 8: Haupt-Flavonoide in Kakaobohnen (*Theobroma cacao*).

Anthocyane, die mit 4% des Flavonoidanteils in Kakaobohnen vertreten sind, werden in unterschiedlicher Konzentration in die Polyphenolspeicherzellen der Keimblätter eingelagert, deren Färbung dadurch von Tiefviolett über Rosa bis zu Gelblich-Weiß variiert. Die mengenmäßig wichtigsten Anthocyane sind Cyanidin-3- β -D-Galaktosid und Cyanidin-3- α -L-Arabinosid (Forsyth and Quesnel, 1957).

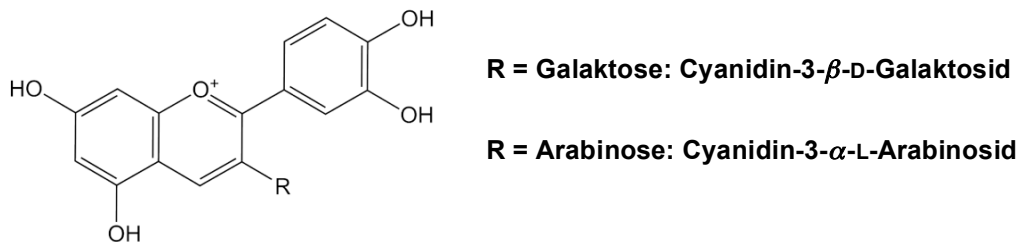


Abbildung 9: Anthocyane in Kakaobohnen (*Theobroma cacao*).

Forsyth et al. konnten in Kakaobohnen erstmals ein weiteres diastereomeres Flavanolpaar, (-)-Epigallocatechin und (+)-Gallocatechin, in geringen Mengen identifizieren (Forsyth, 1955). Das Vorkommen der beiden Flavanole konnte in jüngeren Publikationen jedoch nicht immer bestätigt werden. Sánchez-Rabaneda et al. konnten trotz gezielter Suche nicht einmal Spuren von (-)-Epigallocatechin und (+)-Gallocatechin in Kakaobohnen nachweisen (Sánchez-Rabaneda et al., 2003).

Neben den dominierenden B-Typ Procyanidinen konnten auch dimere und trimere Procyanidine des A-Typs identifiziert werden, die mit Arabinose oder Galaktose verknüpft sind. Im A-Typ sind die Flavanol-Untereinheiten neben der Kohlenstoffbindung zwischen C4 und C8 durch eine weitere Etherbindung zwischen dem Kohlenstoff C2 und dem Sauerstoff O7 verknüpft. Am häufigsten ist der Kohlenstoff C4 mit dem Kohlenstoff C8 und der Kohlenstoff C2 mit dem Sauerstoff O7 der benachbarten Untereinheit verbunden. Im Falle des trimeren Procyanidins sind die Flavanoleinheiten mit einer A-Typ-Bindung (zwei Bindungsstellen) und einer B-Typ-Bindung (eine Bindungsstelle) verknüpft (Porter et al., 1991; Hatano et al., 2002).

In geringen Mengen konnte auch das Flavonol Quercetin und einige seiner Glykoside in Kakaobohnen gefunden werden (Jalal and Collin, 1977; Sánchez-Rabaneda et al., 2003).

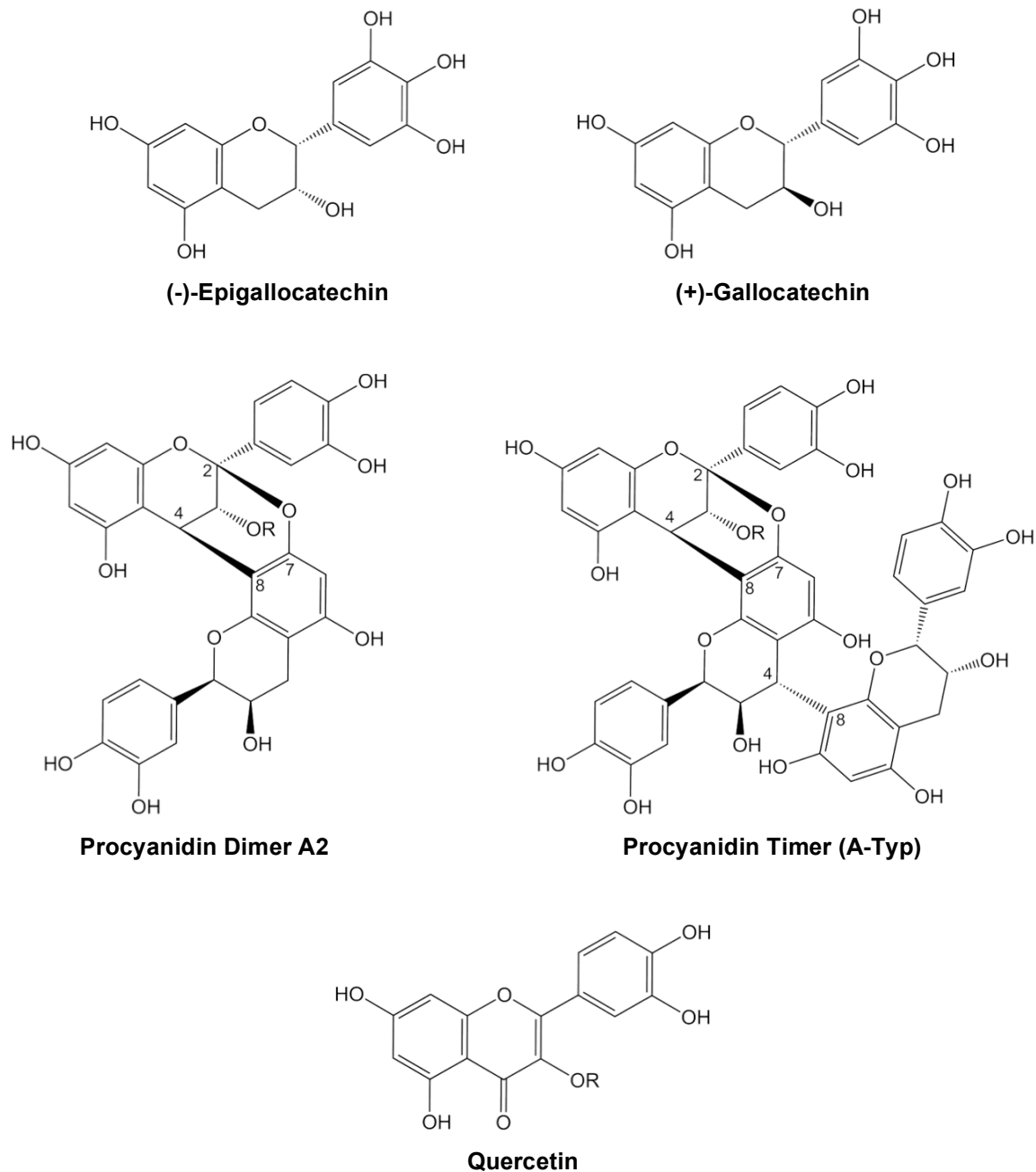


Abbildung 10: Flavonoide, die in geringen Mengen in Kakaobohnen von *Theobroma cacao* enthalten sind. Flavanole: (-)-Epigallocatechin und (+)-Gallocatechin; A-Typ Procyanidine: R = H, Arabinose oder Galaktose; Flavonol: Quercetin, R = H, Arabinose, Glukose, Galaktose oder Glukuronsäure.

In der Literatur wird auch das Vorkommen bestimmter Flavone (Apigenin, Luteolin und einige der Glykoside) und Flavanone (Naringenin und dessen 7-O-Glukosid) beschrieben (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003; Tomas-Barberán *et al.*, 2007). Da diese jedoch nur in Spuren im Keimblattgewebe der Kakaobohnen vorhanden sind, ist anzunehmen, dass sie bezüglich des Gesamtflavonoidgehaltes von untergeordneter Bedeutung sind.

5.2 Physiologische Effekte von Flavonoiden

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass ein bestimmtes Ernährungsverhalten den allgemeinen Gesundheitszustand beeinflussen und vor chronischen Krankheiten schützen kann. Epidemiologische Studien weisen auf eine inverse Korrelation zwischen dem regelmäßigen Konsum Flavonoid-reicher Lebensmittel und dem Risiko für bestimmte Krebserkrankungen (Knekt *et al.*, 1997), Schlaganfälle (Keli *et al.*, 1996) und koronare Herzerkrankungen hin (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1995; Knekt *et al.*, 1996; Rimm *et al.*, 1996; Hertog *et al.*, 1997). Ähnliche Effekte werden auch für Flavanol-reiche Nahrungsmittel beschrieben. Die Einnahme Flavanol-reicher Produkte wie Tee, Rotwein und Fruchtsäfte führt entsprechend epidemiologischer Studien zu einem verminderten Risiko für bestimmte Krebserkrankungen, Immundysfunktionen und koronare Herzerkrankungen (Nakachi *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 2004; Janszky *et al.*, 2005; Williamson and Manach, 2005). Neuere Studien belegen dies auch für Kakao und Schokolade (Wan *et al.*, 2001; Carnesecchi *et al.*, 2002; Engler *et al.*, 2004; Alspach, 2007; Cooper *et al.*, 2008). Zurückzuführen ist dies vermutlich auf Flavanol-vermittelte Effekte wie z.B. die Verbesserung der Vasodilatation (Fisher *et al.*, 2003; Heiss *et al.*, 2003), die Senkung des Blutdrucks (Taubert *et al.*, 2003), die Modulation der Insulin-Resistenz und Glukose-Toleranz (Grassi *et al.*, 2005), der verminderten Thrombozyten-reaktivität (Holt *et al.*, 2002b) und die Verbesserung der Immunantwort und des antioxidativen Abwehrsystems (Keen *et al.*, 2005; Sies *et al.*, 2005). Die molekularen Wirkungsmechanismen der Flavanole werden von zahlreichen *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen abgeleitet. Da einige Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs und chronische Entzündung im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen (Halliwell, 1994), wird hauptsächlich das hohe antioxidative Potential der Kakao-Flavanole als mögliche Erklärung für die gesundheitsfördernden Eigenschaften herangezogen (Salah *et al.*, 1995; Sanbongi *et al.*, 1998). Dies beruht auf ihrem niedrigen Redoxpotential, wodurch sie in der Lage sind reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren und damit zu deaktivieren. Weiterhin bilden sie mit Ionen von Übergangsmetallen Chelatkomplexe (Bors *et al.*, 1990; Rice-Evans *et al.*, 1996). Eine wichtige Rolle spielt dabei die spezifische 3',4'-Dihydroxylierung (Catecholstruktur) des B-Rings. Neben der Fähigkeit als Radikalfänger sind Flavanole auch in der Lage zelluläre Signalwege, die Genexpression und Proteinaktivität zu beeinflussen, sowie Eigenschaften von Zellmembranen und

Rezeptorfunktionen zu verändern (Middleton *et al.*, 2000; Spencer *et al.*, 2001b; Scalbert *et al.*, 2005).

5.3 Biokinetik der Flavonoide

Eine mögliche *in vivo* Beeinflussung durch Flavonoide ist abhängig von deren Bioverfügbarkeit, d.h. von deren Aufnahme in den systemischen Kreislauf, ihrer Metabolisierung, Verteilung sowie Ausscheidung. In Abbildung 11 ist der Stoffwechselweg der mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoide beim Menschen schematisch dargestellt.

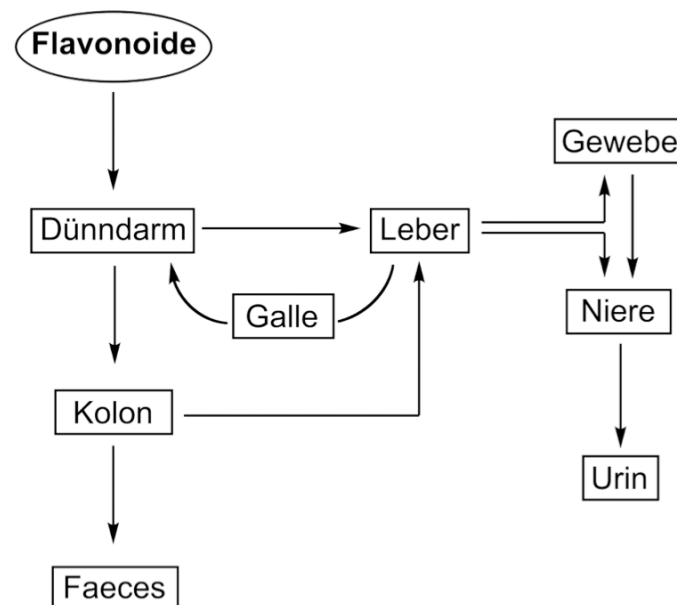


Abbildung 11: Stoffwechselmodell für mit der Nahrung aufgenommene Flavonoide im Menschen. Scalbert and Williamson, 2000.

Die *in vivo* Bioverfügbarkeit, Resorption und der Stoffwechsel von Flavonoiden ist noch Gegenstand intensiver Untersuchungen. Unterschiedliche Klassen, Hydroxymuster, Substituenten und Polymerisierungsgrad machen es unmöglich eine allgemeine Biokinetik für Flavonoide zu erstellen. Nachfolgend wird ein detaillierter Überblick der bis heute erlangten Erkenntnisse über Resorption, Metabolismus, Verteilung und Ausscheidung des im Kakao dominierenden monomeren Flavanols (-)-Epicatechin (weiterhin nur Epicatechin) und der daraus gebildeten oligomeren Procyanidine gegeben.

5.3.1 Präresorptionseignisse

Ob die mit der Nahrung aufgenommenen Flavanole den Dünndarm in ihrer nativen Form erreichen, hängt von möglichen Präresorptionseignissen in Mundhöhle und Magen ab. Versuche mit Flavanolen aus grünem Tee deuten darauf hin, dass Speichel nur einen geringen oder gar keinen Einfluss auf die Stabilität dieser Verbindungen hat (Tsuchiya *et al.*, 1997). Ebenso scheinen auch Procyanidine nicht direkt nach oraler Einnahme durch den Speichel modifiziert zu werden (Spencer *et al.*, 2001b). Neben einer Verstoffwechselung muss auch noch eine mögliche Interaktion der Flavanole mit den im Speichel enthaltenen Proteinen in Betracht gezogen werden. Catechin zeigt eine höhere Affinität zu Prolin-reichen Proteinen im Speichel als Epicatechin. Procyanidin-Dimere, welche über eine C4-C8 Bindung verknüpft sind, haben eine höhere Affinität zu Prolin-reichen Proteinen als solche die über eine C4-C6 Bindung verknüpft sind (de Freitas and Mateus, 2001).

In vitro Untersuchungen zeigen, dass monomere Flavanole wie Epicatechin im Magensaft (pH 1-3) stabil bleiben. Fraglich ist bis heute, ob die oligomeren Procyanidine während der Passage durch den Gastrointestinaltrakt zum Teil in ihre Epicatechin-Monomere aufgespalten werden, welche anschließend resorbiert werden könnten. Spencer *et al.* geben Hinweise darauf, dass aus *Theobroma cacao* isolierte Procyanidine (Dimer-Decamer) unter sauren Bedingungen, wie sie im Magensaft vorliegen, zu Epicatechin-Monomeren und -Dimeren gespalten werden (Spencer *et al.*, 2000). Einer *in vivo* Untersuchung zufolge bleiben Procyanidine nach Einnahme von Kakao im menschlichen Verdauungssystem jedoch stabil (Rios *et al.*, 2002).

5.3.2 Resorption und Metabolisierung im Dünndarm

Über das Duodenum (Zwölffingerdarm) gelangen die Flavanole vom Magen in den Jejunum (Leerdarm). Der pH-Wert steigt nun von 2,0 auf 8,5 an. Es ist bekannt, dass polyphenolische Verbindungen mit einer Catecholstruktur in alkalischer Umgebung oxidiert werden. Epicatechin und die daraus gebildeten Procyanidine besitzen eine solche Catecholstruktur im B-Ring (3',4'-*ortho*-dihydroxylierung). In einer komplexen Lebensmittelmatrix ist es jedoch wahrscheinlich, dass pH-Änderungen gepuffert werden und die Oxidation von Epicatechin und Procyanidinen während der intestinalen Passage wenn überhaupt nur geringfügig stattfindet.

Viele Studien weisen darauf hin, dass die Resorption der mit der Nahrung aufgenommenen Flavanole zum Großteil im Dünndarm (Jejunum und Ileum) stattfindet und während der Passage vom Darmlumen zur Leber schon eine umfangreiche Metabolisierung erfolgt (Cheng *et al.*, 1999; Crespy *et al.*, 1999; Terao, 1999). Die Resorption sowie die anschließende Metabolisierung in Enterozyten wird im Wesentlichen von der chemischen Struktur, der Größe, dem Polymerisierungsgrad und der Löslichkeit der Moleküle bestimmt (Lin *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den meisten Flavonoiden liegen Flavanole in nativer Form als Aglykone vor und sind daher in der Lage die Enterozytenmembran mittels passiver Diffusion zu passieren (Aherne and O'Brien, 2002; Starp *et al.*, 2006). Die Resorption der oligomeren Procyanidine ist noch nicht geklärt. Sie werden wenn überhaupt nur geringfügig im Dünndarm resorbiert. Von oligo- und polymeren Procyanidinen sind nach dem Konsum von Kakaoextrakten allenfalls Dimere (B2 und B5) in geringen Mengen (in ca. 100-fach geringerer Konzentration als Epicatechin) im Blut nachweisbar (Holt *et al.*, 2002a). Aufgrund der fehlenden Resorption bleiben ihre biologischen Wirkungen auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt. Dort schützen sie die intestinale Mukosa vor oxidativem Stress und dem Einfluss von Karzinogenen und können somit möglicherweise Darmkrebs vorbeugen (Williamson and Manach, 2005).

Schon während des Transfers von der mukosalen zur serosalen Seite finden im Enterozyten umfangreiche Metabolisierungsschritte des zuvor resorbierten Epicatechins statt (Spencer *et al.*, 1999). Zu diesen zählen Glukuronidierung und/oder Methylierung von Hydroxylgruppen. Die Konjugation der Aglykone an Glukuronsäure wird dabei von dem Phase-II-Enzym Uridin-5'-diphosphat-glukuronyltransferase (UGT) katalysiert (Strassburg *et al.*, 1998; Strassburg *et al.*, 1999). Die O-Methylierung von bereits glukuronidierten Epicatechin-Derivaten, aber auch von noch unmetabolisiertem Epicatechin wird von der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) katalysiert (Mannisto and Kaakkola, 1999). Beide Enzyme (UGT und COMT) weisen eine hohe Spezifität für 3',4'-*ortho*-dihydroxylierte Flavonoide wie Epicatechin auf. Wichtig für die Metabolisierungsreaktionen ist auch, in welchem Teil des Dünndarms (Jejunum oder Ileum) die Resorption erfolgt. Kuhnle *et al.* konnten anhand von Perfusionsversuchen mit Epicatechin an isoliertem Ratten-Dünndarm belegen, dass nach Transport durch den Jejunum vorwiegend (~45%) die glukuronidierte Form (an C5 und C7) vorliegt (Kuhnle *et al.*, 2000). Auch 3'- und 4'-O-methylierte (30%) und

O-methylglukuronidierte Formen (20%) sind stark vertreten. Im Gegensatz dazu findet im Ileum nur eine geringfügige Metabolisierung von Epicatechin statt. Dies ist wahrscheinlich auf den niedrigen Gehalt an Phase I und II Enzymen zurückzuführen (Spencer *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen konnten auch nach Verzehr Flavanol-reicher Kost in Humanstudien reproduziert werden (Donovan *et al.*, 1999).

5.3.3 Resorption und Metabolismus im Kolon

Epicatechin, welches nicht im Dünndarm resorbiert wurde erreicht das Kolon (Grimmdarm). Dort wird es über das Kolonepithel dem Blutkreislauf zugeführt oder abgebaut. Die Degradation durch die vorliegende Mikroflora (ca. 10^{12} Mikroorganismen/cm³) führt zu einer Fülle von neuen Metaboliten. Bakterielle Enzyme katalysieren vielseitige Reaktionen wie Hydrolyse, Dehydroxylierug, Demethylierung und Decarboxylierung. Weiterhin können Mikroorganismen im Kolon den heterozyklischen Ring spalten, was zu verschiedenen Phenolsäuren führt. (Rechner *et al.*, 2002; Spencer, 2003). Das 5,7,3',4'-Hydroxylierungsmuster von Epicatechin ist anfällig für Hydrolyse und Ringöffnung (Griffiths, 1982). Die Degradation führt daher zu kleineren Phenolsäuren und Valerolaktonen wie 3,4-Dihydrophenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure, Homovanillinsäure und deren Konjugate sowie verschiedene γ -Phenylvalerolaktone. Die mit der Nahrung aufgenommenen Procyanidine werden nur geringfügig im Dünndarm resorbiert und erreichen somit fast vollständig das Kolon. *In vitro* Versuche deuten darauf hin, dass auch Procyanidine durch die dort vorherrschenden Mikroorganismen zu niedermolekularen Phenolsäuren wie Phenylelessigsäure, Phenylpropionsäure, Phenylvaleriansäure, sowie deren meta- oder para-monohydroxylierten Derivate abgebaut werden (Deprez *et al.*, 2000). Die Phenolsäuren können anschließend durch das Kolonepithel resorbiert und mit dem Urin ausgeschieden werden, wobei das Ausmaß der Resorption noch unklar ist (Hollman, 1997).

5.3.4 Metabolismus in der Leber

Im Dünndarm bzw. Kolon resorbiertes und teilweise schon metabolisiertes Epicatechin gelangt über die *vena portae* (Leberpfortader) zur Leber. Sowohl die Metabolite als auch noch unmetabolisiertes (freies) Epicatechin erfahren in der Leber weitere Metabolisierungsschritte. Verglichen mit dem Dünndarm weist die Leber die höchste Metabolisierungsrate auf. Neben der schon erwähnten Glukuronidierung

durch die UGT und O-Methylierung durch die COMT findet hier auch noch O-Sulfatierung statt, welche von der Phenolsulfotransferase (SULT) katalysiert wird. Dieses zytosolische Enzym ist weit verbreitet, wird aber vor allem in der Leber exprimiert (Burchell *et al.*, 1995; Coughtrie *et al.*, 1998). Nach einer umfangreichen Metabolisierung werden die Metabolite ins Blut abgegeben und in verschiedene Gewebe verteilt oder ausgeschieden. In Abbildung 12 sind Epicatechin-Metabolite, wie sie in humanem Plasma wieder gefunden werden, aufgeführt.

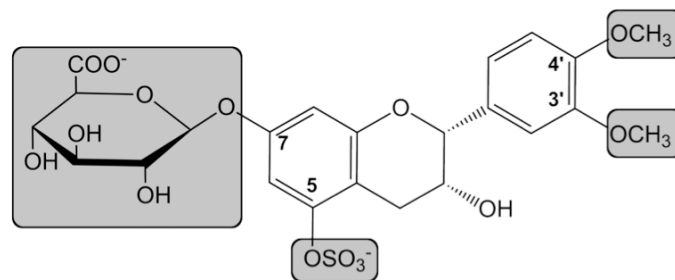


Abbildung 12: Epicatechin-Metabolite in humanem Plasma. Epicatechin liegt im Plasma als 5- oder 7-, selten als 3'-O- β -D-Glukuronid, 5- oder 7-O-Sulfat, 3'- oder 4'-O-Methylderivat vor. Mischformen sind ebenfalls möglich.

5.3.5 Verteilung und Eliminierung der Metabolite

Die zelluläre Aufnahme und weitere Metabolisierung *in vivo* ist noch ungeklärt. In welchem Maße die Metabolite von Zellen aufgenommen werden ist abhängig vom Zelltyp und vom Metabolit selbst. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass Epicatechin und dessen 3'- und 4'-O-Metabolite von Hautfibroblasten und Endothelzellen aufgenommen werden (Schroeder *et al.*, 2003). Aufgrund der erhöhten Polarität der Glukuronide ist ihre Aufnahme in die Zelle vermindert. Die physiologische Bedeutung der Konjugate ist ebenfalls noch Gegenstand der Forschung. Es wird vermutet, dass durch die Aktivität von β -Glukuronidasen, die in verschiedenen Geweben wie z.B. der Leber lokalisiert sind (O'Leary *et al.*, 2001) oder von aktivierten Neutrophilen freigesetzt werden (Shimoi *et al.*, 2001), eine Spaltung erfolgt. Anschließend könnten die nun wieder lipophileren Verbindungen von den Zellen aufgenommen werden. Somit könnten Glukuronide die Transportform der aktiven Substanz sein.

Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide variiert stark. Gut resorbiert werden Flavanole (Epicatechin zwischen 20% und 60%), wohingegen Procyanidine mit einer Resorptionsrate von 1% zu den am schlechtesten aufgenommen Flavonoiden zählen (Ding *et al.*, 2006). Die maximale Plasmakonzentration von freiem (unmetabolisiertem)

Epicatechin und dessen Metaboliten ist beim Menschen zwei bis drei Stunden nach Einnahme von Schokolade oder Kakao erreicht (Richelle *et al.*, 1999; Baba *et al.*, 2000; Schroeter *et al.*, 2006). Hauptmetabolite im Plasma sind dabei Sulfoglukuronide und Glukuronide (in nicht methylierter Form), sowie Sulfate und Methylsulfate. Einheitliche Konzentrationsangaben sind in der Literatur allerdings nicht beschrieben. So konnte Richelle *et al.*, zwei bis drei Stunden nach Einnahme von dunkler Schokolade mit einem Epicatechingehalt von 164 mg eine maximale Plasmakonzentrationen an Gesamtepicatechin (freies und metabolisiertes) von 0,7 μM nachweisen, (Richelle *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu bestimmte Baba *et al.*, zwei Stunden nach Einnahme von Schokolade oder Kakao mit jeweils 220 mg Epicatechin eine maximale Plasmakonzentration an Gesamtepicatechin von ca. 5 μM (Baba *et al.*, 2000). Die Eliminationshalbwertszeit von freiem und metabolisiertem Epicatechin im Blut beträgt 3-5 h. Die Ausscheidung erfolgt über den Urin oder die Galle. Nach biliärer Ausscheidung können die Metabolite nach Dekonjugation durch die Kolon-Mikroflora wieder resorbiert werden (enterohepatischer Kreislauf). Aufgrund des hohen Molekulargewichts ($> 300 \text{ g/mol}$) werden die Konjugate vermutlich vor allem über die Galle ausgeschieden. Die urinäre Ausscheidung des Gesamtepicatechins erfolgt innerhalb von 24 h nach Einnahme von Kakao oder Schokolade und beträgt ca. 30% des Ausgangs-Epicatechingehaltes, wobei 80% innerhalb von 8 h ausgeschieden werden. Zu den Hauptmetaboliten im Urin zählen (methylierte und nicht methylierte) Sulfoglukuronide und Sulfate, sowie freies Epicatechin. Dies lässt vermuten, dass es sich bei den Sulfat-Derivaten um die Harnsausscheidungsprodukte handelt (Baba *et al.*, 2000).

In der folgenden Abbildung ist die Resorption, Metabolisierung, Verteilung und Eliminierung für das monomere Epicatechin und die oligomeren Procyanidine zusammengefasst.

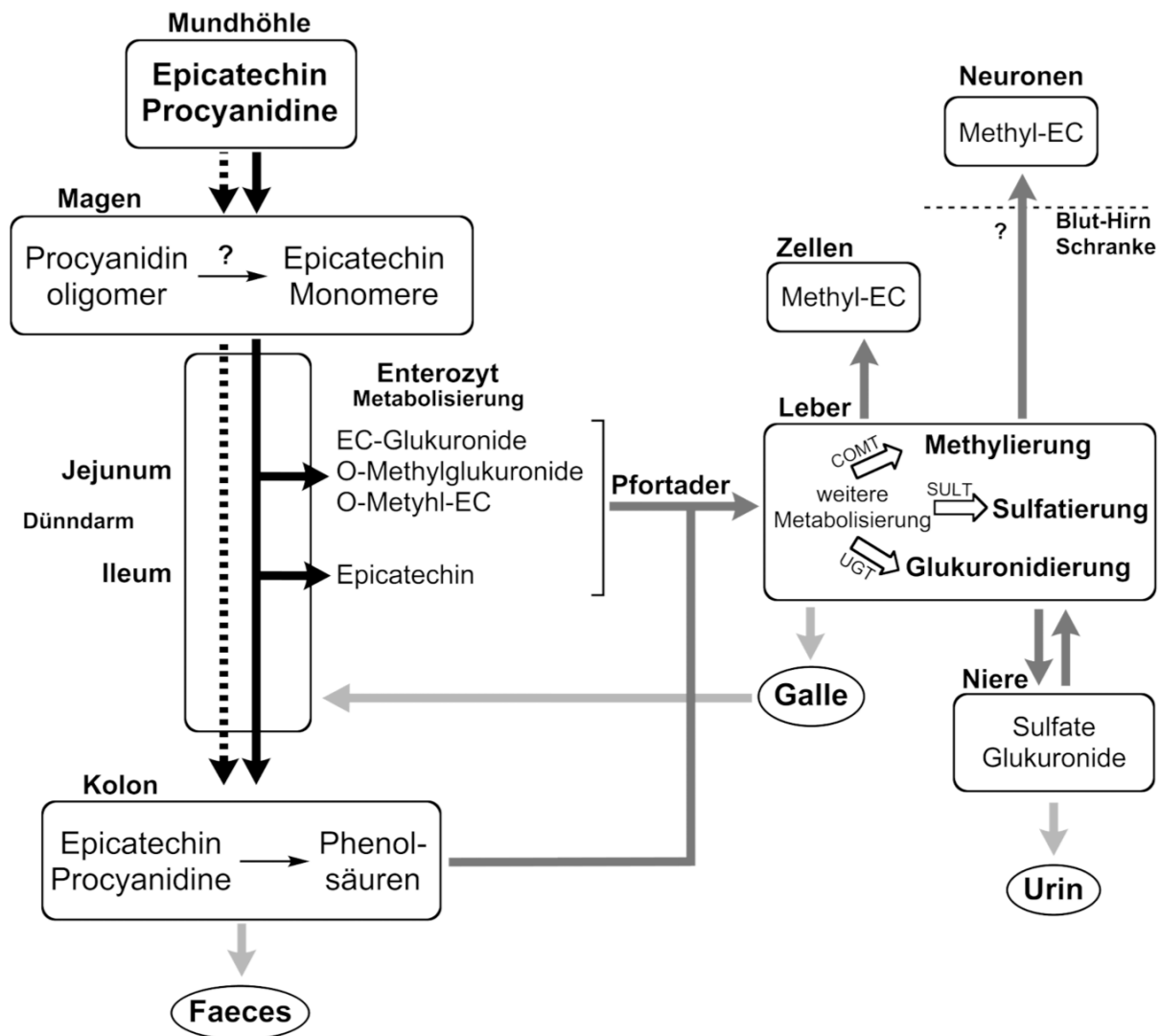


Abbildung 13: Zusammenfassung der Biokinetik von dem monomeren Epicatechin und den polymeren Procyanidinen im Menschen. Resorption des Epicatechins (EC): schwarze Pfeile, Resorption der Procyanidine: gestrichelte, schwarze Pfeile; Verteilung der Metabolite: dunkelgraue Pfeile; Eliminierung der Metabolite: hellgraue Pfeile. COMT: Catechol-O-Methyltransferase ; SULT: Phenolsulfotransferase; UGT: Uridin-5'-diphosphat-glukuronyltransferase. Verändert nach Spencer *et al.*, 2001b.

5.4 Verarbeitung der Kakaobohnen - eine alte/neue Wissenschaft

Je höher der Kakaomasse-Anteil einer Schokolade ist, desto höher ist in der Regel ihr Gehalt an Polyphenolen. Dennoch enthalten Schokoladen mit gleichen Kakaomassen-Anteilen nicht zwangsläufig identische Mengen an Polyphenolen. Der absolute Flavonoidgehalt in Kakaoerzeugnissen schwankt erheblich und ist abhängig von der Kakao-Sorte, dem Klima sowie dem Reifegrad und der Verarbeitung der Kakaobohnen. Dabei hat die Fermentation einen erheblichen Einfluss auf den Flavonoidgehalt. Schwach fermentierte Kakaobohnen weisen verglichen mit stark

fermentierten einen höheren Gehalt auf. Bei diesem Prozess nimmt vor allem der Anthocyangehalt ab. Während der Fermentation und anschließender Trocknung können 95% der einzelnen phenolischen Komponenten verloren gehen, teils durch Oxidation und Komplexbildung, teils durch Auswaschung aus den Keimblättern. Im weiteren Verlauf der Rohkakaoverarbeitung (Röstung, Alkalisierung) treten Verluste an Polyphenolen in unterschiedlichem Ausmaß auf.

Einige Schokoladenhersteller haben begonnen spezielle Schokoladen zu entwickeln, die einen besonders hohen Anteil an Polyphenolen besitzen. In den USA bietet Mars unter dem Label Cocoa-Via™ Produkte auf Basis von Cocoapro® an. Dabei handelt es sich um ein spezielles, von Mars Incorporated entwickeltes und patentiertes Verfahren, mit dem die Kakaobohnen so schonend verarbeitet werden, dass die Flavonoide fast vollständig erhalten bleiben.

6 Ziel und Fragestellung

Die Zufuhr Flavanol-reicher Nahrung ist korreliert mit einem verminderten Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen wie Bluthochdruck und Arteriosklerose. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, den molekularen Wirkmechanismus der kardioprotektiven Effekte von Kakao-Flavanolen, wie z.B. eine verbesserte Endothelfunktion, aufzuklären. Wichtig für die Endothelfunktion im Menschen ist das Zusammenspiel der Arginase-2 und eNOS, die beide L-Arginin als Substrat nutzen. Untersucht werden sollte, ob die kardiovaskulären Effekte von Kakao-Flavanolen über eine Modulation des L-Argininstoffwechsels vermittelt werden. In Zellkulturexperimenten sollte die Wirkung von (-)-Epicatechin und einem Flavanol-Gemisch auf den L-Argininstoffwechsel in humanen venösen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) bestimmt werden.

Kakao-Flavanole weisen auch antiinflammatorische Wirkungen auf. Während einer Entzündung werden in humanen Endothelzellen weitere Proteine des L-Argininstoffwechsels exprimiert, das Enzym iNOS und der L-Arginin-Transporter CAT-2B. Im zweiten Teil der Arbeit sollte in Zellkulturexperimenten mit HUVEC untersucht werden, ob unter inflammatorischen Bedingungen der L-Argininstoffwechsel von Kakao-Flavanolen moduliert wird.

Neben dem Endothel sind auch Erythrozyten an der Gefäßhomöostase beteiligt. Humane Erythrozyten besitzen die Enzyme NOS und Arginase. Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einer Humanstudie geklärt werden, ob die Effekte von Kakao-Flavanolen auch durch Beeinflussung des erythrozytären L-Argininstoffwechsels vermittelt werden.

II Material und Methoden

1 Chemikalien, Geräte und andere Materialien

1.1 Chemikalien

Aceton, reinst	Merck, Darmstadt
Acetonitril, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Actinomycin D $\geq 95\%$, <i>cell culture tested</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose <i>electrophoresis grade</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin (BSA) Fraktion V $\geq 98\%$	Roth, Karlsruhe
L-Arginin monohydrochlorid $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Bright Light Substrat</i> (Luziferin)	Pierce, Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>tert</i> -Butylmethylether, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
<i>DNA Molecular Weight Marker XIV</i> , 100 bp	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) p.a.	Merck, Darmstadt
(-)-Epicatechin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure 100% (Eisessig) p.a.	Merck, Darmstadt
β -Östradiol, <i>cell culture tested</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol vergällt und absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Molecular Probes, Karlsruhe
Fluoromount G	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Glycerin p.a.	Roth, Karlsruhe
HCl konz. und 25% p.a.	Merck, Darmstadt
H ₃ PO ₄ konz. p.a.	Merck, Darmstadt
H ₂ SO ₄ konz. p.a.	Merck, Darmstadt
Harnstoff, für die Molekularbiologie $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin-Natrium 5000	Ratiopharm, Ulm
Iodin ReagentPlus $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Isonitrosopropiophenon (ISPF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumjodid Ultra $\geq 99,5\%$	Fluka, Buchs, CH
KH ₂ PO ₄ $\geq 99,8\%$ p.a.	Roth, Karlsruhe

Konservierer für Wasserbäder	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat Pentahydrat $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mangan(II) chlorid tetrahydrat $\geq 99,0\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Merck, Darmstadt
NaCl Ultra, für Molekularbiologie $\geq 99,5\%$	Fluka, Buchs, CH
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ p.a.	Merck, Darmstadt
NaOH p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid Suprapur	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat $\geq 90\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P40 <i>Substitute</i>	Fluka, Buchs, CH
2-Propanol, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
<i>Reporter Gene Assay Lysis Buffer</i> , 5x	Roche Diagnostics, Mannheim
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure, reinst	Merck, Darmstadt
TRIS Pufferan $\geq 99,9\%$ p.a.	Roth, Karlsruhe
L-Valin $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser für die Chromatographie, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

1.2 Geräte

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 TV:

Camera Controller C4742

Lambda 10 System

Zeiss, Jena

Hamamatsu, Herrsching a. Ammersee

Hamamatsu, Herrsching a. Ammersee

HPLC:

Autosampler L 7200

Elektrochemischer Detektor CLC 100

Entgaser L-7614

Integrator D2500

LiChrospher100 RP-18e (5 μm) 250x4 mm

mit Vorsäule 10x4 mm

Pumpe L6200 A

Säulenofen 655A-52

Merck Hitachi, Darmstadt

Chromsystem, München

VWR, Darmstadt

Merck Hitachi, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Merck Hitachi, Darmstadt

Merck Hitachi, Darmstadt

Stickstoffanalysator CLD 88*Interface-Box*

Kältethermostat, Ecoline Staredition RE107

Kontrollkopf, Ecoline Staredition E100

Wärmethermostat, Ecoline Staredition 025

Eco Physics, München

Knauer, Berlin

Lauda, Lauda-Königshofen

Lauda, Lauda-Königshofen

Lauda, Lauda-Königshofen

Weitere Geräte:

Analysenwaage 1246

Begasungsbrutschrank (Zellkultur)

Diana III Raytest-Kamera

Elektrophoresekammer

ELISA Plate Reader, PowerWaveX

Fluoreszenz Mikroplate Reader, Fluostar Optima

Heizblock

Magnet Rührer Ikamag RCT

Mikrowelle

Mikrozentrifuge 5417C Festwinkelrotor F45-30-11

Milli-Q-Anlage

Phasenkontrastmikroskop

pH-Meter 537

Powersupply, Consort E452

Real-Time PCR, LightCycler 2.0

Sterilbank, Gelaire BSB 4A

Ultraschallbad, Sonorex Super Digital

UV/Vis Spectrophotometer, Ultrospec 3000

Vortex Reax 2000

Wasserbad

Zentrifuge 5804R Ausschwingrotor A-4-44

Sartorius, Göttingen

Binder, Tuttlingen

Raytest, Straubenhardt

Eigenherstellung

BioTek Instruments, Vermont, USA

BMG LabTec, Offenburg

PeqLab, Erlangen

IKA Labortechnik, Staufen i.Br.

Braun, Melsungen

Eppendorf, Hamburg

Millipore, Eschborn

Leitz, Wetzlar

WTW, Weilheim

MAGV, Rabenau

Roche Diagnostics, Mannheim

Flow Laboratories, Michigan City, USA

Bandelin electronics, Berlin

Pharmacia Biotech, Freiburg

Heidolph Instruments, Kelheim

Köttermann, Düsseldorf

Eppendorf, Hamburg

1.3 Verbrauchsmaterialien*Atta Fluor cell chamber*

Combi Stopper

Einmalspritzen, 20 ml

Gasdichte Spritze, 100 ml

Glasplättchen, Ø 25 mm

Kryotubes

Invitrogen, Karlsruhe

Braun, Melsungen

Braun, Melsungen

Hamilton, Reno, Nevada, USA

Greiner, Frickenhausen

Greiner, Frickenhausen

LightCycler Kapillaren (20 µl), Borsilikatglas	Roche Diagnostics, Mannheim
Objektträger	Greiner, Frickenhausen
Pipetten: Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	
Polypropylen-Röhrchen, natur, 12 ml	Greiner, Frickenhausen
Quarzglas-Küvette Suprasil Typ 105.201-QS	Hellma, Müllheim
Sterilfilter Minisart, Porengröße 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Vacutainer CAT	Becton Dickinson, Plymouth, UK
Vacutainer-System (Blutentnahme)	Becton Dickinson, Plymouth, UK
Zellkulturmaterialien	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen

1.4 Gase

Alle verwendeten Gase (Helium und Stickstoff) stammten von der Firma Linde (Höllriegelskreuth) und hatten höchste Reinheit (5,0).

1.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, A
Das FCS wurde 45 min bei 54°C hitzeinaktiviert. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.	
Geneticin G418 Sulfat	Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin, 200 mM	PAA Laboratories, Pasching, A
Penicillin/Streptomycin (100x), 200 mM	PAA Laboratories, Pasching, A
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories, Pasching, A

Endothelial Cell Growth Medium, 500 ml PromoCell, Heidelberg

Low Serum (2% v/v)

Das Komplettmedium enthielt den SupplementMix C-39215.

Endothelial Cell Basal Medium MV2, 500 ml PromoCell, Heidelberg

Customer Formulation w/o L-Arginin und w/o Phenolrot

Das Komplettmedium enthielt den SupplementPack C-39221 (ohne Hydrokortison und FCS) und 1 mM sterilfiltriertes L-Arginin monohydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim).

HANKS' Balanced Salt Solution Sigma-Aldrich, Steinheim

Mit NaHCO₃, w/o Phenolrot

RPMI-1640 Medium, 500 ml

Sigma-Aldrich, Steinheim

HEPES Modifikation mit 25 mM HEPES, w/o L-Glutamin

Das Komplettmedium enthielt 2 mM Penicillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin und 10% hitze-inaktiviertes FCS.

1.6 Enzyme, Inhibitoren und Zytokine β -Glukuronidase aus *Helix pomatia*, Typ H-2

Sigma-Aldrich, Steinheim

Aprotinin, lyophilisiert (Proteaseinhibitor)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Leupeptin $\geq 90\%$ HPLC (Proteaseinhibitor)

Sigma-Aldrich, Steinheim

PMSF $\geq 99,0\%$ (Proteaseinhibitor)

Fluka, Buchs, CH

RNaseOUT 40 U/ μ l (RNase-Inhibitor)

Invitrogen, Karlsruhe

humanes, rekombinantes IL-1 β

Strathmann, Hannover

humanes, rekombinantes INF- γ

Strathmann, Hannover

humanes, rekombinantes TNF- α

Strathmann, Hannover

1.7 KitsD_C Protein Assay

Bio-Rad Laboratories, München

LightCycler FastStart DNA Master SYBR-Green I

Roche, Mannheim

Omniscript RT Kit

Qiagen, Hilden

QiaShredder

Qiagen, Hilden

RNeasy Mini Kit

Qiagen, Hilden

1.8 Software

AquaCosmos 1.2

Hamamatsu, Herrsching a. Ammersee

Diana III Camera Control 1.00.031

Raytest, Straubenhardt

Eurochrom 2000

Knauer, Berlin

KC4 3.1

BioTek Instruments, Vermont, USA

LightCycler Software 4.05

Roche Diagnostics, Mannheim

Optima 2.00 R3

BMG LabTec, Offenburg

Swift Multi Wavelength 1.05

Pharmacia Biotech

Diese Arbeit wurde mit Microsoft Word 2004 erstellt. Die Strukturformeln wurden mit CS ChemDraw Pro 11 gezeichnet und die Graphen mit Prism 4 angefertigt.

2 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Herstellung sämtlicher Puffer und Lösungen mit Reinstwasser.

Agarosegel	Agarose 1x TAE	1,5% (w/v)
Carnoy's Fixativ	Methanol/Eisessig	3:1
Einfriermedium für HUVEC	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i> mit 10% FCS und 10% DMSO	
β-Östradiol	100 µM, gelöst in HANKS/PBS (1:1)	
Fließmittel für HPLC pH 3	KH ₂ PO ₄ EDTA Acetonitril pH-Einstellung mit H ₃ PO ₄	2 mM 1,7 mM 15% (v/v)
ISPF-Lösung	9% ISPF, gelöst in 100% Ethanol	
Lysepuffer pH 7,5	TRIS-HCl, pH 7,5 NaCl NP-40 Na-orthovanadat NaF PMSF Aprotinin Leupeptin	50 mM 0,25 M 0,5% (v/v) 1 mM 0,5 mM 1 mM 2 µg/ml 2 µg/ml
McIlvaine-Puffer	Zitronensäure Na ₂ HPO ₄	50 mM 100 mM
MnCl₂-Puffer	MnCl ₂ TRIS-HCL, pH 7,5	10 mM 50 mM

PBS (2x autoklaviert)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,0 mM
10x Probenpuffer	Glycerin	50% (v/v)
	Bromphenolblau	0,42% (w/v)
	EDTA pH 8,0	10 mM
Reaktionslösung für CLD (bei 60°C)	Kaliumjodid	45 mM
	Jodin	10 mM
	Eisessig	16 M
	angesetzt mit HPLC-Wasser	
Säuregemisch	H ₂ SO ₄ :H ₃ PO ₄ :H ₂ O	1:3:7
Selektionsmedium	RPMI mit 0,5 mg/ml Geneticin G418	
SRB-Lösung	0,4% SRB, gelöst in 1% Essigsäure	
Stopplösung	PBS mit 20% hitzeinaktiviertem FCS	
50x TAE pH 8,0	TRIS	2 mM
	Essigsäure	1 M
	EDTA pH 8,0	50 mM

3 Kakao-Flavanole

Für Zellkulturexperimente wurden sowohl einzelne Flavanole, als auch ein Flavanol-Gemisch eingesetzt. Mit Ausnahme von (-)-Epicatechin, welches von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen wurde, wurden die verwendeten Kakao-Flavanole freundlicherweise von Dr. Hagen Schroeter (UC Davis, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt. Die Inkubation der Zellen mit den Substanzen wird in Kapitel II.4.4.1 näher beschrieben.

3.1 Einzelne Flavanole

Bei den eingesetzten Flavanolen handelte es sich um die Monomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, sowie um die (-)-Epicatechin-Metabolite 4'-O-Methylepicatechin, 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid und (-)-Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid.

3.2 Flavanol-Gemisch

Das Flavanol-Gemisch setzte sich zusammen aus (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, 4'-O-Methylepicatechin, 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid und Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid.

4 Zellkultur

Die für die Zellkultur verwendeten Geräte und Lösungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, vor der Verwendung autoklaviert oder bereits steril vom Hersteller bezogen. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

4.1 Zellen

4.1.1 HUVEC – *human umbilical vein endothelial cells*

Bei HUVEC handelt es sich um humane, venöse Nabelschnurendothelzellen von Neugeborenen. Die Primärzellen wurden als proliferierende Zellen (25 cm² Kulturf flasche mit 500.000 Zellen) von PromoCell (Heidelberg) bezogen. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 2 bis 4 eingesetzt.

4.1.2 A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen

Die humane Lungenepithelzelllinie A549/8 ist mit dem Plasmid pNF- κ B-Luc stabil transfiziert worden, welches vier NF- κ B Bindungssequenzen eines IL-6 Promotors enthielt. Diese wurden vor eine TATA-Box kloniert, die wiederum vor einem Luziferase-Reportergen und Neomycin Resistenzgen lokalisiert war (Tedeschi *et al.*, 2004). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von PD. Dr. Kleinert (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Mainz) in Form von kryokonservierten Zellen zur Verfügung gestellt.

4.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellkultur erfolgte in einer, auf 37°C temperierten, wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid. Das Zellwachstum als adhärente Monolayerschicht wurde täglich visuell mittels Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Zwei- bis dreimal wöchentlich wurde das Kulturmedium erneuert. Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz erfolgte das Passagieren der Zellen.

4.2.1 HUVEC

Die Zellen wurden in *Endothelial Cell Growth Medium*, das mit 2% FCS, 0,4% ECGS/H, 0,1 ng/ml hEGF, 1,0 ng/ml hbFGF und 1,0 µg/ml Hydrokortison versetzt wurde (Komplettmedium), kultiviert. Nach Erhalt der Primärzellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche wurde umgehend das Medium bis auf einen Rest von ca. 10 ml abgenommen. Die Zellen wurden anschließend zur Akklimatisierung für mindestens 2 h in den Brutschrank gestellt. Um Reste von Medium und Serum zu entfernen, wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden diese mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Trypsinaktivität wurde visuell mittels Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und nach 3-5 min durch Zugabe von 1 ml Stopplösung (PBS mit 20% FCS) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 175 cm² Zellkulturflasche mit 25-30 ml Komplettmedium überführt. Nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden diese zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Durch Zugabe von 3 ml Stopplösung wurde die Trypsinaktivität nach 3-5 min abgestoppt und die Zellen bei 350 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Komplettmedium resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl Zellkulturflaschen (175 cm²), Zellkulturschalen (Ø 9,4 cm und 3,5 cm) oder Kulturplatten (6-well- und 24-well-Kulturplatten) überführt.

4.2.2 A549/8-pNF-κB-Luc-Zellen

Die Zellen wurden in Selektionsmedium (RPMI-1640 mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin 2 mM Penicillin/Streptomycin und 0,5 mg/ml Geneticin) in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Mindestens vier Tage vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in Medium ohne Antibiotika kultiviert, um die Zytokinaktivierung der Zellen (vgl. Kapitel II.4.4.2) nicht zu beeinträchtigen. Nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden

diese mit 3 ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Nach 5-10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Medium gestoppt und die Zellen auf die entsprechende Anzahl Zellkulturflaschen (175 cm²) oder 12-well-Kulturplatten überführt.

4.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

HUVEC wurden in möglichst frühen Passagen kryokonserviert. Die Zellen wurden gemäß Kapitel II.4.2.1 in einer 175 cm² Zellkulturflasche bis zu einer 90%-igen Konfluenz kultiviert und anschließend vom Flaschenboden abgelöst. Das Zellpellet wurde in 4 ml Einfriermedium (*Endothelial Cell Growth Medium* mit 10% FCS und 10% DMSO) aufgenommen, die Zellsuspension in vier Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Eingefrorene Zellen (HUVEC und A549/8-pNF-κB-Luc) wurden für 2-3 min im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unverzüglich auf eine 175 cm² Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Komplettmedium überführt. Um einer Membranschädigung durch das im Einfriermedium befindliche DMSO vorzubeugen, wurde das Kulturmedium nach 24 h erneuert.

4.4 Inkubation mit Substanzen

4.4.1 Kakao-Flavanole

Die Zellen wurden gemäß Kapitel II.4.2 bis zu einer 90%-igen Konfluenz im entsprechenden Komplettmedium kultiviert. Anschließende Inkubationen mit den Flavanolon (vgl. Kapitel II.3) fanden in FCS-freiem Medium statt, da die Flavanolon von den Serumproteinen gebunden werden können. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen die mit dem Lösungsmittel (EtOH) inkubiert wurden. Die Versuche haben gezeigt, dass sich kein Unterschied hinsichtlich der Ergebnisse zwischen den beiden Kontrollzellen ergab, sodass im folgenden die unbehandelten Zellen als Kontrolle bezeichnet und die Ergebnisse darauf bezogen werden.

(-)-Epicatechin wurde als 10 mM Stocklösung in 50% EtOH/PBS angesetzt und steril filtriert. Die restlichen Flavanolon ((-)-Epicatechin-Metabolite und (+)-Catechin) wurden von Dr. Hagen Schroeter (UC Davis, Kalifornien) ebenfalls als 10 mM Stocklösungen erhalten, die in 50% EtOH/PBS gelöst waren. Das erhaltene Flavanol-Gemisch war in 70% EtOH/PBS gelöst und besaß eine Gesamtkonzentration von 13,2 mM (2,0 mM (+)-Catechin, 0,5 mM (-)-Epicatechin, 1,0 mM 4'-O-Methylepicatechin,

8,5 mM 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid und 1,2 mM Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid). In Zellkulturversuchen wurden die einzelnen Flavanole zwischen 0,1 μ M und 30 μ M und das Flavanol-Gemisch zwischen 0,4 μ M und 30 μ M eingesetzt. Die verschiedenen Konzentrationen wurden für jede Versuchsreihe frisch angesetzt

4.4.2 Zytokinaktivierung

Um den Zustand einer Entzündung in der Zellkultur zu simulieren, wurden die Zellen mit einer Kombination aus den drei proinflammatorischen Zytokinen IL1- β , IFN- γ und TNF- α inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen betrugen dabei je 50 U/ml oder je 500 U/ml, welche ausgehend von einer 1000 U/ μ l Stocklösung des jeweiligen Zytokins für jede Versuchsreihe frisch angesetzt wurden. Die Zytokinzugabe und anschließende Kultivierung erfolgte in Medium ohne FCS und Hydrokortison.

4.5 Mykoplasmentest

Bei Mykoplasmen handelt es sich um sehr kleine, parasitär lebende, zellwandlose Bakterien. Da Mykoplasmen den Stoffwechsel, die Morphologie und die Proliferation von Zellen beeinflussen und damit Ergebnisse von Experimenten verändern können, ist es notwendig, die Zellen in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination hin zu untersuchen. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des zellpermeablen Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) und anschließender mikroskopischer Untersuchung der Fluoreszenz (Russell *et al.*, 1975). DAPI bindet an der kleinen Furche doppelsträngiger DNA, wodurch ein stabiler Komplex entsteht, der circa 20-fach stärker fluoresziert als DAPI alleine.

Die Zellen wurden auf einem Glasplättchen in einer $\varnothing$ 3,5 cm Zellkulturschale gemäß Kapitel II.4.2 kultiviert. Subkonfluente Zellen auf dem Glasplättchen wurden zuerst mit PBS gewaschen und dann für 10 min in 1 ml Carnoy's Fixativ fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit McIlvaine-Puffer gewaschen und in 1 ml DAPI-Lösung (5 μ g/ml) für 15 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Reinstwasser wurden die Glasplättchen auf einem Objektträger mit 20 μ l Einbettmedium (Fluoromount G) fixiert. Die gefärbten Zellen wurden innerhalb der nächsten 20 min unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Zellkulturen sind mit Mykoplasmen kontaminiert, wenn neben der üblichen Kernfluoreszenz noch eine

zusätzliche Fluoreszenz im Zytoplasma und zwischen den Zellen auftritt. Kontaminierte Zellen wurden umgehend autoklaviert und entsorgt.

5 Bestimmung der Zellviabilität mittels SRB-Assay

Der Sulforhodamin B (SRB) Assay wurde nach Skehan und Kollegen (Skehan *et al.*, 1990) durchgeführt und dient der Bestimmung der Zellviabilität. Der Assay wird genutzt um die Zytotoxizität von Substanzen zu bestimmen. Das Messprinzip basiert auf der Fähigkeit des negativ geladenen Fluoreszenzfarbstoffs SRB pH-abhängig an basische Aminosäurereste von Proteinen in Trichloressigsäure fixierten Zellen zu binden. Bei leicht sauren Bedingungen bindet SRB an Proteine und bei leicht basischen Bedingungen kann es aus Zellen extrahiert und photometrisch vermessen werden. Die Absorption ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und deren Abnahme damit ein Maß für die Toxizität einer Substanz.

5.1 Vorbereitung der Zellen

HUVEC wurden gemäß Kapitel II.4.2.1 in 24-*well*-Kulturplatten kultiviert. Nach Erreichen einer 90%-igen Konfluenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen in FCS-freiem *Endothelial Cell Basal Medium* MV2 für 24 h und 48 h inkubiert (vgl. Kapitel II.4.4.1) und anschließend die Zellviabilität mittels SRB-Assay bestimmt.

5.2 Sulforhodamin B - Assay

Die Zellen wurden mit 2 ml pro *well*, 4°C kalter Trichloressigsäure (10% w/v) fixiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mehrmals mit Reinstwasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden diese mit je 300 µl SRB-Lösung (0,4% w/v) für 10 min bei Raumtemperatur behandelt. Überschüssiges SRB wurde mit 1% Essigsäure (v/v) entfernt und erneut getrocknet. Abschließend wurde das SRB mit je 125 µl TRIS-Lösung (10 mM) aus den Zellen extrahiert. Von den Extrakten wurden jeweils 100 µl in ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte überführt und das SRB photometrisch bei 493 nm gegen eine

Referenz bei 620 nm vermessen. Der SRB-Messwert wurde durch Subtraktion des Referenzwertes korrigiert.

6 Isolierung und Quantifizierung zellulärer Gesamt-RNA

6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung zellulärer Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers:

Die in 6-*well*-Kulturplatten kultivierten HUVEC (vgl. Kapitel II.4.2.1) wurden nach dem Waschen mit PBS in 350 µl RLT-Puffer (Lysepuffer) pro *well* lysiert und in eine QIAshredder-Säule überführt. Das Lysat wurde 2 min bei maximaler Geschwindigkeit (20.800 x g) zentrifugiert und der Durchfluss mit 350 µl Ethanol (70%) vermischt. Das homogenisierte Lysat wurde anschließend auf eine RNeasy Mini-Säule überführt und 1 min bei 7.000 x g zentrifugiert. Die zu isolierende RNA befand sich nun in der Silica-Membran der Säule. Auf diese wurden 700 µl RW1-Puffer (Waschpuffer) gegeben und es folgte ein einminütiger Zentrifugationsschritt bei 7.000 x g. Zwei weitere Waschschrte wurden mit je 500 µl RPE-Puffer durchgeführt, bevor die Gesamt-RNA im letzten Schritt mit 20-24 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert wurde.

6.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Um die RNA-Konzentration und die Reinheit einer Probe zu bestimmen, wurde diese 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und in einer Quarzglas-Küvette photometrisch bei 260 nm und 280 nm vermessen. Aus den gemessenen Absorptionen bei den entsprechenden Wellenlängen, wurde die RNA-Konzentration und die Reinheit errechnet. Eine A_{260} von 1,0 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook, 1989). Zur Abschätzung der Reinheit und des Restproteingehaltes wurde die Absorption bei 260 nm mit der Absorption bei 280 nm verglichen. Der A_{260}/A_{280} Quotient reiner RNA liegt zwischen 1,9 und 2,1.

7 Reverse Transkription

Um die aus Zellen isolierte RNA (vgl. Kapitel II.6) in cDNA umzuschreiben (Reverse Transkription), wurde der kommerziell erhältliche Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Primer diente ein Oligo-(dT)₁₅-Primer (Sigma-Aldrich, Steinheim). Um das Risiko des RNA-Abbaus beim Ansetzen der Reaktionen zu minimieren, wurde ein RNase-Inhibitor (RNaseOUT 40 U/μl, Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Die Reverse Transkription erfolgte unter Einsatz von 0,5 μg oder 1 μg Gesamt-RNA, in einem Reaktionsvolumen von 20 μl. Die Umschreibung fand innerhalb einer einstündigen Inkubation bei 37°C im Heizblock statt.

Tabelle 2: Pipettierschema für die Reverse Transkription unter Verwendung des Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden). Das Endvolumen beträgt 20 μl. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert.

Komponente	Volumen (μl)	Endkonzentration
Puffer, 10x	2,0	1x
dNTP-Mix (5 mM von jedem dNTP)	2,0	0,5 mM pro dNTP
Oligo-(dT) ₁₅ -Primer (20 μM)	1,0	1 μM
RNase-Inhibitor (40 U/μl)	0,25	10 U
Omniscript Reverse Transkriptase	0,25	1 U
Template-RNA	variabel	0,5 oder 1 μg
H ₂ O	variabel	-

Die synthetisierte cDNA wurde anschließend als *template* für Real-Time PCR (vgl. Kapitel II.8) verwendet.

8 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit *real time* Detektion und Quantifizierung einer Ziel-Sequenz. Anhand einer nachträglichen Schmelzkurvenanalyse sind Produktcharakterisierungen möglich.

Die Real-Time PCR wurde mit dem LightCycler 2.0 der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA-Master SYBR-Green I Kits und spezifischen Primern der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim (vgl. Tabelle 4) durchgeführt. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte dabei mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I, der in doppelsträngige DNA interkaliert, wodurch die

Fluoreszenz des Farbstoffes verstärkt wird (Zipper *et al.*, 2004). Das Fluoreszenzsignal, welches direkt proportional mit der Menge der gebildeten PCR-Produkte zunimmt, wurde nach jeder Elongationsphase bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

8.1 Vorbereitung der Zellen

HUVEC wurden gemäß Kapitel II.4.2.1 in 6-*well*-Kulturplatten bis zu einer 90%-igen Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Flavane oder des Flavanol-Gemisches in serumfreiem *Endothelial Cell Basal Medium* MV2 inkubiert (vgl. Kapitel II.4.4.1) und anschließend eine Expressionsanalyse verschiedener Gene des L-Argininstoffwechsels mittels Real-Time PCR durchgeführt.

Zur Bestimmung der humanen Arginase-2 und eNOS mRNA-Expression wurden die Zellen für 2 h und 24 h mit den Flavanol-Gemischen inkubiert. Als Positivkontrolle dienten zytokinaktivierte Zellen, die mit jeweils 500 U/ml IL-1 β und TNF- α behandelt wurden (vgl. Kapitel II.4.4.2), was zu einer erniedrigten mRNA-Expression führt.

Um die humane CAT-2B und iNOS mRNA-Expression zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h mit den Flavanol-Gemischen vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine vierstündige Zytokinaktivierung mit je 50 U/ml oder 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (vgl. Kapitel II.4.4.2).

8.2 Real-Time PCR

Nach den Inkubationszeiten wurde die zelluläre Gesamt-RNA isoliert (vgl. Kapitel II.6) und 1 μ g RNA für die Reverse Transkription eingesetzt (vgl. Kapitel II.7). Die Real-Time PCR erfolgte unter Einsatz von 10 ng/ μ l cDNA. Das Pipettierschema des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 3 aufgeführt. Nachdem der Ansatz in eine 20 μ l Glaskapillare pipettiert und diese umgehend verschlossen wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5-10 sec bei 400 x g. Die Kapillare wurde in den LightCycler 2.0 eingesetzt und die Real-Time PCR gestartet.

Tabelle 3: Pipettierschema für die Real-Time PCR unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA-Master SYBR-Green I Kits und 20 µl Glaskapillaren (Roche Diagnostics, Mannheim)

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration
Reaction Mix SYBR Green, 10x	2,0	1x
Primer for (5 µM)	2,0	0,5 µM
Primer rev (5 µM)	2,0	0,5 µM
MgCl ₂ (25 mM)	1,6	2 mM
cDNA (10 ng/µl)	4,0	40 ng
H ₂ O	8,4	-

Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA auszugleichen, wurde bei jeder Probe neben dem Zielgen ein Referenzgen detektiert. In dieser Arbeit wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen ausgewählt. Die Expression der Zielgene in Flavanol-behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen wurde als n-fache Expression mit Hilfe des delta-delta-CP-Wertes angegeben. Der CP-Wert (*crossing-point*) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Bei der delta-delta-CP-Methode wird der CP-Wert des Referenzgens von dem CP-Wert des Zielgens abgezogen. Die daraus resultierenden dCP-Werte der behandelten und unbehandelten Zellen werden in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\text{dCP}(\text{behandelt}) - \text{dCP}(\text{unbehandelt})}$$

In Tabelle 4 sind die spezifischen Primerpaare für die Detektion der verschiedenen humanen Zielgene und des Referenzgens sowie die dazu gehörigen PCR-Bedingungen aufgelistet. Die lyophilisierten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen und in nukleasefreiem Wasser als 100 µM Stocklösungen angesetzt.

Tabelle 4: Real-Time PCR-Primer und Bedingungen. Die Real-Time PCR wurde mit dem LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Produkte	Primer-Sequenzen und PCR-Protokolle		Fragment
hArginase-2	Forward	5'-TGCATCCTTGAAGTGTCTCAGC-3'	199 bp
	Reverse	5'-ACAAGCTGCTGCTTTCCATT-3'	
	PCR-Protokoll	50x (0'' 95°C, 20'' 60°C, 20'' 72°C)	
heNOS	Forward	5'-CTAGCCAAAGTCACCATCGT-3'	180 bp
	Reverse	5'-CGGGGACAGGAAATAGTTG-3'	
	PCR-Protokoll	50x (0'' 95°C, 20'' 61°C, 20'' 72°C)	
hiNOS	Forward	5'-AGCTTCCTGGACTCCTGTCA-3'	163 bp
	Reverse	5'-GGTGGCTGCTAAGACAGAGG-3'	
	PCR-Protokoll	50x (0'' 95°C, 10'' 60°C, 20'' 72°C)	
hCAT-2B	Forward	5'-CCCAATGCCTCGTGTAATCT-3'	120 bp
	Reverse	5'-TGCCACTGCACCCGATGATAAAGT-3'	
	PCR-Protokoll	50x (0'' 95°C, 10'' 60°C, 15'' 72°C)	
hGAPDH Referenzgen	Forward	5'-CAACTACATGGTTTACATGTTC-3'	416 bp
	Reverse	5'-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-3'	
	PCR-Protokoll	50x (0'' 95°C, 20'' 58°C, 30'' 72°C)	

Anmerkung: „h“ = human

Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde neben der Schmelzkurvenanalyse zusätzlich eine Agarosegelelektrophorese der Amplifikate durchgeführt.

8.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen im elektrischen Feld. Bedingt durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppen in ihrem Rückgrat wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld von der negativ geladenen Kathode in Richtung der positiv geladenen Anode. Die antreibende elektrische Kraft wirkt der Reibungskraft der Agarosematrix entgegen, bis ein Gleichgewicht erreicht ist, in dem sich die DNA mit konstanter Geschwindigkeit bewegt (Lottspeich, 1998). Die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA ist antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Meyers *et al.*, 1976). Die Detektion der Nukleinsäurebanden erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, der in doppelsträngige DNA interkaliert, woraus eine Verstärkung der Fluoreszenz resultiert ($\lambda_{\text{Anregung}} = 254\text{-}366\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 590\text{ nm}$, Diana III Raytest-Kamera, Raytest, Straubenhardt). Die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente kann anhand eines Größenstandards abgeschätzt werden.

Ein 1,5%-iges Agarosegel wurde in 1x TAE-Puffer, unter Aufkochen in einem Mikrowellengerät, gelöst. Nach Abkühlung der Lösung unter 60°C, wurde das Ethidiumbromid (0,3 µg/ml Endkonzentration) hinzugefügt. Das noch flüssige Gel wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer mit entsprechendem Kamm gefüllt. Nach Auspolymerisieren wurde das Gel mit 150 ml 1x TAE überschichtet und der Kamm entfernt. Pro Geltasche wurden insgesamt 10 µl Probe, die zuvor mit Probenpuffer (10x) versetzt wurde und 4 µl Größenstandard (*DNA Molecular Weight Marker XIV*, 100 bp, Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 – 100 V über einen Zeitraum von 30 – 60 min.

9 Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit mittels Actinomycin D

Die mRNA-Halbwertszeit der humanen Arginase-2 und eNOS in HUVEC wurde mit Hilfe von Actinomycin D bestimmt. Dieser Interkalator bildet einen stabilen Komplex mit der DNA und inhibiert dadurch die Transkription der DNA in mRNA (Wadkins and Jovin, 1991). Die optimale Konzentration von Actinomycin D wurde in vorhergehenden Experimenten bestimmt und betrug 0,5 µg/ml.

HUVEC wurden, wie in Kapitel II.4.2.1 beschrieben, auf 6-well-Kulturplatten kultiviert. Zur Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit wurden die Zellen nach Erreichen einer 90%-igen Konfluenz mit 0,5 µg/ml Actinomycin D inkubiert. Der Effekt von (-)-Epicatechin auf die mRNA-Halbwertszeit wurde ermitteln, indem die Zellen gleichzeitig mit 0,5 µg/ml Actinomycin D und 3 µM (-)-Epicatechin behandelt wurden. Die Inkubationszeiten betrugen 12 h, 24 h, 36 h und 48 h. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Gesamt-RNA isoliert (vgl. Kapitel II.6). Diese wurde mittels reverser Transkription unter Einsatz von 0,5 µg RNA in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel II.7) und als *template* für Real-Time PCR unter Verwendung spezifischer Primer für humane Arginase-2 und eNOS eingesetzt (vgl. Kapitel II.8.2). Die Halbwertszeit, angegeben in Stunden, ist definiert als die Zeit, in der sich die Menge der Ausgangs-RNA (von unbehandelten Zellen) halbiert hat.

10 Proteinbestimmung nach Lowry

Proteinbestimmungen erfolgten mittels des kommerziell erhältlichen Bio-Rad D_C Protein Assay (Bio-Rad, München) nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951), gegen Standards aus Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 0,4 – 5,0 mg/ml. Der Assay basiert auf der Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung und Folins-Reagenz zu einer charakteristischen blauen Farbe.

Zuerst wurde das Arbeits-Reagens A' hergestellt, indem Reagenz S und Reagenz A (alkalische Kupfertartrat-Lösung) im Verhältnis 1:5 angesetzt wurden. Darauf folgend wurden 10 µl Probe mit 50 µl Reagenz A' und 400 µl Reagenz B (Folins-Reagenz) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verdünnt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl Probe in je ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption photometrisch bei 750 nm gemessen. Aus den Daten des BSA-Proteinstandards konnte der Proteingehalt der Proben in mg/ml ermittelt werden.

11 Bestimmung der Arginase-Aktivität

Die Arginase-Aktivität wurde über den in der Reaktion gebildeten Harnstoff bestimmt. Dieser reagiert im sauren Milieu mit α -Isonitrosopropiophenon (ISPF) zu einem rötlichen Farbkomplex, dessen Absorption bei 540 nm gemessen werden kann (Corraliza *et al.*, 1994). Anhand von Harnstoff-Standards (100 – 500 nmol) wurde die Harnstoffmenge in den Proben errechnet.

11.1 Vorbereitung der Zellen

HUVEC wurden gemäß Kapitel II.4.2.1 in Ø 9,4 cm Zellkulturschalen kultiviert. Nach Erreichen einer 90%-igen Konfluenz wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an (-)-Epicatechin und des Flavanol-Gemisches in serumfreiem *Endothelial Cell Basal Medium* MV2 für 48 h inkubiert (vgl. Kapitel II.4.4.1). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 10 mM L-Valin (kompetitiver Arginase-Inhibitor) oder mit je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β inkubiert wurden (vgl. Kapitel II.4.4.2). Nach der Inkubation wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 250 µl Lysepuffer aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde unverdünnt in den Arginase-Assay eingesetzt.

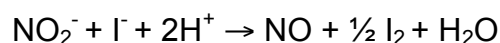
11.2 Arginase-Assay

Zunächst wurde die Arginase aktiviert, indem das vorbereitete Lysat im Verhältnis 1:1 mit 10 mM MnCl_2 -Puffer vermischt und für 10 min bei 55°C im Heizblock inkubiert wurde. Das aktivierte Lysat wurde erneut im Verhältnis 1:1 mit 0,5 M L-Arginin versetzt und für 1,5 h bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Enzymreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 800 μl Säuregemisch ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O} = 1:3:7$) gestoppt. Danach wurden 50 μl 9% ISPF zugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 95°C (unter Lichtausschluss) erfolgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit (20.800 x g). Abschließend wurden 100 μl Probe in je ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 540 nm gemessen. Aus den Daten der Harnstoff-Standards konnte die Harnstoffmenge der Proben in nmol pro Stunde bestimmt und auf den Proteingehalt (vgl. Kapitel II.10) normiert werden.

12 Bestimmung der eNOS-Aktivität

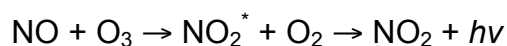
12.1 reduktive Chemilumineszenzdetektion (CLD)

Zur Detektion des Stickstoffmonoxid-Gehalts in Zellkulturüberständen wurde der NO-Analysator CLD 88 der Firma Eco Physics (München) mit einer *Range*-Einstellung von 600 verwendet. Die Bestimmung von NO in flüssigen Proben, basierend auf der Chemilumineszenzreaktion mit Ozon, ist eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden. In Lösung reagiert NO mit molekularem Sauerstoff zu Nitrit (NO_2^-), welches in den meisten Zellkultursystemen das Hauptoxidaionsprodukt von NO darstellt. Die eNOS-Aktivität wurde daher indirekt über den Nitritgehalt im Kulturüberstand mittels reduktiver Chemilumineszenzdetektion (CLD) ermittelt. Dabei wird zunächst das Nitrit der Probe mit Iodid unter sauren Bedingungen wieder zu NO reduziert.



Da die Reaktion bei 60°C stattfindet, geht das entstandene NO aus der flüssigen Phase in die Gasphase über, welche durch einen permanenten Heliumfluss in die Reaktionskammer des Analysators transportiert wird. Zum Schutz der Anlage passierte das Probengas zunächst eine Kühleinheit (4°C) sowie ein mit 1 M NaOH gefülltes Gefäß, bevor es den Analysator erreichte. Der Reaktionskammer wird

neben dem Gasgemisch auch Ozon (O₃) zugeleitet, welches aus Sauerstoff generiert wird. O₃ reagiert bei der Chemilumineszenzreaktion mit NO zu Stickstoffdioxid (NO₂), wovon sich unter den gegebenen Bedingungen 20% im angeregten Zustand (NO₂^{*}) befinden. NO₂^{*} geht unter Emission von elektromagnetischer Strahlung (Lumineszenz) wieder in den Grundzustand über (Clough, 1967).



Die Strahlungsemission liegt im Wellenlängenbereich von 600 – 3.000 nm, mit einem Intensitätsmaximum bei ca. 1.200 nm. Diese Chemilumineszenz wird von einem *Photomultiplier* erfasst, verstärkt und das resultierende Signal über eine *Interface-Box* an die Auswertungseinheit weitergeleitet.

12.1.1 Vorbereitung der Zellen

HUVEC wurden gemäß Kapitel II.4.2.1 in 6-*well*-Kulturplatten bis zu einer 90%-igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden danach mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Flavanole oder des Flavanol-Gemisches für 2 h in *Endothelial Cell Basal Medium* MV2 inkubiert (vgl. Kapitel II.4.4.1). Das Endvolumen pro *well* betrug dabei 500 µl. Um den Nitrit-Hintergrund (Nullwert) zu ermitteln, wurden 500 µl Medium in *well*s ohne Zellen gefüllt. Nach der Inkubation wurde der Kulturüberstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, das zuvor mit Reinstwasser ausgespült wurde, überführt und der Nitritgehalt mittels reduktiver CLD bestimmt. Die Zellen wurden mit 75 µl Lysepuffer lysiert und der Proteingehalt ermittelt (vgl. Kapitel II.10).

12.1.2 Nitritbestimmung im Kulturüberstand

Um konstante Werte zu erzielen, wurde der Analysator, sowie das Kühl- und Heizaggregat mindestens eine Stunde vor Messbeginn eingeschaltet. In einem Reaktionsgefäß, welches dem Analysator vorgeschaltet ist, wurden ca. 20 ml jodhaltige Reaktionslösung eingefüllt und mittels Heizaggregat auf 60°C temperiert. Mit einer gasdichten Spritze wurden 100 µl der flüssigen Probe über eine Membran in die Reaktionskammer appliziert. Nach jeder Probenaufgabe wurde die Spritze einmal mit Aceton sowie dreimal mit Reinstwasser gespült. Zur Datenaufnahme und Datenauswertung diente die Software Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin). Die Intensität des Signals wurde als Fläche unter der Kurve bestimmt. Mit Hilfe von Natriumnitrit-Standards im Bereich von 200 – 1.000 nM, welche in *Endothelial Cell*

Basal Medium MV2 für jede Versuchsreihe frisch angesetzt wurden, konnte anschließend der Nitrit-Gehalt der Probe in nM errechnet und nach Abzug des Nullwertes auf den Proteingehalt normiert werden.

12.2 Direkter Nachweis von NO mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um intrazellulär gebildetes NO in Endothelzellen nachzuweisen, wurde der zell-permeable Fluoreszenzfarbstoff MNIP (4-Methoxy-2-(1*H*-naphtho[2,3-*d*]imidazol-2-yl)phenol) verwendet. Das Fluorophor MNIP wird mit Kupferionen zu einer stabilen, nichtfluoreszierenden Verbindung (MNIP-Cu) komplexiert. Diese reagiert schnell und spezifisch mit NO zu dem N-nitrosierten, blau-fluoreszierenden MNIP-NO und freien Kupferionen (vgl. Abbildung 14) (Ouyang *et al.*, 2008).

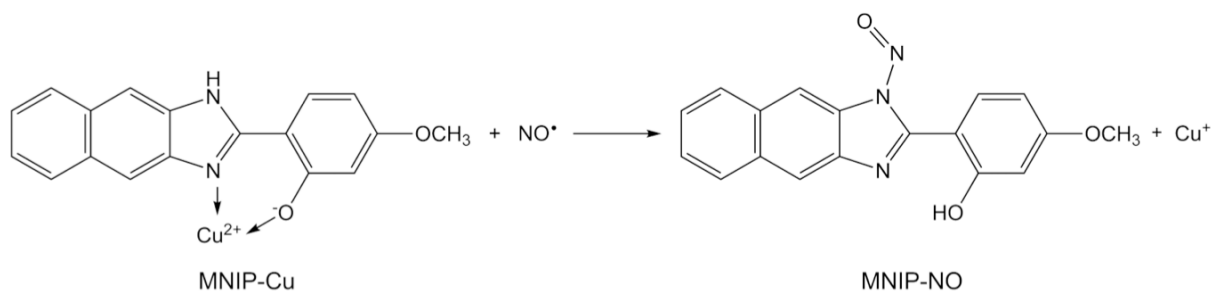


Abbildung 14: Reaktion von MNIP-Cu mit NO zu dem blau-fluoreszierenden MNIP-NO.

Der Fluoreszenzfarbstoff MNIP wurde von Hr. Claas Hundsdoerfer (Institut für Organische Chemie I, Düsseldorf) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

12.2.1 Herstellung der MNIP-Cu-Lösung

Der MNIP-Cu-Komplex wurde für jede Versuchsreihe frisch angesetzt. Dazu wurde zuvor eine 10 mM MNIP-Stocklösung in DMSO angesetzt, die bei -20°C gelagert werden kann. Darauf folgend wurden 200 µl einer 50 mM Kupfersulfat-Lösung (angesetzt in Reinstwasser) auf 1 ml der MNIP-Stocklösung gegeben, sodass ein molares MNIP:Cu Verhältnis von 1:1 vorliegt. Der Ansatz wurde anschließend 5 min unter Lichtausschluss mittels Vortex gemischt, um eine stabile, gelbe MNIP-Cu-Lösung zu erhalten.

12.2.2 Vorbereitung der Zellen und Detektion der Fluoreszenz im Mikroskop

HUVEC wurden gemäß Kapitel II.4.2.1 auf Glasplättchen in Ø 3,5 cm Zellkulturschalen kultiviert. Nach Erreichen einer 90%-igen Konfluenz wurden die Zellen mit 1 µM bzw. 10 µM (-)-Epicatechin oder 0,1 µM β-Östradiol (eNOS-Aktivator) zusammen mit je 10 µM MNIP-Cu in HANKS' *Balanced Salt Solution* (HBSS) für 2 h und 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS gewaschen, das Glasplättchen in der Atta Fluor Zellkammer (Invitrogen, Karlsruhe) eingespannt und die Zellen mit 1 ml HBSS überschichtet. Die Fluoreszenz des intrazellulär gebildeten MNIP-NO wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 100TV (Zeiss, Jena) mit einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm detektiert und mit Hilfe der zugehörigen Kamera (vgl. Kapitel II.1.2) dokumentiert. Die Kameraeinstellungen waren dabei folgende: Belichtung: 556 ms, Verstärker: 60.

12.2.3 Fluoreszenzmessung der MNIP-Cu-Lösungen mittels Fluorimeter

Um Effekte von (-)-Epicatechin oder β-Östradiol auf die Stabilität des MNIP-Cu-Komplexes auszuschließen, wurde die Grundfluoreszenz der *in vitro* eingesetzten MNIP-Cu-Lösungen bestimmt (10 µM MNIP-Cu mit 1 µM bzw. 10 µM (-)-Epicatechin oder 0,1 µM β-Östradiol, vgl. Kapitel II.12.2.2). Als Vergleich diente eine 10 µM MNIP-Lösung (ohne Kupfer) in HBSS. Jeweils 100 µl der Lösungen wurden in je ein *well* einer schwarzen 96-*well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Fluoreszenz wurde sofort (0 h), sowie nach 2 h und 4 h im Fluorimeter (BMG LabTec, Offenburg) mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm, einer Emissionswellenlänge von 520 nm und einer *Gain*-Einstellung von 2200 vermessen.

13 Bestimmung der NF-κB-Aktivität mittels Reporter-gen-Assay

Zur Bestimmung der NF-κB-Aktivität wurde die humane stabil transfizierte Lungenepithelzelllinie A549/8-pNF-κB-Luc eingesetzt, die in Kapitel II.4.1.2 näher beschrieben ist. Da die NF-κB-Bindungssequenzen vor einem Luziferase-Reporter-gen lokalisiert sind, konnte die NF-κB-Aktivität mit Hilfe eines Luziferase-Reporter-gen-Assays indirekt bestimmt werden (de Wet *et al.*, 1985). Dabei wird durch eine Biolumineszenzreaktion, welche aus der Oxidation von Luziferin resultiert, die Luziferase-Aktivität ermittelt.

13.1 Vorbereitung der Zellen

A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen wurden gemäß Kapitel II.4.2.2 in 12-*well*-Kulturplatten bis zu einer 90%-igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Flavanole und des Flavanol-Gemisches für 48 h in FCS-freiem RPMI-Medium vorinkubiert (vgl. Kapitel II.4.4). Danach erfolgte eine vierstündige Zytokinaktivierung mit je 50 U/ml oder 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (vgl. Kapitel II.4.4.2).

13.2 Luziferase-Reportergen-Assay

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ernten der Zellen wurde der *5x Reporter Gene Assay Lysis Buffer* zuvor im Verhältnis 1:5 in Reinstwasser verdünnt. Die Zellen wurden mit 200 μ l pro *well* des 1x konzentrierten Lyse-Puffers 15 min bei 4°C inkubiert. Je 50 μ l des Lysats wurden in ein *well* einer weißen 96-*well*-Mikrotiterplatte überführt. Die Luziferasereaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l pro *well* *Bright Light Substrat* gestartet. Die daraus resultierende Lichtemission wurde unverzüglich mittels Luminometer gemessen und auf den Proteingehalt normiert.

14 Humane Interventionsstudie

Die *in vivo* Studie befasste sich mit der Untersuchung zur Flavanol-abhängigen Modulation der Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten. Die Studie wurde insgesamt zweimal mit unterschiedlichem Probandenkollektiv durchgeführt.

14.1 Studienprotokoll

Bei der Interventionsstudie handelte es sich um eine randomisierte Studie im *Cross-Over-Design*. Zehn gesunde Probanden nahmen sowohl einen Flavanol-armen Kakao als auch einen Flavanol-reichen Kakao mit 80 mg bzw. 985 mg Gesamtflavanolen ein. Die erythrozytäre Arginase-Aktivität wurde vor Kakao-Einnahme sowie 2 h und 24 h danach bestimmt (vgl. Kapitel II.11.2). In der zweiten Studie wurde zusätzlich die Serum-Konzentration von Gesamtepicatechin (freies sowie glukuronidiertes und sulfatiertes (-)-Epicatechin) vor Kakao-Einnahme sowie 2 h, 4 h und 24 h danach mit Hilfe der RP-HPLC bestimmt (vgl. Kapitel II.15). Die Probanden

wurden angewiesen am Tag vor der Kakao-Einnahme auf Flavanol-reiche Kost, wie Tee, Rotwein, Gemüse und Kakao-Produkte zu verzichten. Die Blutabnahme vor der Kakao-Einnahme sowie 24 h danach erfolgte morgens beim nüchternen Probanden. Zwischen der Einnahme und der Blutabnahme 4 h später war keine Mahlzeit erlaubt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf genehmigt.

14.2 Probandenkollektiv

Für die vorliegende Studie wurden gesunde Personen (Frauen und Männer) im Alter von 27-32 Jahren, mit einem BMI von 19 – 25 kg/m² rekrutiert. Ausschlusskriterien waren Rauchen, Schwangerschaft, Übergewicht, Bluthochdruck und Diabetes mellitus. Vor Studienbeginn wurden die Probanden detailliert über die Studie informiert und die schriftliche Einwilligung der Teilnehmer eingeholt.

14.3 Herstellung und Zusammensetzung des Kakaos

Der Kakao wurde erst unmittelbar vor der Einnahme aus Kakao-Pulver (Cocoapro®) hergestellt, welches freundlicherweise von Dr. Kwik Uribe (Mars Incorporated, Hackettstown, New Jersey, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurden je 54 g des Kakao-Pulvers in 200 ml Wasser gelöst. Der Flavanol-arme und -reiche Kakao waren gleich in Geschmack und Aussehen, sowie im Gehalt an Makro- und Mikronährstoffen, Kaloriengehalt, Theobromin und Koffein. Sie unterschieden sich lediglich in ihrem Flavanolgehalt. Die Zusammensetzung der beiden Kakaoprodukte ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Flavanol-reichen und -armen Kakaos. Angaben pro 54 g Kakao-Pulver, gelöst in 200 ml Wasser.

Inhaltsstoffe	Flavanol-reich	Flavanol-arm
Energie, kJ	666	717
Fett, g	3,0	3,0
Natrium, mg	180	420
Kohlenhydrate, g	27,0	27,0
Ballaststoffe, g	12,0	12,0
Zucker, g	15,0	15,0
Eiweiß, g	15,0	15,0
Koffein, mg	31,8	36,6
Theobromin, mg	585	570
Kakao Flavanole gesamt, mg	985	80,4
Monomere, mg	244,2	24,6
(-)-Epicatechin	183	19,8
(+)-Catechin	61,2	4,8
Dimere, mg	215	23,1
Trimere, mg	174	14,6
Tetramere, mg	152	12,0
Pentamere, mg	102	6,3
Hexamere, mg	53,7	0
Heptamere, mg	34,5	0
Oktamere, mg	5,7	0

14.4 Blutabnahme und Probenaufarbeitung

Alle vorbereiteten Lösungen und Zentrifugen wurden auf 4°C gekühlt. Zur Blutabnahme wurde das Vacutainer-System verwendet. Um eine Hämolyse zu vermeiden, wurde auf eine langsame, gleichmäßige Blutabnahme und rasches Überführen in die vorbereiteten Röhrchen geachtet.

14.4.1 Erythrozytenisolierung zur Bestimmung der Arginase-Aktivität

Vor der Blutabnahme wurde eine 20 ml Spritze, bei der zunächst der Stempel entfernt wurde, mit einem Combi-Stopper versehen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gestellt. Anschließend wurden 10 µl Heparin-Natrium 5000 (1 µl/ml Vollblut) auf den Spritzenboden pipettiert. Zur Bestimmung der Arginase-Aktivität wurden dem

Probanden 10 ml Vollblut entnommen und vorsichtig in die vorbereitete Spritze überführt. Es folgte ein sofortiger Zentrifugationsschritt für 20 min bei 740 x g und 4°C. Das Plasma wurde verworfen und nach Entfernen des Combi-Stoppers wurden 2/3 der Erythrozyten in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Bestimmung der Arginase-Aktivität (vgl. Kapitel II.11) wurden die Erythrozyten zuvor 1:200 mit Lysepuffer verdünnt und 30 - 60 sec mittels Vortex durchmischt.

14.4.2 Serumgewinnung zur Bestimmung des Gesamtepicatechins

Um Serum aus Vollblut zu gewinnen wurde bei der Blutabnahme das Vacutainer-System in Kombination mit 10 ml CAT-Vacutainer verwendet. Nach der Blutentnahme wurden die Vacutainer 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Während dieser Zeit fand die Gerinnungsreaktion statt, wodurch das anschließende Abnehmen des Serums ermöglicht wurde. Die Proben wurden bis zur HPLC-Analytik (vgl. Kapitel II.15.1) bei -80°C gelagert.

15 Instrumentelle Analytik mittels RP-HPLC

Bei der *high performance liquid chromatography* (HPLC) handelt es sich um ein Flüssigchromatographie-Verfahren, mit dem man Substanzen trennen und mit Hilfe von Standards identifizieren sowie quantifizieren kann. Zur Analyse der aus der humanen Interventionsstudie gewonnenen Serumproben (vgl. Kapitel II.14.4.2) wurde die *reversed phase* (RP) - Verteilungschromatographie eingesetzt, bei der die stationäre Phase verglichen mit der mobilen unpolarer ist.

15.1 Vorbereitung der Proben und HPLC-Bedingungen

Um die Konzentration des Gesamtepicatechins im Serum nach Kakao-Einnahme zu bestimmen, wurden zuerst 500 µl Serum mit 1 ml Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 5) und 20 µl β -Glukuronidase/Sulfatase in einem Polypropylenröhrchen bei 37°C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die erste Extraktion mit 5 ml *tert*-Butylmethylether. Nach einminütigem Durchmischen wurde die Probe zur Phasentrennung bei 3857 x g für 10 min zentrifugiert. Die organische, obere Phase wurde in ein neues Polypropylenröhrchen überführt. Der Rest wurde einem zweiten Extraktionsschritt mit 5 ml *tert*-Butylmethylether unterzogen. Die organischen Phasen der ersten und zweiten Extraktion wurden vereinigt und im Stickstoffstrom

getrocknet. Der Rückstand wurde in 200 µl Fließmittel (mobile Phase) aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand mit Hilfe der HPLC vermessen werden. Die Bedingungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des Gesamtprocatechins in humanem Serum nach Einnahme eines Flavanol-reichen und -armen Kakaos.

Säule	LiChrospher100 RP-18e (5 µm) 250x4 mm mit Vorsäule 10x4 mm
Mobile Phase	2 mM KH ₂ PO ₄ + 1,7 mM EDTA + 15% ACN
Gradient	Isokratisch
Fluss	1 ml/min
Temperatur	35°C
Elektrochemische Detektion	+0,75 V
Injektionsvolumen	50 µl

16 Statistik

Alle Daten der Zellkulturversuche sind als arithmetische Mittelwerte aus mindestens drei Messwerten ± Standardabweichung (SD) angegeben. Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test (zweiseitig für unabhängige Proben) berechnet. Die Daten der *in vivo* Studie wurden einzeln oder als arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) angegeben. Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test (zweiseitig für gepaarte Proben) berechnet

III Experimente und Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen unter physiologischen sowie inflammatorischen Bedingungen untersucht. Zu diesem Zweck wurden humane, venöse Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) als Modellsystem in Zellkulturexperimenten eingesetzt. Diese wurden zum einen mit (-)-Epicatechin und zum anderen mit einem Gemisch aus Kakao-Flavanolen sowie einzelnen Komponenten des Flavanol-Gemisches inkubiert. Untersucht wurde anschließend die mRNA-Expression und Enzymaktivität von Proteinen, die beim Metabolismus von L-Arginin eine wichtige Rolle spielen. Neben den Zellkulturversuchen wurde auch eine humane Interventionsstudie mit gesunden Erwachsenen durchgeführt, die im *Cross-Over-Design* einen Flavanol-reichen und einen Flavanol-armen Kakao einnahmen. Im Rahmen der Studie wurde die Konzentration an Gesamtepicatechin im Serum bestimmt und die Auswirkung der Flavanole auf die erythrozytäre Arginase-Aktivität ermittelt.

1 Einfluss von (-)-Epicatechin auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen

Bei (-)-Epicatechin handelt es sich um den Hauptvertreter der Flavanol-Monomere in Kakaobohnen. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass ein regelmäßiger Verzehr Flavanol-reicher Nahrung vor Herz-Kreislaferkrankungen schützt. Zurückzuführen ist dies unter anderem auf eine verbesserte Endothelfunktion, wobei der molekulare Wirkmechanismus bisher nicht bekannt ist (Bayard *et al.*, 2007). Enzyme, die für die Gefäßhomöostase eine wichtige Rolle spielen sind die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und die Arginase-2 (vgl. Kapitel I.3), die beide L-Arginin als Substrat nutzen (vgl. Kapitel I.2). Eine Erklärung der protektiven Wirkung von (-)-Epicatechin könnte daher eine Modulation des L-Argininstoffwechsels in Endothelzellen sein, der bei diversen Herz-Kreislaferkrankungen gestört ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Vermutung überprüft werden und damit zum besseren Verständnis des molekularen Wirkmechanismus von (-)-Epicatechin beitragen.

1.1 Effekt von (-)-Epicatechin auf die Zellviabilität

Zu Beginn der Zellkulturexperimente wurde untersucht, ob (-)-Epicatechin Einfluss auf die Zellviabilität hat. Dazu wurden HUVEC mit den Konzentrationen behandelt, die auch in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt werden sollten. Die Inkubationszeit betrug dabei 24 h oder 48 h. Die Zellviabilität wurde anschließend mittels Sulforhodamin B (SRB) Assay bestimmt (vgl. Kapitel II.5) und ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle angegeben, welche gleich 100% gesetzt wurde. In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass (-)-Epicatechin unter den gegebenen Bedingungen die Zellviabilität nicht beeinflusst. Somit konnte im betrachteten Konzentrationsbereich eine Toxizität der Substanz im Zellmodell ausgeschlossen und Konzentrationen bis 30 μM für die folgenden Zellkulturexperimente eingesetzt werden.

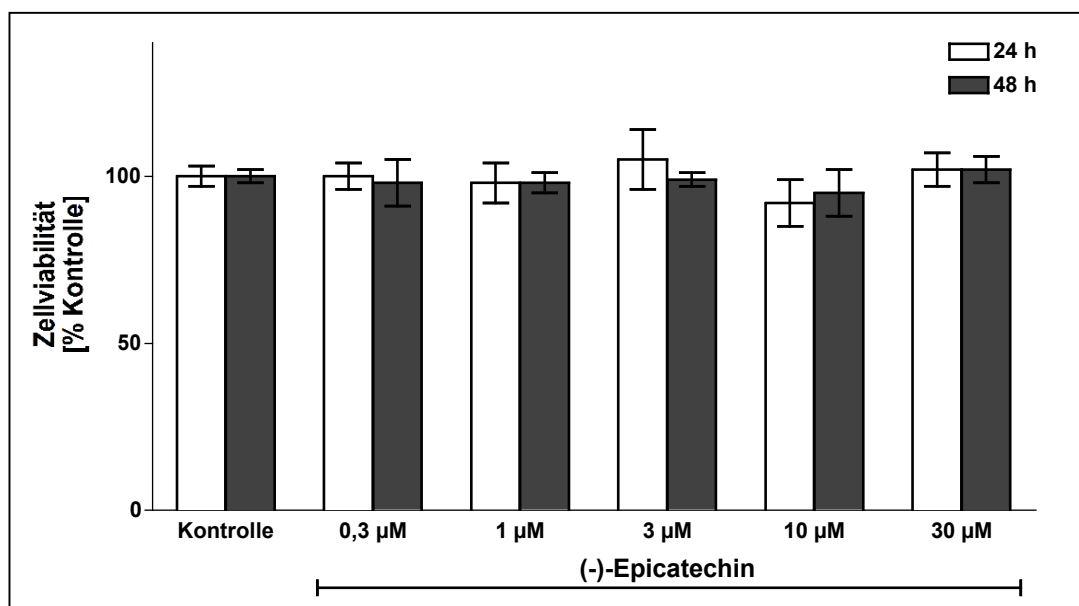


Abbildung 15: Effekt von (-)-Epicatechin auf die Viabilität humaner Endothelzellen. HUVEC wurden mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen für 24 h und 48 h inkubiert und anschließend die Zellviabilität mit Hilfe des SRB-Assays bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6.

1.2 Effekt von (-)-Epicatechin auf die mRNA-Expression der Arginase-2 und eNOS

Nachdem gezeigt werden konnte, dass (-)-Epicatechin die Zellviabilität nicht beeinträchtigt, wurden als erstes die Effekte der Substanz auf die mRNA-Expression der Arginase-2 und der eNOS untersucht. Dazu wurden HUVEC mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen für 2 h und 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit einem proinflammatorischen Zytokin-Mix (je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β) behandelt wurden. Diese Zytokine setzen die mRNA-Expression der Arginase-2 und eNOS herab (Suschek *et al.*, 2004). Nach den festgelegten Inkubationszeiten wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, die als *template* für Real-Time PCR diente (vgl. Kapitel II.6 und 7). Unter Einsatz spezifischer Primer für humane Arginase-2 und eNOS, sowie das Referenzgen GAPDH, wurde eine Expressionsanalyse der beiden Zielgene durchgeführt (vgl. Kapitel II.8). In Abbildung 16A ist zu erkennen, dass eine zwei-stündige Inkubation der Zellen mit (-)-Epicatechin keinen Effekt auf die Arginase-2 mRNA-Expression hat. Nach 24 h Inkubation mit 1 μ M und 3 μ M (-)-Epicatechin konnte man eine Verminderung der Arginase-2 mRNA-Expression um $30\% \pm 0,5\%$ und $28\% \pm 1,1\%$ messen, verglichen mit unbehandelten Zellen (Kontrolle). Bei Inkubation der Zellen mit 10 μ M (-)-Epicatechin ergab sich eine Abnahme um insgesamt $37\% \pm 1,6\%$, was mit der Abnahme, 24 h nach Zugabe des Zytokin-Mixes vergleichbar war ($44\% \pm 6,7\%$).

Im Gegensatz dazu konnten weder nach 2 h noch nach 24 h statistisch signifikante Effekte von (-)-Epicatechin auf die eNOS mRNA-Expression beobachtet werden (Abbildung 16B).

Die vorgestellten Daten zeigen, dass (-)-Epicatechin in der Lage ist, den L-Arginin-stoffwechsel humaner Endothelzellen *in vitro* zu beeinflussen. Die mRNA-Expression der Arginase-2 war nach 24 h vermindert, die eNOS mRNA-Expression blieb unverändert.

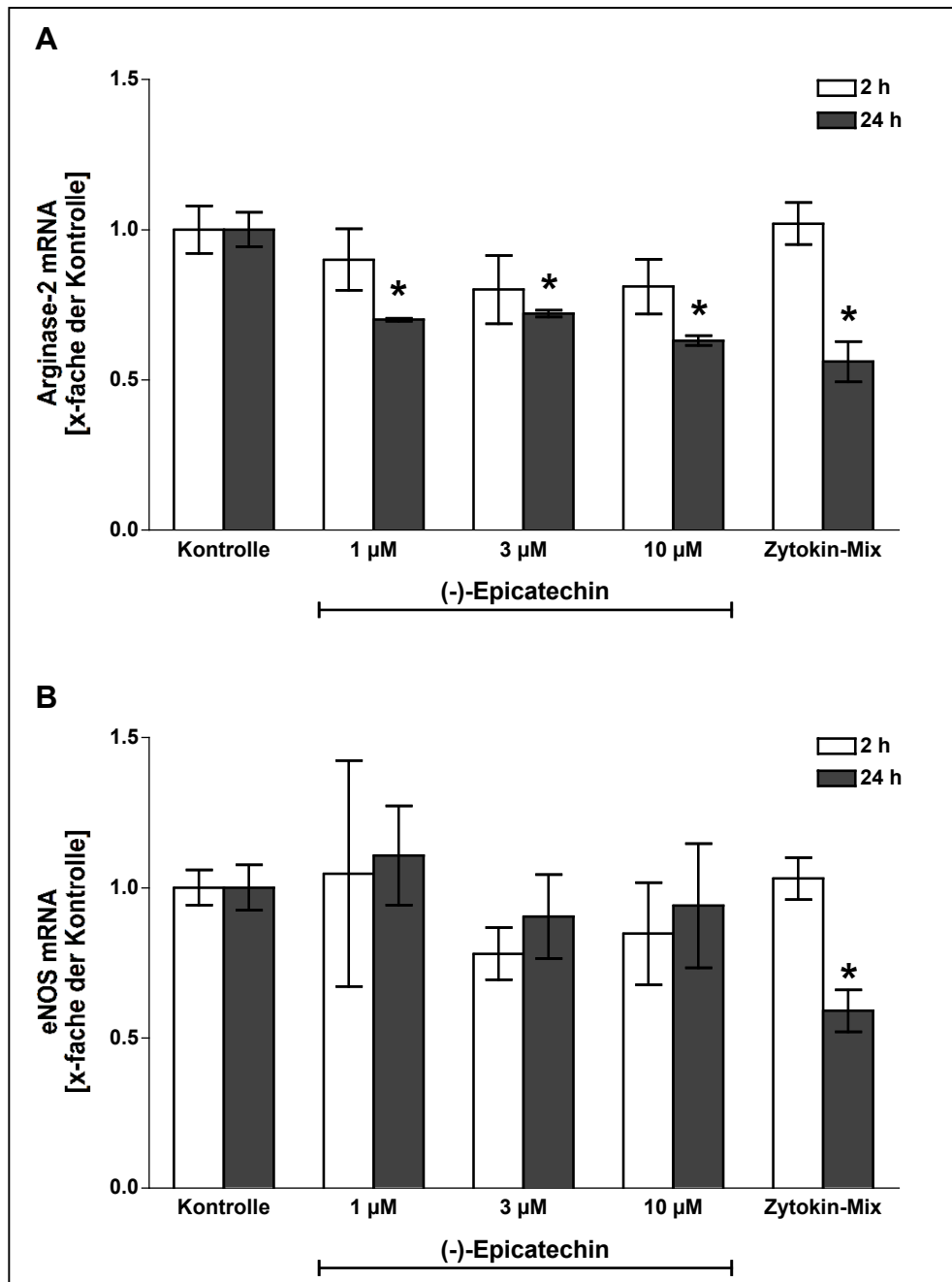


Abbildung 16: Effekt von (-)-Epicatechin auf die Arginase-2 und eNOS mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen für 2 h und 24 h inkubiert. Die Expressionsanalyse der humanen Arginase-2 (A) und eNOS (B) wurde mittels Real-Time PCR durchgeführt. Kontrolle: unbehandelte Zellen; Zytokin-Mix: je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β . Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6; *p < 0,05 bezogen auf die zugehörige Kontrolle.

1.3 Effekt von (-)-Epicatechin auf die Aktivität der Arginase und eNOS

Neben den Effekten von (-)-Epicatechin auf die Arginase-2 und eNOS mRNA-Expression wurden auch Auswirkungen auf die Enzymaktivität untersucht. Dazu wurden HUVEC mit verschiedenen Konzentrationen an (-)-Epicatechin inkubiert und anschließend die Enzymaktivitäten gemessen.

Um die Arginase-Aktivität zu bestimmen, wurden die Zellen nach 48-stündiger Inkubation lysiert. Die Enzymaktivität wurde anschließend anhand der Harnstoffsynthese ermittelt (vgl. Kapitel II.11). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 10 mM L-Valin, einem kompetitiven Arginase-Inhibitor, oder einem Zytokin-Mix (je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β) behandelt wurden, welcher die Arginase mRNA-Expression erniedrigt. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) führte eine 48-stündige Inkubation der Zellen mit 3 μ M (-)-Epicatechin zu einer signifikant erniedrigten Arginase-Aktivität ($0,50 \pm 0,01$ vs. $0,66 \pm 0,04$ μ mol x mg Protein⁻¹ x h⁻¹, $p < 0,05$; vgl. Abbildung 17A). Eine weitere Abnahme auf $0,46 \pm 0,05$ μ mol x mg Protein⁻¹ x h⁻¹ wurde nach Inkubation mit 10 μ M (-)-Epicatechin erreicht. Ähnlich erniedrigt war die Arginase-Aktivität nach Zytokinbehandlung ($0,38 \pm 0,07$ μ mol x mg Protein⁻¹ x h⁻¹). Eine Inkubation der Zellen mit L-Valin führte nach 48 h zu einer Senkung der Arginase-Aktivität auf $0,21 \pm 0,03$ μ mol x mg Protein⁻¹ x h⁻¹.

Zur Bestimmung der eNOS-Aktivität wurde 2 h nach Zugabe von (-)-Epicatechin der Nitrit-Gehalt im Kulturüberstand mit Hilfe der reduktiven Chemilumineszenzdetektion (CLD) ermittelt (vgl. Kapitel II.12). Nach Normierung auf den Proteingehalt wurde die relative eNOS-Aktivität in Prozent bezogen auf unbehandelte Zellen (Kontrolle) berechnet (vgl. Abbildung 17B). Eine Inkubation der Zellen mit 0,3 μ M (-)-Epicatechin führte nach 2 h zu einer Steigerung der eNOS-Aktivität um $35 \% \pm 3\%$, verglichen mit der Kontrolle. Ein maximaler Aktivitätsanstieg von $45\% \pm 11\%$ konnte mit 1 μ M (-)-Epicatechin erreicht werden. Bei höheren Konzentrationen war kein Effekt messbar.

Anhand dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin den L-Argininstoffwechsel humaner Endothelzellen nicht nur auf der Ebene der mRNA-Expression beeinflusst (vgl. Kapitel III.1.2), sondern auch Effekte auf der Proteinebene ausübt. Die Arginase-Aktivität wurde 48 h nach Zugabe von (-)-Epicatechin

dosisabhängig vermindert. Im Gegensatz dazu führte eine zweistündige Inkubation der Zellen mit (-)-Epicatechin zu einer Steigerung der eNOS-Aktivität.

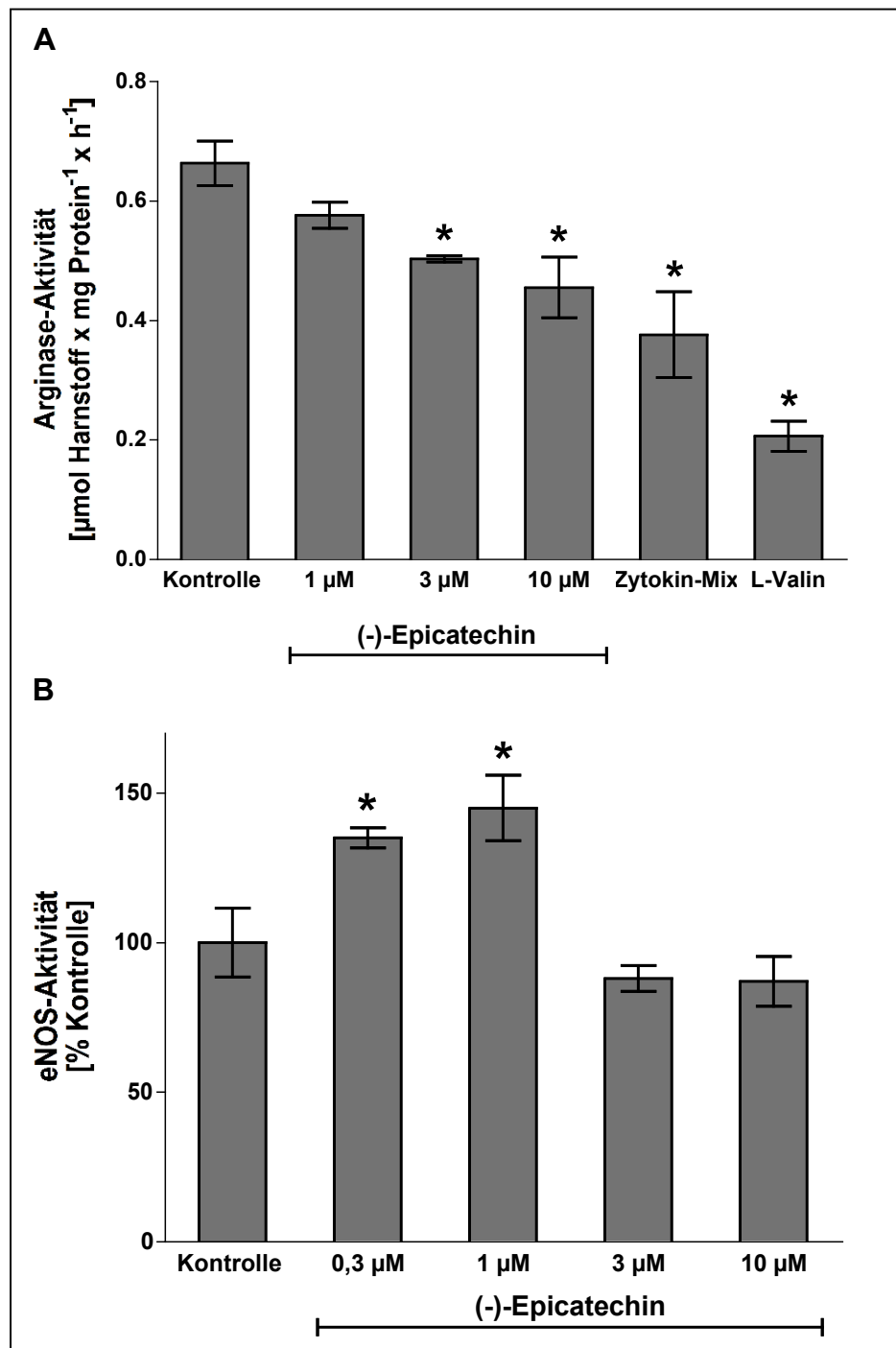


Abbildung 17: Effekt von (-)-Epicatechin auf die Aktivität der Arginase und eNOS in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen inkubiert. Kontrolle: unbehandelte Zellen. (A) Die Arginase-Aktivität wurde nach 48-stündiger Inkubation durch photometrische Bestimmung der Harnstoffsynthese ermittelt. Zytokin-Mix: je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β ; L-Valin: 10 mM. (B) Die eNOS-Aktivität wurde nach zweistündiger Inkubation durch Bestimmung des Nitrit-Gehalts im Kulturüberstand mittels reduktiver CLD ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6, *p < 0,05 bezogen auf die Kontrolle.

1.4 Bestimmung der NO-Synthese mittels Fluoreszenzmikroskopie

Kürzlich wurde in der Literatur ein Fluoreszenzfarbstoff beschrieben (4-Methoxy-2-(1*H*-naphtho[2,3-*d*]imidazol-2-yl)phenol, MNIP), der eine spezifische NO-Detektion *in vitro* ermöglicht (Ouyang *et al.*, 2008). Da der direkte Nachweis von NO bisher nicht möglich war, wird die eNOS-Aktivität indirekt über die Bildung der Oxidationsprodukte von NO (Nitrit oder Nitrat) bestimmt (z.B. mittels CLD, vgl. Kapitel II.12.1). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der direkte Nachweis der eNOS-Aktivität (über NO-Bildung) in HUVEC mit Hilfe des Fluorophors MNIP als Alternative zur reduktiven Chemilumineszenzdetektion etabliert werden. Anschließend wurde untersucht, ob eine gesteigerte NO-Bildung nach (-)-Epicatechin-Behandlung verzeichnet werden kann. Dies könnte auf eine erhöhte eNOS-Aktivität zurückgeführt werden und den unter Kapitel III.1.3 beobachteten Effekt von (-)-Epicatechin bestätigen.

1.4.1 Untersuchung zur Stabilität des MNIP-Cu-Komplexes in Zellkulturmedien

Für die nachfolgenden Zellkulturversuche wurde das fluoreszierende MNIP mit Kupfer zu einem nicht fluoreszierenden MNIP-Cu-Komplex koordiniert, welcher dann spezifisch mit NO wieder zu einem fluoreszierenden Produkt (MNIP-NO) reagieren kann (vgl. Kapitel II.12.2). Vorab wurde das optimale Zellkulturmedium zum Ansetzen des MNIP-Cu-Komplexes ermittelt. Getestet wurden dabei das bisher für die Zellkultur verwendete *Endothelial Cell Basal Medium* MV2 (BM) und HANKS' *Balanced Salt Solution* (HBSS). Dazu wurden jeweils 10 μ M MNIP- und MNIP-Cu-Lösungen mit den verschiedenen Medien hergestellt (vgl. Kapitel II.12.2.1). Als Kontrolle dienten eine 10 μ M MNIP- bzw. MNIP-Cu-Lösung, die in Reinstwasser angesetzt wurde. Die Fluoreszenz der Lösungen wurde sofort (0 h) sowie 2 h und 4 h nach dem Ansetzen mittels Fluorimeter (Anregungswellenlänge: 355 nm, Emissionswellenlänge: 520 nm) gemessen und in Relation zur MNIP-Kontrolle angegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt. Die verschiedenen Ansätze der MNIP- und MNIP-Cu-Lösungen blieben über die Dauer der Untersuchung stabil, sodass im Folgenden jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (von 0 h, 2 h und 4 h) beschrieben wird. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass eine Koordination von Kupferionen mit dem in Reinstwasser angesetzten MNIP (Kontrolle) die Fluoreszenz fast vollständig unterdrückt. Die Restfluoreszenz des MNIP-Cu betrug $2,3\% \pm 0,5\%$, verglichen mit der MNIP-Fluoreszenz (100%). Im Gegensatz dazu betrug die relative Fluoreszenz des in BM angesetzten MNIP nur noch $52,6\% \pm 4,2\%$. Eine

Zugabe von Kupferionen führte zu einer Verminderung der Fluoreszenz auf $19,7\% \pm 4,4\%$. Im Vergleich zur MNIP-Kontrolle konnte bei der MNIP-Lösung in HBSS eine relative Fluoreszenz von $77,7\% \pm 3,7\%$ ermittelt werden. Eine Koordination mit Kupferionen zu MNIP-Cu resultierte hier in einer starken Abnahme der Fluoreszenz auf $1,9\% \pm 0,4\%$, bezogen auf die MNIP-Kontrolle.

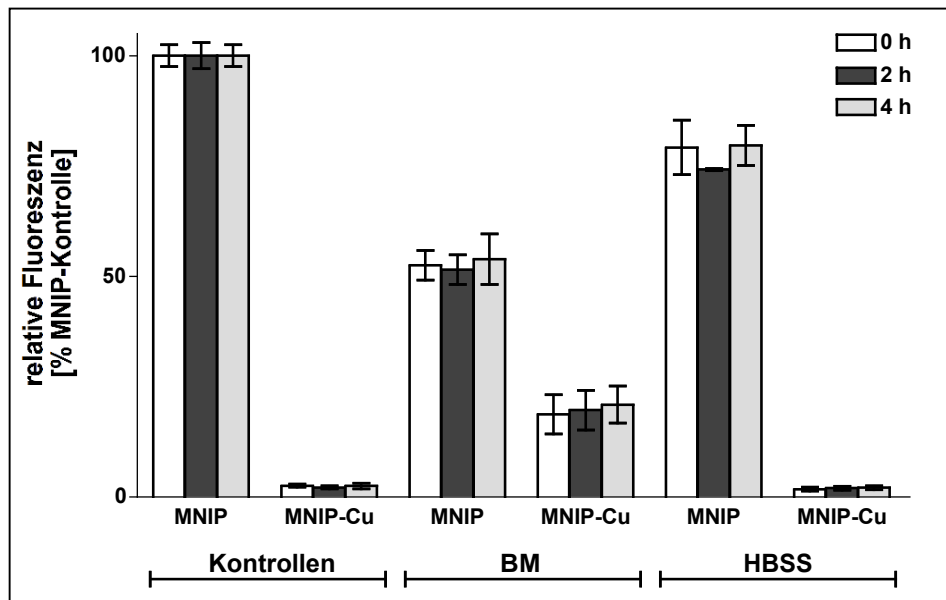


Abbildung 18: Stabilität des MNIP-Cu-Komplexes in verschiedenen Zellkulturmedien. Je $10 \mu\text{M}$ MNIP und MNIP-Cu wurden in Reinstwasser (Kontrolle), *Endothelial Cell Basal Medium* MV2 (BM) oder *HANKS' Balanced Salt Solution* (HBSS) hergestellt und die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n=3$.

Eine Koordination des Fluorophors MNIP mit Kupferionen ist ausschlaggebend für dessen Fluoreszenzverlust. In BM konnte nur eine 64%-ige Unterdrückung der MNIP-Fluoreszenz durch Kupferionen erzielt werden. Im Gegensatz dazu wurde in HBSS eine 97%-ige Abnahme der MNIP-Fluoreszenz nach Kupferkomplexierung erreicht, die über einen Zeitraum von vier Stunden stabil blieb. Somit konnte HBSS als optimales Zellkulturmedium zur Herstellung einer stabilen, nichtfluoreszierenden MNIP-Cu-Lösung bestimmt werden. Alle MNIP- wie auch MNIP-Cu-Lösungen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit in HBSS angesetzt.

1.4.2 Einfluss von (-)-Epicatechin und β -Östradiol auf die MNIP-Cu-Stabilität

Anschließend wurde untersucht, ob (-)-Epicatechin als Chelatbildner die Kupferionen aus der MNIP-Cu-Verbindung komplexieren kann. Die daraus resultierende MNIP-Bildung durch Entzug der Kupferionen hätte einen Fluoreszenzanstieg zur Folge und würde in späteren Versuchen (vgl. Kapitel III.1.4.3) zu falsch positiven Ergebnissen

führen. Aus gleichem Grund wurde der Effekt von β -Östradiol auf die MNIP-Cu-Stabilität ermittelt. Bei β -Östradiol handelt es sich um einen eNOS-Aktivator, der im folgenden Versuch als Positivkontrolle eingesetzt werden soll (Kim *et al.*, 2008). Dazu wurden 1 μ M und 10 μ M (-)-Epicatechin sowie 0,1 μ M β -Östradiol mit einer 10 μ M MNIP-Cu-Lösung angesetzt. Als Kontrollen dienten jeweils eine 10 μ M MNIP- und MNIP-Cu-Lösung. Die Fluoreszenz der Lösungen wurde sofort (0 h) sowie 2 h und 4 h nach dem Ansetzen mittels Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen und in Relation zur MNIP-Kontrolle angegeben (vgl. Kapitel II.12.2.2). Die verschiedenen MNIP- und MNIP-Cu-Lösungen blieben über die Dauer der Untersuchung stabil, sodass im Folgenden jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (von 0 h, 2 h und 4 h) beschrieben wird. Eine Komplexierung von MNIP mit Kupferionen führte wie erwartet zu einer 97,3%-igen Absenkung der Fluoreszenz (Abbildung 19). Nach Zugabe von 1 μ M oder 10 μ M (-)-Epicatechin zur MNIP-Cu-Lösung konnte weiterhin ein 97,1%-iger und 96,5%-iger Fluoreszenzverlust beobachtet werden. Ebenso wurde bei der MNIP-Cu-Lösung, die mit 0,1 μ M β -Östradiol versetzt wurde, eine um 97,6% verminderte Fluoreszenz, verglichen mit der MNIP-Kontrolle, verzeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass weder (-)-Epicatechin als potentieller Chelatbildner noch β -Östradiol die Stabilität des MNIP-Cu-Komplexes beeinflussen.

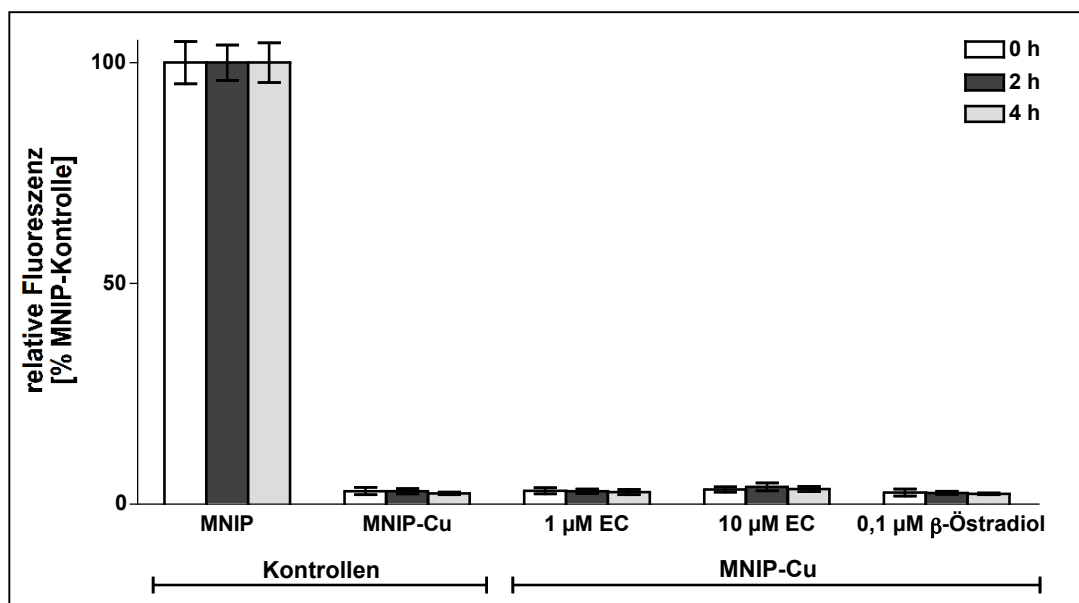


Abbildung 19: Einfluss von (-)-Epicatechin (EC) und β -Östradiol auf die Stabilität des MNIP-Cu-Komplexes. Die MNIP- bzw. MNIP-Cu-Konzentration betrug jeweils 10 μ M. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=3.

1.4.3 Effekt von (-)-Epicatechin auf die NO-Produktion in HUVEC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass (-)-Epicatechin und β -Östradiol die Stabilität des MNIP-Cu-Komplexes nicht beeinflussen, wurde untersucht, ob der unter Kapitel III.1.3 beobachtete Anstieg der eNOS-Aktivität nach (-)-Epicatechin-Behandlung auch mit Hilfe des Fluorophors MNIP über die NO-Bildung detektiert werden kann. Dazu wurden HUVEC mit 1 μ M und 10 μ M (-)-Epicatechin in einer 10 μ M MNIP-Cu-Lösung für 2 h und 4 h inkubiert (vgl. Kapitel II.12.2.2). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die anstelle des (-)-Epicatechins mit 0,1 μ M β -Östradiol behandelt wurden. Nach den Inkubationszeiten wurde die Fluoreszenz des intrazellulär gebildeten MNIP-NO in lebenden Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dokumentiert und mit Kontrollzellen, welche nur mit MNIP-Cu inkubiert wurden, verglichen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte in Graustufen. Um den Effekt von (-)-Epicatechin und β -Östradiol auf die NO-Synthese besser zu visualisieren, wurden den Graustufen Fehlfarben zugeordnet. Dabei wird der geringsten Fluoreszenz (geringe MNIP-NO-Konzentration) die Farbe Dunkelblau zugeordnet. Mit zunehmender MNIP-NO-Konzentration steigt die Fluoreszenz und die Färbung ändert sich über Grün, Gelb bis hin zu Rot (stärkste Fluoreszenz). Verglichen mit den Kontrollzellen, führte eine zweistündige Inkubation mit 1 μ M und 10 μ M (-)-Epicatechin zu einer vermehrten MNIP-NO-Bildung, die jener nach β -Östradiol-Behandlung entsprach (vgl. Abbildung 20). Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 4 h resultierte in einer noch stärkeren MNIP-NO-Produktion durch (-)-Epicatechin und β -Östradiol, während die Kontrollzellen nur eine minimale Zunahme zeigten. Die höchste MNIP-NO-Konzentration wurde 4 h nach Zugabe von 10 μ M (-)-Epicatechin und 0,1 μ M β -Östradiol erreicht.

Damit konnte belegt werden, dass (-)-Epicatechin in der Lage ist die NO-Bildung und damit die eNOS-Aktivität in HUVEC zu steigern. Außerdem konnte eine erfolgreiche Anwendung des neuen Fluoreszenzfarbstoffs MNIP in Zellkulturversuchen gezeigt werden.

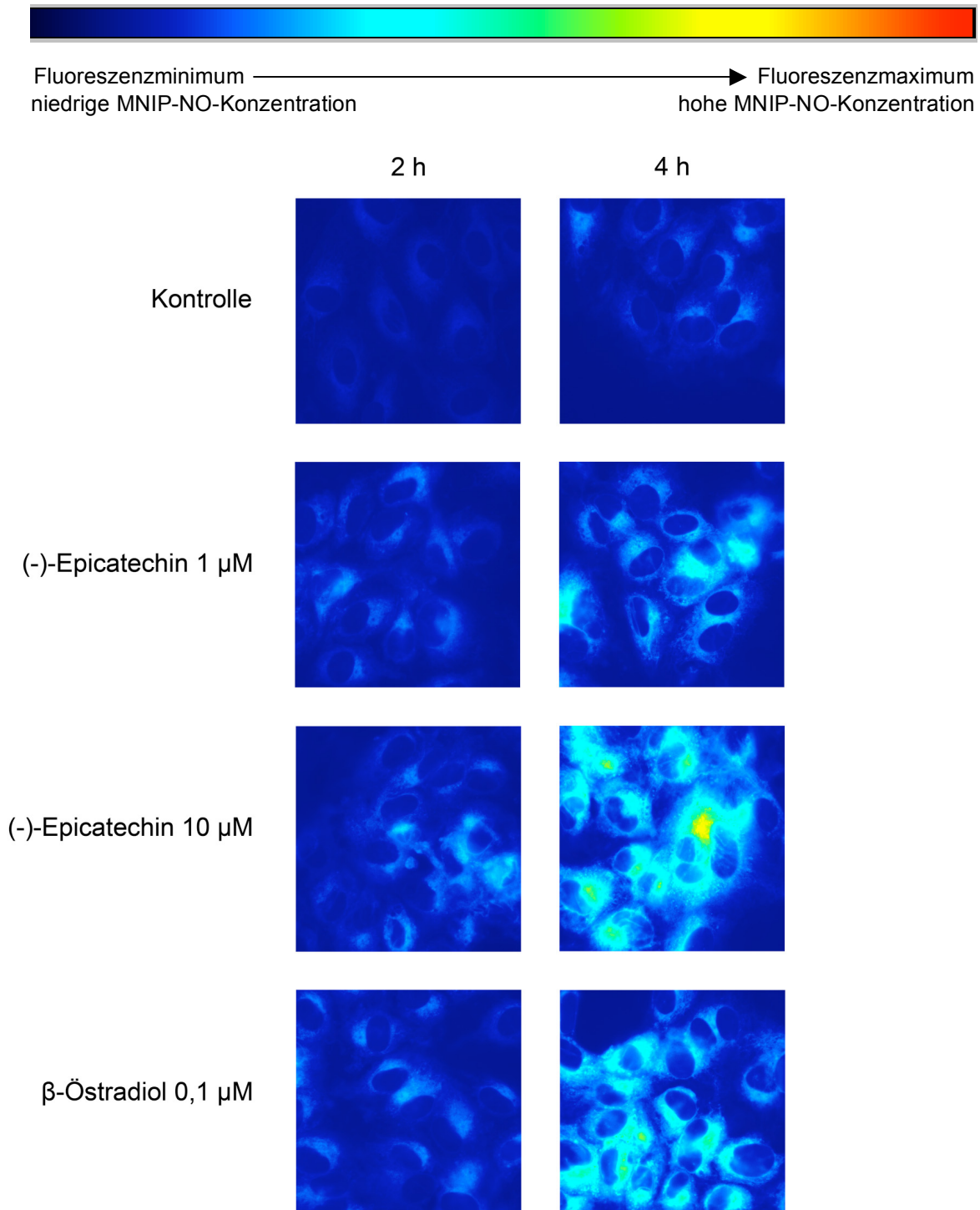


Abbildung 20: Effekt von (-)-Epicatechin auf die eNOS-abhängige NO-Bildung in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit 1 µM und 10 µM (-)-Epicatechin oder 0,1 µM β-Östradiol (eNOS-Aktivator) für 2 h und 4 h zusammen mit 10 µM MNIP-Cu inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit MNIP-Cu behandelt wurden. Das intrazellulär gebildete NO reagiert mit MNIP-Cu zu MNIP-NO und führt zu einem Fluoreszenzanstieg, der mittels Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm detektiert wurde.

1.5 Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit von Arginase-2 und eNOS

Die Effekte von (-)-Epicatechin auf die mRNA-Expression bzw. Enzymaktivität der Arginase unterliegen einem unterschiedlichen zeitlichen Verlauf. Die Verringerung der mRNA-Expression konnte bereits 24 h nach Versuchsbeginn nachgewiesen werden (vgl. Kapitel III.1.2), während es auf der Proteinebene 48 h dauerte, bis es zu einer Verringerung der Aktivität kam (vgl. Kapitel III.1.3). Daher stellte sich die Frage, ob die Abnahme der Arginase-Aktivität nach 48 h auf die verminderte mRNA-Expression zurückzuführen ist. Um dies zu klären wurde die mRNA-Halbwertszeit der Arginase-2 bestimmt. Zudem wurde die Halbwertszeit der eNOS-mRNA ermittelt und überprüft, ob (-)-Epicatechin die Halbwertszeit beider mRNAs beeinflusst. Dazu wurden HUVEC mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D, in An- und Abwesenheit von 3 μ M (-)-Epicatechin, für 12 h, 24 h, 36 h und 48 h inkubiert (vgl. Kapitel II.9). In Vorversuchen wurde die optimale Konzentration von Actinomycin D auf 0,5 μ g/ml festgelegt. Nach den Inkubationszeiten wurde die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA als *template* für Real-Time PCR, unter Einsatz spezifischer Primer für humane Arginase-2 und eNOS, verwendet (vgl. Kapitel II.6-7 und 8.2). Abschließend wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen die relative Abnahme der mRNA in Prozent errechnet. Für die Arginase-2 mRNA konnte eine Halbwertszeit von ca. 24 h ermittelt werden (vgl. Abbildung 21A). Die mRNA-Halbwertszeit der eNOS beträgt ca. 20 h (vgl. Abbildung 21B). Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass weder die mRNA-Halbwertszeit der Arginase-2 noch die der eNOS von (-)-Epicatechin beeinflusst wird.

Das Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die verminderte Arginase-Aktivität nach 48-stündiger (-)-Epicatechin-Behandlung aus der verminderten mRNA-Expression resultiert. (-)-Epicatechin beeinflusst somit den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen auf Ebene der mRNA-Expression (Arginase) sowie Enzymaktivität (eNOS), die mRNA-Halbwertszeit bzw. Stabilität bleibt unverändert.

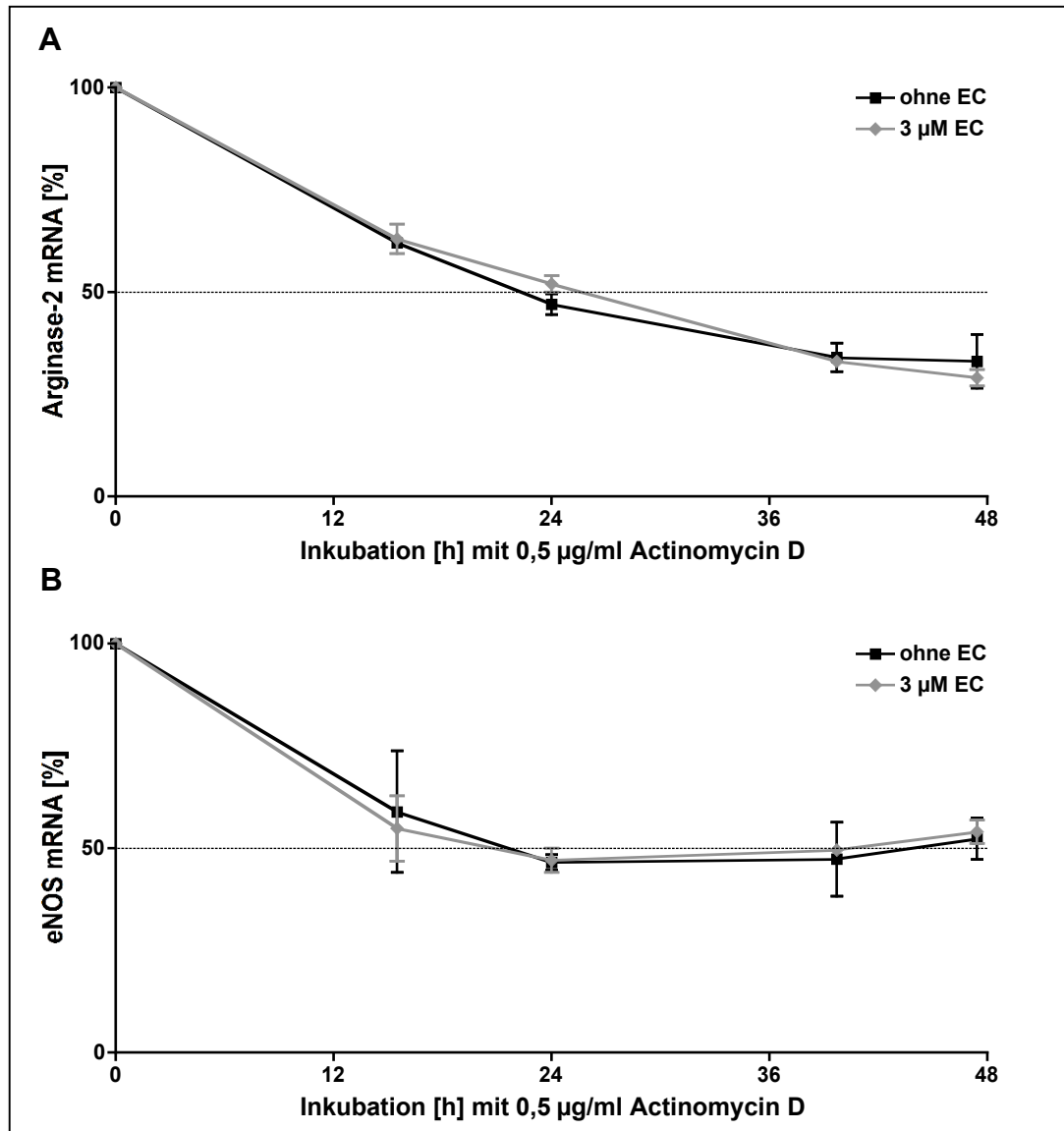


Abbildung 21: Effekt von (-)-Epicatechin auf die mRNA-Halbwertszeit der Arginase-2 und der eNOS in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit 0,5 μ g/ml Actinomycin D, in An- und Abwesenheit von 3 μ M (-)-Epicatechin (EC), bis zu 48 h inkubiert. Die relative mRNA-Abnahme der (A) Arginase-2 und (B) eNOS, verglichen mit unbehandelten Zellen (100%), wurde mittels Real-Time PCR bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6.

2 Einfluss des Flavanol-Gemisches auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen

Flavanole werden nach dem Verzehr während der Passage des Darmepithels und anschließend in der Leber metabolisiert. Zu diesen Stoffwechselreaktionen gehören unter anderem Methylierungen und Glukuronidierungen von Hydroxylgruppen. Daher liegen Kakao-Flavanole wie (-)-Epicatechin im Plasma überwiegend als Methylepicatechine, Epicatechin-Glukuronide und Methylepicatechin-Glukuronide vor (Baba *et al.*, 2000). Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde nun untersucht, ob die unter Kapitel III.1 beschriebenen Effekte von (-)-Epicatechin auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen auch mit einem Flavanol-Gemisch erhalten werden. Die Zusammensetzung des verwendeten Flavanol-Gemisches entsprach etwa dem Metabolitenmuster, welches im Plasma, zwei Stunden nach Einnahme eines Flavanol-reichen Kakaos (vgl. Kapitel II.14.3) gefunden wird (Schroeter *et al.*, 2006). Die Gesamtkonzentration der Flavanole im Plasma beträgt dabei 2,6 μM (Zusammensetzung vgl. Tabelle 7). Daher wurden für die Zellkulturversuche Konzentrationen von 2,6 μM sowie eine höhere und niedrigere Konzentration eingesetzt. Das Gemisch wurde von Dr. Hagen Schroeter (UC Davis, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt (vgl. Kapitel II.3.2).

Tabelle 7: Zusammensetzung des Flavanol-Gemisches. Die Konzentration der Gesamtflavanole beträgt 2,6 μM .

Flavanol	c[μM]
(+)-Catechin	0,4
(-)-Epicatechin	0,1
4'-O-Methylepicatechin	0,2
4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid	1,7
Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid	0,2

2.1 Effekt des Flavanol-Gemisches auf die mRNA-Expression der Arginase-2 und eNOS

Wie in den Zellkulturversuchen mit (-)-Epicatechin wurde zunächst überprüft, welchen Effekt das Flavanol-Gemisch auf die mRNA-Expression der Arginase-2 und eNOS in humanen Endothelzellen hat. Dazu wurden HUVEC mit verschiedenen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches für 2 h und 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein Zytokin-Mix (je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β), welcher die mRNA-Expression beider Gene erniedrigt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, die als *template* für Real-Time PCR diente (vgl. Kapitel II.6 und 7). Eine Expressionsanalyse beider Zielgene wurde unter Einsatz spezifischer Primer für humane Arginase-2 und eNOS, sowie das Referenzgen GAPDH, durchgeführt (vgl. Kapitel II.8). Eine Inkubation der Zellen mit 2,6 μ M und 7,8 μ M des Flavanol-Gemisches führte nach 2 h zu einer Verminderung der Arginase-2 mRNA-Expression um $21\% \pm 1,1\%$ und $21\% \pm 8,0\%$, bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen (vgl. Abbildung 22A). Nach 24-stündiger Inkubation mit 7,8 μ M des Flavanol-Gemisches konnte eine Erniedrigung der mRNA-Expression um $39\% \pm 11,8\%$ beobachtet werden, was etwa der Verminderung, 24 h nach Zugabe des Zytokin-Mixes entsprach ($44\% \pm 6,7\%$).

Im Gegensatz zur Arginase zeigte das Flavanol-Gemisch keine statistisch signifikanten Effekte auf die eNOS mRNA-Expression (vgl. Abbildung 22B).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der (-)-Epicatechin-Versuche (vgl. Kapitel II.1.2) führt eine Inkubation der Zellen mit dem Flavanol-Gemisch zu einer Abnahme der Arginase-2 mRNA-Expression, während die eNOS mRNA-Expression unverändert bleibt.

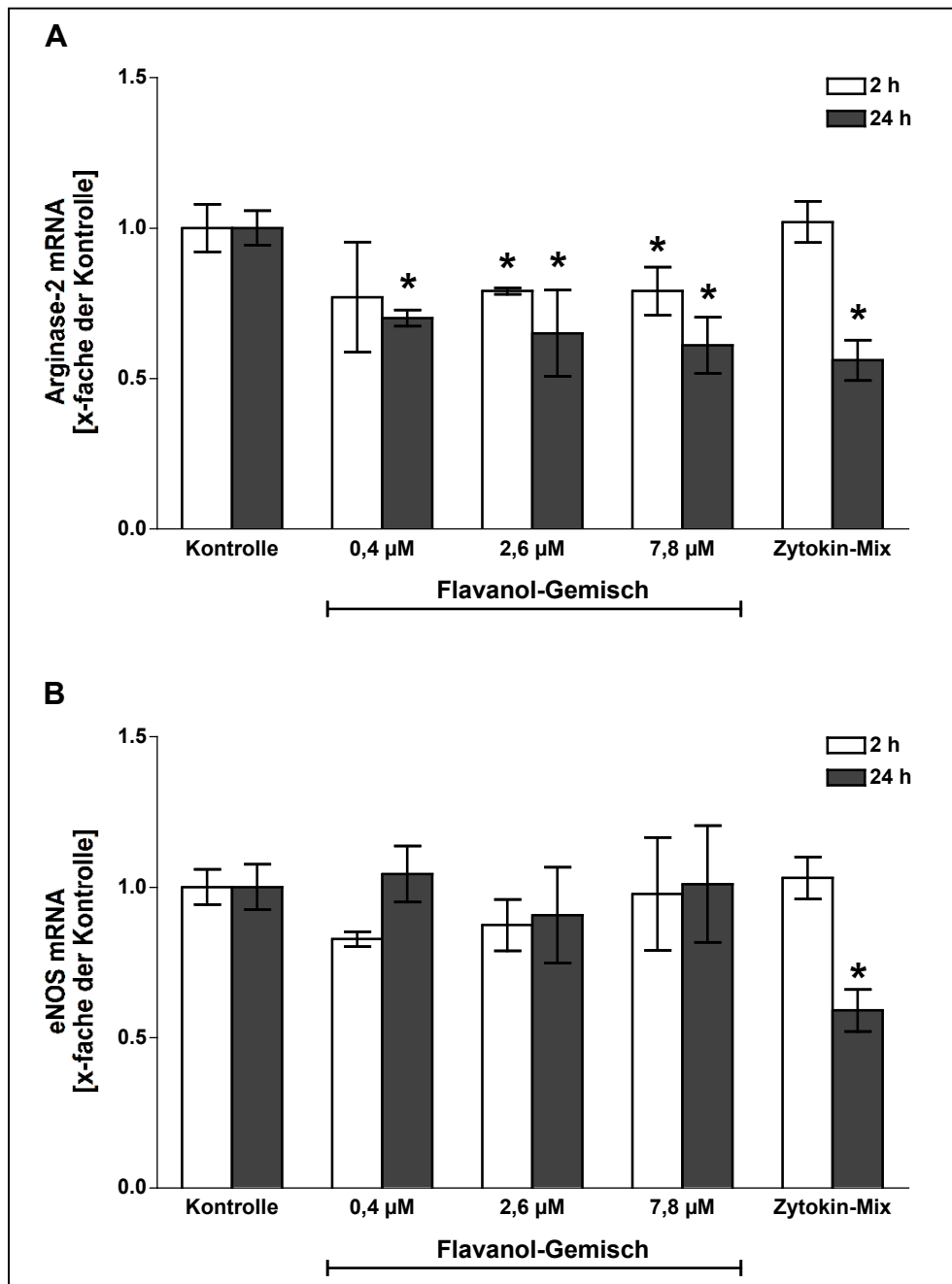


Abbildung 22: Effekt des Flavanol-Gemisches auf die Arginase-2 und eNOS mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches für 2 h und 24 h inkubiert. Die Expressionsanalyse der humanen Arginase-2 (A) und eNOS (B) wurde mittels Real-Time PCR durchgeführt. Kontrolle: unbehandelte Zellen; Zytokin-Mix: je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β . Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6; *p < 0,05 bezogen auf die zugehörige Kontrolle.

2.2 Effekt des Flavanol-Gemisches auf die Aktivität der Arginase und eNOS

Nachdem die Effekte des Flavanol-Gemisches auf die Arginase-2 und eNOS mRNA-Expression untersucht wurden, folgten Zellkulturversuche, die sich mit den Auswirkungen des Flavanol-Gemisches auf die Enzymaktivität beschäftigten. Dazu wurden HUVEC mit verschiedenen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches inkubiert und anschließend die Enzymaktivitäten gemessen.

Um die Arginase-Aktivität zu bestimmen, wurden die Zellen nach 48-stündiger Inkubation lysiert. Die Enzymaktivität wurde anschließend durch photometrische Bestimmung der gebildeten Harnstoffmenge ermittelt (vgl. Kapitel II.11). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 10 mM L-Valin, einem kompetitiven Arginase-Inhibitor, oder einem Zytokin-Mix (je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β) behandelt wurden, welcher die Arginase mRNA-Expression erniedrigt. In Abbildung 23A ist zu erkennen, dass, verglichen mit unbehandelten Zellen (Kontrolle), 48 h nach Zugabe von 2,6 μ M des Flavanol-Gemisches die Enzymaktivität in signifikantem Maße abnahm ($0,47 \pm 0,04$ vs. $0,67 \pm 0,04$ μ mol x mg Protein⁻¹ x h⁻¹, $p < 0,05$). Eine weitere Verminderung der Arginase-Aktivität auf $0,40 \pm 0,02$ μ mol x mg Protein⁻¹ x h⁻¹ wurde durch Inkubation der Zellen mit 7,8 μ M des Flavanol-Gemisches erreicht, was ungefähr der Abnahme nach Zytokinbehandlung entsprach ($0,38 \pm 0,07$ μ mol x mg Protein⁻¹ x h⁻¹). Zur Bestimmung der eNOS-Aktivität wurde nach zweistündiger Inkubation mit dem Flavanol-Gemisch der Nitritgehalt im Kulturüberstand mittels reduktiver Chemilumineszenzdetektion (CLD) ermittelt (vgl. Kapitel II.12). Nach Normierung auf den Proteingehalt wurde die relative eNOS-Aktivität in Prozent, bezogen auf unbehandelte Zellen (Kontrolle) berechnet. Verglichen mit der Kontrolle war 2 h nach Zugabe von 2,6 μ M des Flavanol-Gemisches eine Aktivitätssteigerung um $25\% \pm 2,0\%$ zu beobachten (vgl. Abbildung 23B). Eine Erhöhung der eNOS-Aktivität um insgesamt $40\% \pm 2,0\%$ wurde nach Inkubation mit 7,8 μ M des Flavanol-Gemisches verzeichnet.

Wie (-)-Epicatechin führt auch die Inkubation von HUVEC mit dem Flavanol-Gemisch zu einer dosisabhängigen Verminderung der Arginase-Aktivität, während die eNOS-Aktivität mit steigender Konzentration des Flavanol-Gemisches zunahm.

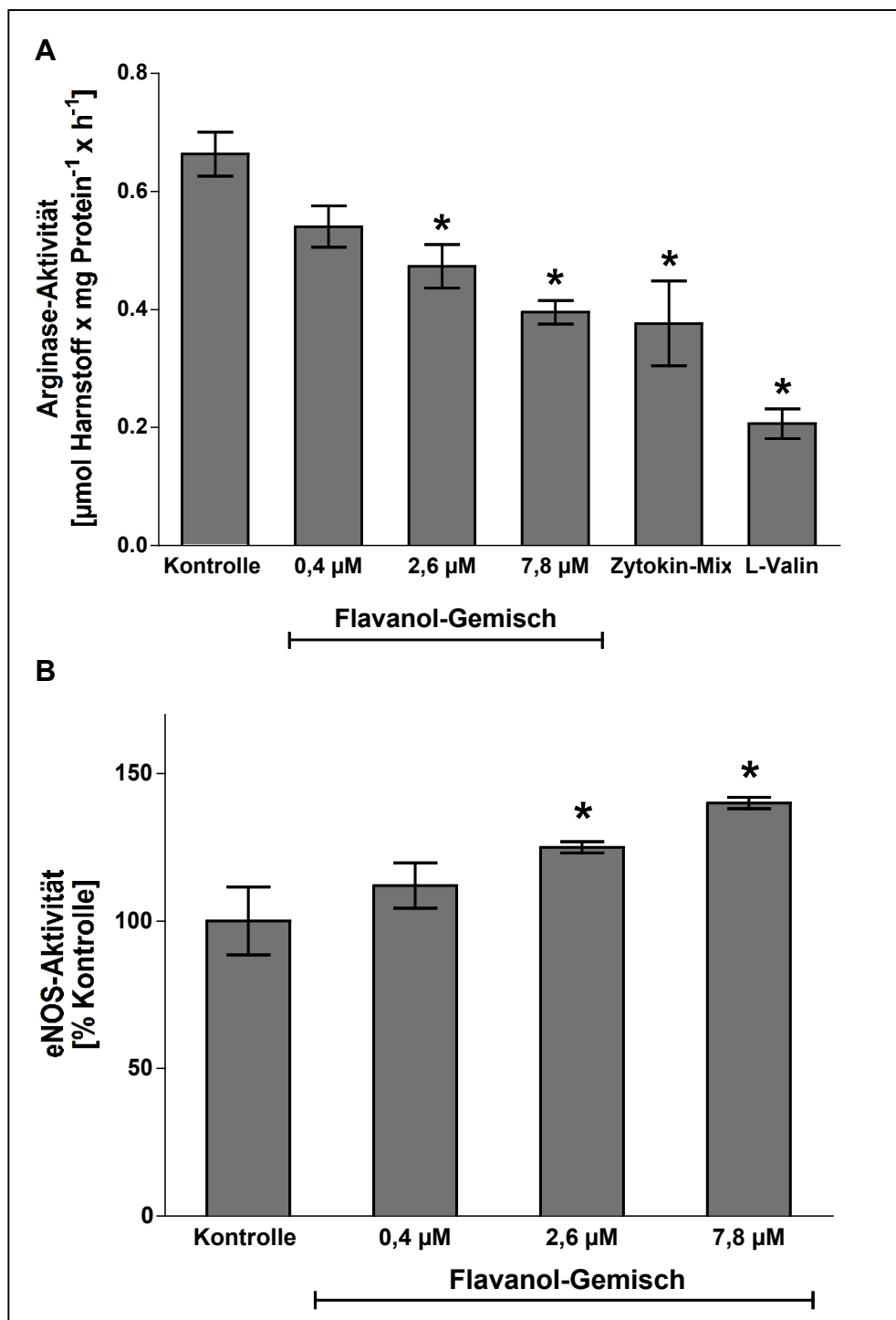


Abbildung 23: Effekt des Flavanol-Gemisches auf die Aktivität der Arginase und eNOS in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches inkubiert. Kontrolle: unbehandelte Zellen. (A) Die Arginase-Aktivität wurde nach 48-stündiger Inkubation durch photometrische Bestimmung der Harnstoffsynthese ermittelt. Zytokin-Mix: je 500 U/ml TNF- α und IL-1 β ; L-Valin: 10 mM. (B) Die eNOS-Aktivität wurde nach zweistündiger Inkubation durch Bestimmung des Nitrit-Gehalts im Kulturüberstand mittels reduktiver CLD ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6, *p < 0,05 bezogen auf die Kontrolle.

3 Einfluss von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen

Die vorangegangenen Versuche belegen, dass die Effekte des Flavanol-Gemisches auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen mit jenen von (-)-Epicatechin vergleichbar sind. Nun stellte sich die Frage, ob einzelne Komponenten des Flavanol-Gemisches besonders aktiv sind. Daher wurden in den folgenden Zellkulturversuchen einzelne Substanzen des Flavanol-Gemisches verwendet.

3.1 Effekt von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf die Arginase-2 mRNA-Expression

Sowohl (-)-Epicatechin als auch das Flavanol-Gemisch führten innerhalb von 24 h zu einer verminderten Arginase-2 mRNA-Expression in humanen Endothelzellen, während die eNOS mRNA-Expression unverändert blieb (vgl. Kapitel III.1.2 und 2.1). Daher wurde nachfolgend ausschließlich der Effekt einzelner Komponenten des Flavanol-Gemisches auf die Arginase-2 mRNA-Expression untersucht. Dazu wurden HUVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen an 4'-O-Methylepicatechin und Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid für 2 h und 24 h inkubiert. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und die erhaltene cDNA für Real-Time PCR verwendet (vgl. Kapitel II.6 und 7). Unter Einsatz spezifischer Primer für humane Arginase-2 und das Referenzgen GAPDH wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt (vgl. Kapitel II.8). In Abbildung 24A ist zu erkennen, dass eine zweistündige Inkubation mit 4'-O-Methylepicatechin keine signifikanten Effekte auf die Arginase-2 mRNA-Expression hat. Dem gegenüber führte eine 24-stündige Inkubation mit 3 μ M 4'-O-Methylepicatechin zu einer Abnahme um $26\% \pm 3,5\%$, verglichen mit unbehandelten Zellen (Kontrolle). Eine weitere Erniedrigung der mRNA-Expression um insgesamt $34\% \pm 3,0\%$ konnte nach Behandlung mit 10 μ M 4'-O-Methylepicatechin beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu zeigte Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid weder nach 2 h noch nach 24 h Effekte auf die Arginase-2 mRNA-Expression (vgl. Abbildung 24B).

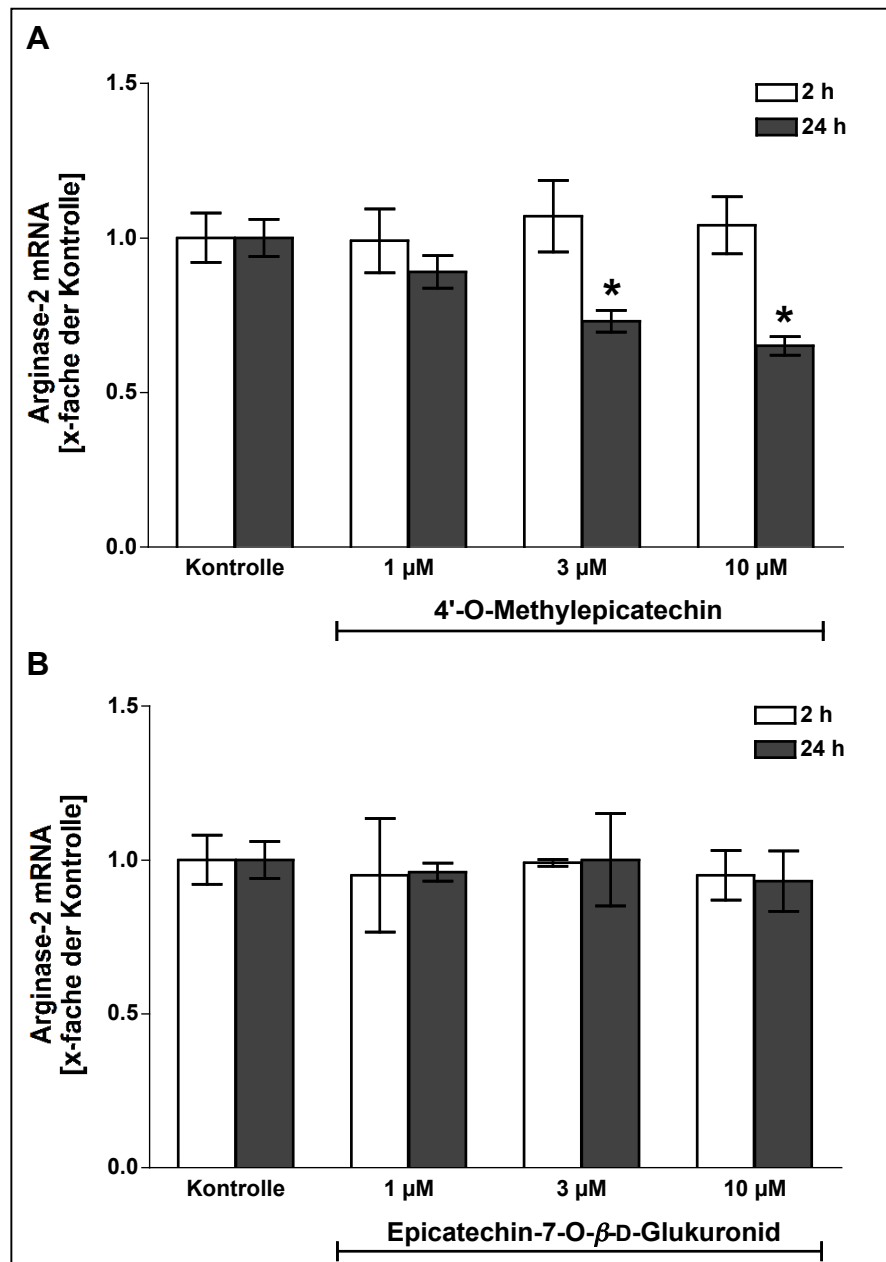


Abbildung 24: Effekt von 4'-O-Methylepicatechin und Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid auf die Arginase-2 mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit verschiedenen Konzentrationen der beiden (-)-Epicatechin-Metabolite für 2 h und 24 h inkubiert. Die Expressionsanalyse der humanen Arginase-2 wurde mittels Real-Time PCR durchgeführt. Kontrolle: unbehandelte Zellen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6; *p < 0,05 bezogen auf die zugehörige Kontrolle.

Von den beiden eingesetzten Metaboliten führte nur 4'-O-Methylepicatechin zu der erwarteten dosisabhängigen Abnahme der Arginase-2 mRNA-Expression innerhalb von 24 h.

3.2 Effekt von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid, Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid und (+)-Catechin auf die eNOS-Aktivität

Sowohl (-)-Epicatechin als auch das Flavanol-Gemisch führten auf Proteinebene zu einer verminderten Arginase- und gesteigerten eNOS-Aktivität. Da die Abnahme der Arginase-Aktivität nach 48 h auf die verminderte mRNA-Expression zurückzuführen ist (vgl. Kapitel II.1.5), wurde mit den einzelnen Flavanolen aus dem Gemisch nur der Effekt auf die eNOS-Aktivität untersucht. Dafür wurden HUVEC mit verschiedenen Konzentrationen von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid, Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid und (+)-Catechin für 2 h inkubiert. Danach wurde der Nitritgehalt im Kulturüberstand mit Hilfe der reduktiven Chemilumineszenzdetektion (CLD) bestimmt und auf den Proteingehalt normiert (vgl. Kapitel II.12). Anschließend wurde die relative eNOS-Aktivität in Prozent bezogen auf unbehandelte Zellen (Kontrolle) berechnet. In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass (+)-Catechin keine Auswirkungen auf die eNOS-Aktivität hat. Im Gegensatz dazu führte eine zweistündige Inkubation mit je 1 μ M der beiden eingesetzten Glukuronide zu einer durchschnittlich 4,5-fachen Steigerung der Enzymaktivität, verglichen mit der Kontrolle. Nach einer Inkubation mit 3 μ M 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid konnte noch eine 3,3-fache Erhöhung ($\pm 0,5$) der eNOS-Aktivität beobachtet werden, während 3 μ M Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid keinen Effekt mehr ausübte. Eine Steigerung der Konzentration auf 10 μ M führte bei beiden Glukuroniden zu einer Aufhebung des Effektes.

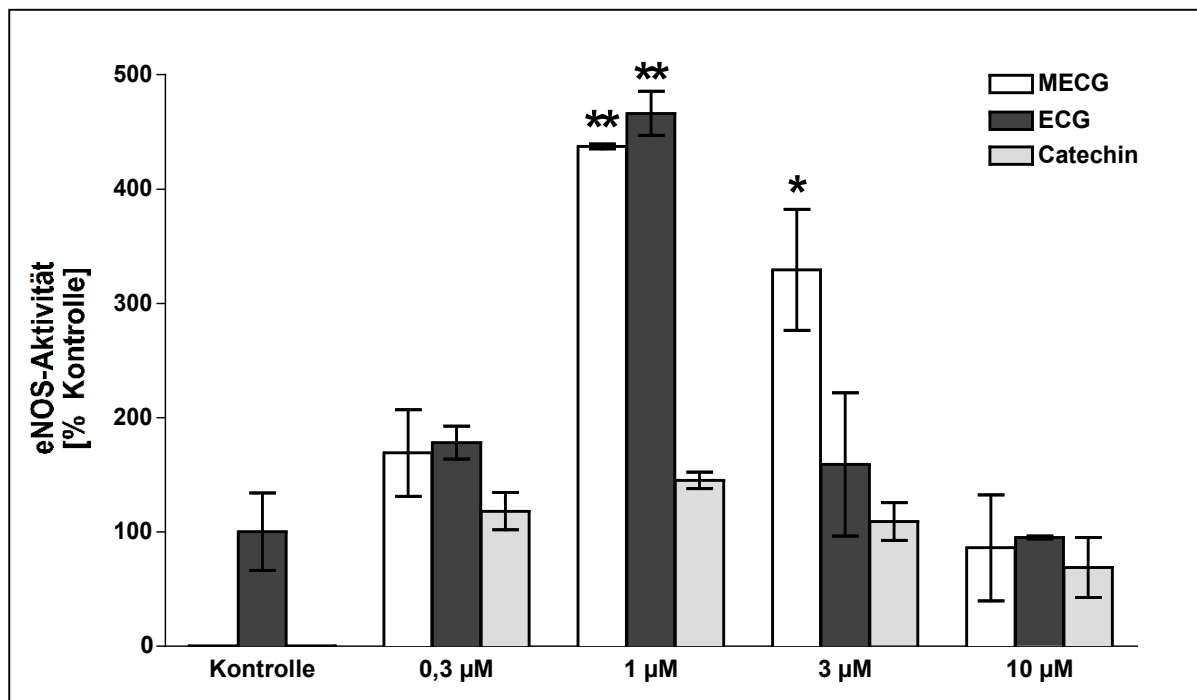


Abbildung 25: Effekt von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid (MECG), Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid (ECG) und (+)-Catechin auf die eNOS-Aktivität in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Flavanoide für zwei Stunden inkubiert. Die eNOS-Aktivität wurde durch Bestimmung des Nitrit-Gehalts im Kulturüberstand mittels reduktiver CLD ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=6, *p < 0,05 bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Zellen).

Von den drei eingesetzten Flavanol-Genen aus dem Flavanol-Gemisch führte sowohl eine Inkubation der HUVEC mit 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid als auch mit Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid zu einer Steigerung der eNOS-Aktivität. (+)-Catechin hatte keine Auswirkung auf die Enzymaktivität.

4 Einfluss von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen unter inflammatorischen Bedingungen

Im Verlauf einer akuten Entzündung kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Diese induzieren unter anderem die Expression des kationischen Aminosäuretransporters 2B (CAT-2B) und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), wodurch eine ausreichende Versorgung der Zelle mit L-Arginin gewährleistet wird, welches dann bevorzugt von der iNOS zu Stickstoffmonoxid umgesetzt wird. In der Literatur ist beschrieben, dass Kakao-Flavane antiinflammatorische Eigenschaften besitzen, wobei sie an der Entzündung beteiligte Signalkaskaden und Proteinfunktionen modulieren (Selmi *et al.*, 2006). Es stellte sich daher die Frage, ob (-)-Epicatechin sowie das Flavanol-Gemisch Proteine des L-Argininstoffwechsels beeinflussen können, die bei einer Entzündung eine wichtige Rolle spielen.

4.1 Effekt von (-)-Epicatechin auf die zytokininduzierte CAT-2B und iNOS mRNA-Expression

Zu den Proteinen des L-Argininstoffwechsels, die bei einer Entzündung eine wichtige Rolle spielen, gehören CAT-2B und iNOS. Um zu untersuchen, ob (-)-Epicatechin deren zytokininduzierte mRNA-Expression beeinflusst, wurden HUVEC mit unterschiedlichen (-)-Epicatechin-Konzentrationen für 24 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation mit 0 U/ml (ohne Zytokine) oder mit je 50 bzw. 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, sowie Zellen, die nur mit den Zytokinen (ohne vorherige Inkubation mit (-)-Epicatechin) für 24 h inkubiert wurden. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel II.6 und 7). Diese diente als *template* für Real-Time PCR, mit dessen Hilfe unter Einsatz spezifischer Primer für humane CAT-2B und iNOS, sowie das Referenzgen GAPDH eine Expressionsanalyse der Zielgene durchgeführt wurde (vgl. Kapitel II.8). Verglichen mit der geringen basalen CAT-2B mRNA-Expression in unbehandelten Zellen, führte eine 24-stündige Inkubation mit 50 U/ml Zytokin-Mix zu einer 10-fachen ($\pm 0,3$) und mit

500 U/ml Zytokin-Mix zu einer 17-fachen ($\pm 1,3$) Steigerung der mRNA-Expression (vgl. Abbildung 26A). Diese zytokininduzierte CAT-2B mRNA-Expression konnte durch 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit (-)-Epicatechin vermindert werden. Die basale, zytokinunabhängige mRNA-Expression blieb dagegen unverändert. Eine Vorinkubation mit 10 μ M (-)-Epicatechin führte zu einer signifikanten Abnahme der mit 50 U/ml Zytokin-Mix induzierten CAT-2B mRNA-Expression um $33\% \pm 4,5\%$ ($p < 0,05$), verglichen mit der entsprechenden zytokinaktivierten Kontrolle. Eine Vorbehandlung der Zellen mit 30 μ M (-)-Epicatechin verminderte sowohl die mit 50 U/ml als auch die mit 500 U/ml Zytokin-Mix induzierte CAT-2B mRNA-Expression um $45\% \pm 0,9\%$ und $42\% \pm 7,4\%$, bezogen auf die zugehörige zytokinaktivierte Kontrolle.

Verglichen mit der zytokininduzierten CAT-2B mRNA-Expression war die Induktion der iNOS mRNA-Expression durch Zytokine weniger ausgeprägt (Abbildung 26B). Bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen führte eine 24-stündige Inkubation mit 50 U/ml Zytokin-Mix lediglich zu einem 1,7-fachen ($\pm 0,2$) und 500 U/ml Zytokin-Mix zu einem 5,5-fachen ($\pm 0,5$) Anstieg der iNOS mRNA-Expression. Bezogen auf die der entsprechende zytokinaktivierte Kontrolle wurde nach einer 24-stündigen Vorinkubation mit 10 μ M (-)-Epicatechin die anschließende, mit 500 U/ml Zytokin-Mix induzierte mRNA-Expression um $44\% \pm 4,5\%$ vermindert. Eine Abnahme um insgesamt $60\% \pm 6,9\%$ wurde nach Vorbehandlung der Zellen mit 30 μ M (-)-Epicatechin beobachtet. Die mit 50 U/ml Zytokin-Mix induzierte sowie die basale iNOS mRNA-Expression wurde nicht durch vorherige Inkubation mit (-)-Epicatechin beeinflusst.

Wie erwartet wurde die CAT-2B und iNOS mRNA-Expression in humanen Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induziert. Es konnte gezeigt werden, dass die zytokininduzierte mRNA-Expression von CAT-2B und iNOS durch Vorinkubation mit (-)-Epicatechin dosisabhängig inhibiert wird.

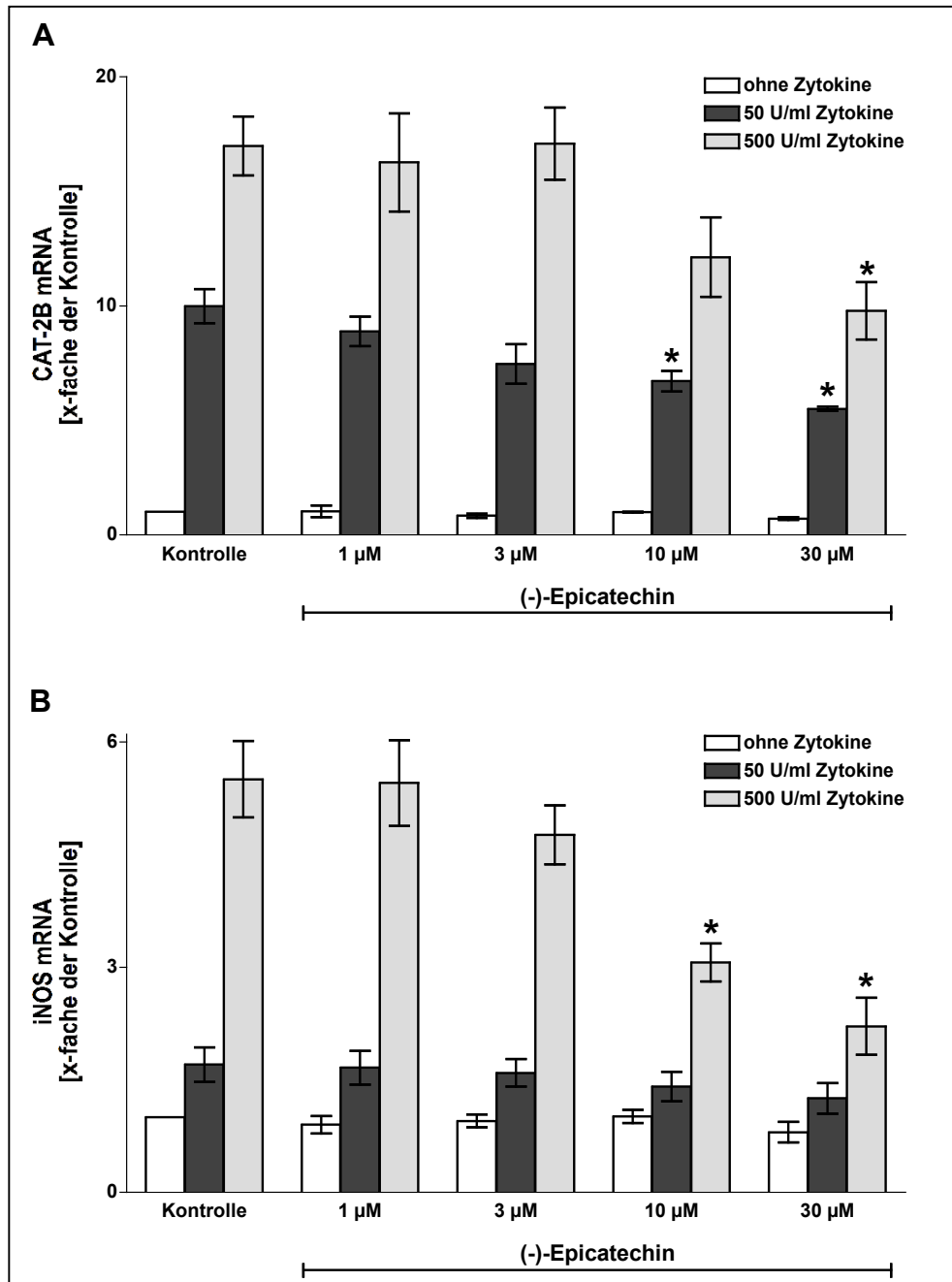


Abbildung 26: Effekt von (-)-Epicatechin auf die zytokininduzierte CAT-2B und iNOS mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden 24 h mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation ohne Zytokine oder mit je 50 U/ml bzw. 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie nur zytokinaktivierte Zellen. Die Expressionsanalyse der humanen CAT-2B (A) und iNOS (B) wurde mittels Real-Time PCR durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=3; *p < 0,05 bezogen auf die zugehörige Kontrolle.

4.2 Effekt des Flavanol-Gemisches auf die zytokininduzierte CAT-2B und iNOS mRNA-Expression

Nachdem gezeigt wurde, dass (-)-Epicatechin auch unter inflammatorischen Bedingungen Effekte auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen ausübt, sollte als nächstes untersucht werden, ob das Flavanol-Gemisch ähnliche Wirkungen auf die zytokininduzierte Expression von CAT-2B und iNOS aufweist. Dazu wurden HUVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches für 24 h vorinkubiert. Danach erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation mit 0 U/ml (ohne Zytokine) oder mit je 50 bzw. 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, die nur mit den Zytokinen (ohne vorherige Inkubation mit dem Flavanol-Gemisch) für 24 h inkubiert wurden. Nachfolgend wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel II.6 und 7). Diese diente als *template* für die anschließende Real-Time PCR (vgl. Kapitel II.8). Unter Einsatz spezifischer Primer für humane CAT-2B und iNOS, sowie das Referenzgen GAPDH wurde eine Expressionsanalyse der Zielgene durchgeführt. Eine Inkubation der Zellen mit dem Flavanol-Gemisch hatte keinen Effekt auf die basale, zytokinunabhängige CAT-2B mRNA-Expression. Die zytokininduzierte mRNA-Expression wurde dagegen vermindert (vgl. Abbildung 27A). Eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit 3 μ M des Flavanol-Gemisches senkte die mit 50 U/ml Zytokin-Mix induzierte CAT-2B mRNA-Expression signifikant um $41\% \pm 2,0\%$ ($p < 0,05$), verglichen mit der entsprechenden zytokinaktivierten Kontrolle. Eine Inkubation mit 10 μ M des Flavanol-Gemisches resultierte in einer Abnahme der mit 50 U/ml und 500 U/ml Zytokin-Mix induzierten CAT-2B mRNA-Expression um $51\% \pm 1,8\%$ und $33\% \pm 6,1\%$. Eine Senkung der mit 50 U/ml und 500 U/ml Zytokin-Mix induzierten mRNA-Expression um $65\% \pm 7,0\%$ und $59\% \pm 1,1\%$ wurde nach Vorinkubation der Zellen mit 30 μ M des Flavanol-Gemisches verzeichnet.

In Abbildung 27B ist zu erkennen, dass das Flavanol-Gemisch keine Auswirkungen auf die basale und die mit 50 U/ml Zytokin-Mix induzierte iNOS mRNA-Expression hat. Lediglich die mit 500 U/ml Zytokin-Mix induzierte mRNA-Expression wurde dosisabhängig vermindert. Eine 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit 3 μ M und 10 μ M des Flavanol-Gemisches führte zu einer Abnahme der zytokininduzierten iNOS mRNA-Expression um $30\% \pm 7,1\%$ bzw. $45\% \pm 4,5\%$, verglichen mit der zugehörigen zytokinaktivierten Kontrolle. Eine Inkubation mit 30 μ M des Flavanol-

Gemisches resultierte in einer 58%-igen Abnahme ($\pm 6,9\%$) der zytokininduzierten mRNA-Expression.

Wie (-)-Epicatechin führte auch die Vorinkubation der Zellen mit dem Flavanol-Gemisch zu einer dosisabhängigen Hemmung der zytokininduzierten CAT-2B und iNOS mRNA-Expression.

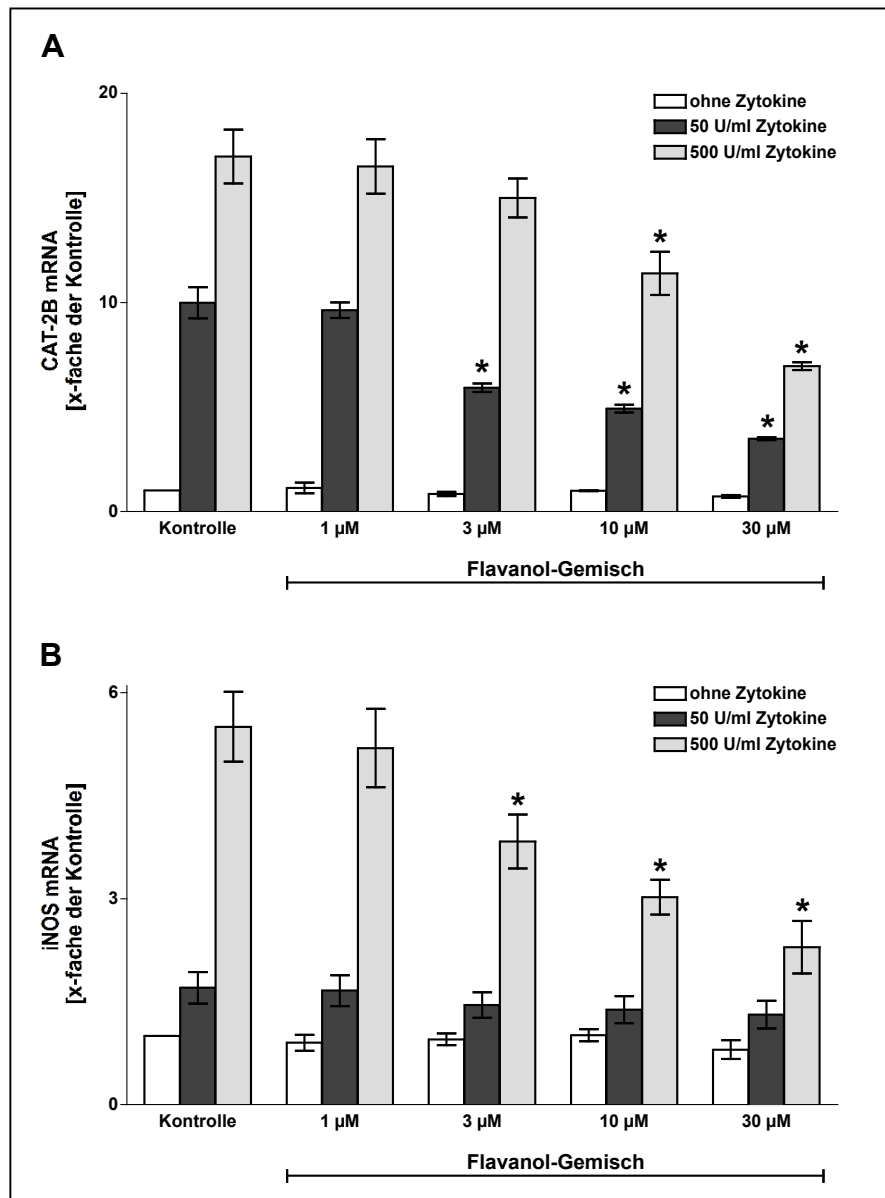


Abbildung 27: Effekt des Flavanol-Gemisches auf die zytokininduzierte CAT-2B und iNOS mRNA-Expression in humanen Endothelzellen. HUVEC wurden 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation ohne Zytokine oder mit je 50 U/ml bzw. 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie nur zytokinaktivierte Zellen. Die Expressionsanalyse der humanen CAT-2B (A) und iNOS (B) wurde mittels Real-Time PCR durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=3; *p < 0,05 bezogen auf die zugehörige Kontrolle.

5 Einfluss von Kakao-Flavanolen auf die NF- κ B-Aktivität

Bei NF- κ B handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. Ohne entsprechende Stimuli liegt der Transkriptionsfaktor aufgrund inhibitorischer Proteine, die an NF- κ B binden, inaktiv im Zytoplasma vor. Zu solchen Stimuli, die eine Aktivierung von NF- κ B auslösen, zählen unter anderem proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α . Da sowohl die CAT-2B als auch iNOS mRNA-Expression NF- κ B abhängig induziert wird, stellte sich die Frage, ob die beobachtete Abnahme der zytokininduzierten mRNA-Expression in humanen Endothelzellen nach (-)-Epicatechin- und Flavanol-Gemisch-Behandlung auf eine Beeinflussung der NF- κ B-Aktivität zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen wurde die humane stabil transfizierte Lungenepithelzelllinie A549/8-pNF- κ B-Luc für die Zellkulturversuche eingesetzt. Die Zellen enthalten NF- κ B-Bindungssequenzen innerhalb eines Promotors, der sich vor einem Luziferase-Reportergen befindet (näheres vgl. Kapitel II.4.1.2). Aktiviertes NF- κ B, welches vom Zytoplasma in den Zellkern wandert, induziert die Expression der Luziferase, was enzymatisch mit Hilfe des Luziferase-Reportergen-Assays bestimmt werden kann (vgl. Kapitel II.13.2).

5.1 Effekt von (-)-Epicatechin auf die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität

Zunächst wurde der Effekt von (-)-Epicatechin auf die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität untersucht. Dazu wurden A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen an (-)-Epicatechin vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere vierstündige Inkubation mit 0 U/ml (ohne Zytokine) oder mit je 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie zytokinaktivierte Zellen (ohne vorherige Inkubation mit (-)-Epicatechin). Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Luziferase-Aktivität bestimmt und auf den Proteingehalt normiert (vgl. Kapitel II.13). Im Vergleich mit unbehandelten Zellen wurde die relative Luziferase-Aktivität ermittelt. In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass eine Inkubation mit (-)-Epicatechin keine Auswirkungen auf die basale Luziferase-Aktivität hat. Eine vierstündige Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen führt zu einem 3-fachen Anstieg der Luziferase-Aktivität, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Eine

48-stündige Vorinkubation mit 10 μM (-)-Epicatechin hatte eine signifikante Abnahme dieses zytokininduzierten Aktivitätsanstiegs um $33\% \pm 8,3\%$ ($p < 0,05$) zur Folge.

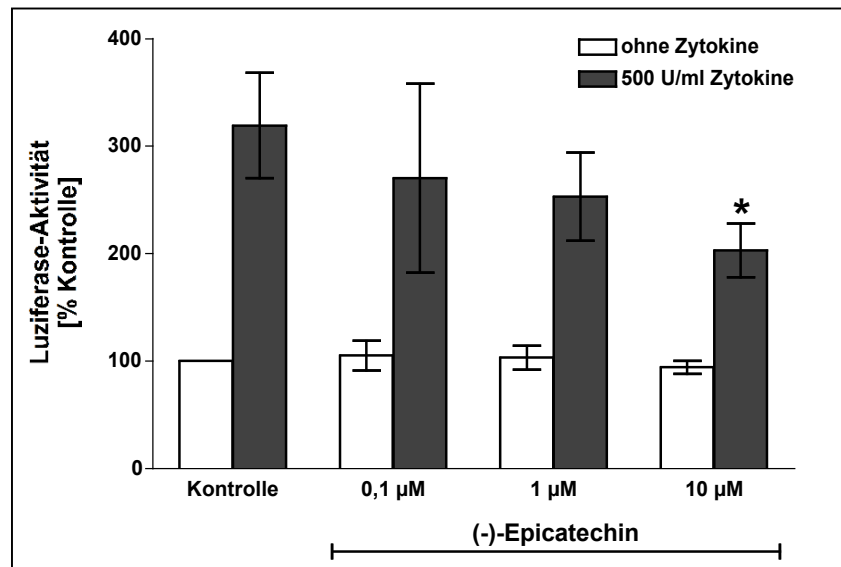


Abbildung 28: Effekt von (-)-Epicatechin auf die NF- κ B-abhängige zytokininduzierte Reporter-gen-Aktivität in stabil transfizierten A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen für 48 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere vierstündige Inkubation ohne Zytokine oder mit je 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Die Luziferase-Aktivität des Zelllysats wurde mittels Luziferase-Reporter-gen-Assay bestimmt und auf den Proteingehalt normiert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; $n=3$; * $p < 0,05$ bezogen auf die zytokinaktivierte Kontrolle.

Es konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin in der Lage ist, die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität dosisabhängig zu vermindern.

5.2 Effekt des Flavanol-Gemisches auf die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität

Neben (-)-Epicatechin wurden auch die Effekte des Flavanol-Gemisches auf die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität untersucht. Dazu wurden A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches für 48 h vorinkubiert. Daraufhin erfolgte eine weitere vierstündige Inkubation mit 0 U/ml (ohne Zytokine) oder mit je 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie zytokinaktivierte Zellen (ohne vorherige Inkubation mit dem Flavanol-Gemisch). Abschließend wurden die Zellen lysiert, die Luziferase-Aktivität bestimmt und auf den Proteingehalt normiert (vgl. Kapitel II.13). Im Vergleich mit unbehandelten Zellen wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt. Eine Inkubation der Zellen mit dem Flavanol-Gemisch hatte keinen Effekt auf die basale Luziferase-Aktivität

(vgl. Abbildung 29). Eine 48-stündige Vorinkubation mit 1 μM des Flavanol-Gemisches führte dagegen zur Erniedrigung der zytokininduzierten Aktivität um $29\% \pm 6,9\%$, verglichen mit der zytokinaktivierten Kontrolle. Eine Abnahme um insgesamt $42\% \pm 3,4\%$ konnte nach Inkubation der Zellen mit 10 μM des Flavanol-Gemisches verzeichnet werden.

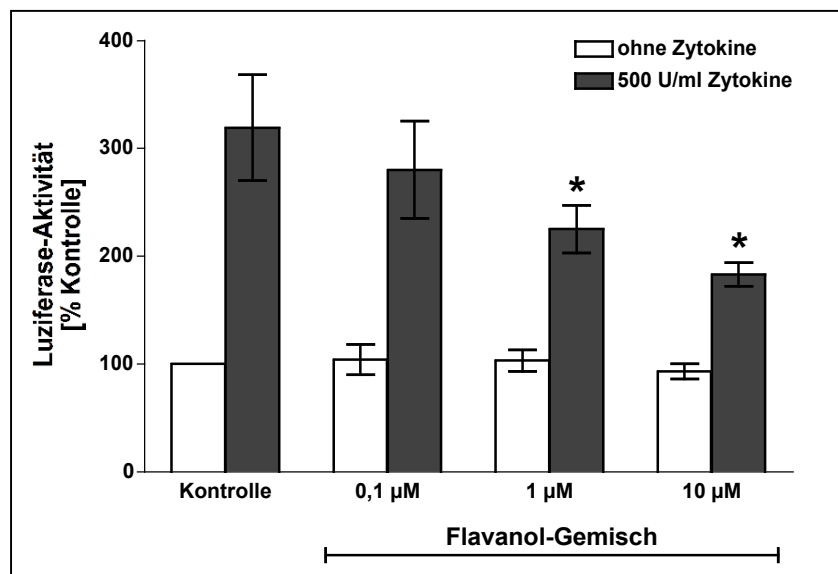


Abbildung 29: Effekt des Flavanol-Gemisches auf die NF- κ B-abhängige zytokininduzierte Reporter-gen-Aktivität in stabil transfizierten A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches für 48 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere vierstündige Inkubation ohne Zytokine oder mit je 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Die Luziferase-Aktivität des Zelllysats wurde mittels Luziferase-Reporter-gen-Assay bestimmt und auf den Proteingehalt normiert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=3; *p < 0,05 bezogen auf die zytokinaktivierte Kontrolle.

Wie (-)-Epicatechin hatte auch eine Inkubation der Zellen mit dem Flavanol-Gemisch keinen Einfluss auf die basale NF- κ B-Aktivität. Im Gegensatz dazu konnte die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität durch Vorinkubation mit dem Flavanol-Gemisch dosisabhängig vermindert werden.

5.3 Effekt von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid auf die zytokininduzierte NF- κ B-Aktivität

Abschließend wurde untersucht, ob der beschriebene Effekt auf einzelne Komponenten des Flavanol-Gemisches zurückzuführen ist. Dazu wurden A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen mit verschiedenen Konzentration von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid für 48 h vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere vierstündige Inkubation

mit 0 U/ml (ohne Zytokine) oder mit je 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Als Kontrolle dienten unbehandelte sowie zytokinaktivierte Zellen (ohne vorherige Inkubation mit (-)-Epicatechin). Danach wurden die Zellen lysiert, die Luziferase-Aktivität bestimmt und auf den Proteingehalt normiert (vgl. Kapitel II.13). Anschließend wurde die relative Luziferase-Aktivität durch Vergleich mit unbehandelten Zellen bestimmt. Wie erwartet wurde die basale Luziferase-Aktivität nicht durch das Glukuronid beeinflusst (vgl. Abbildung 30). Im Gegensatz dazu konnte die zytokininduzierte Luziferase-Aktivität durch 48-stündige Vorinkubation der Zellen mit 10 μ M 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid um 20% $\pm$ 11% gesenkt werden, bezogen auf die zytokinaktivierte Kontrolle.

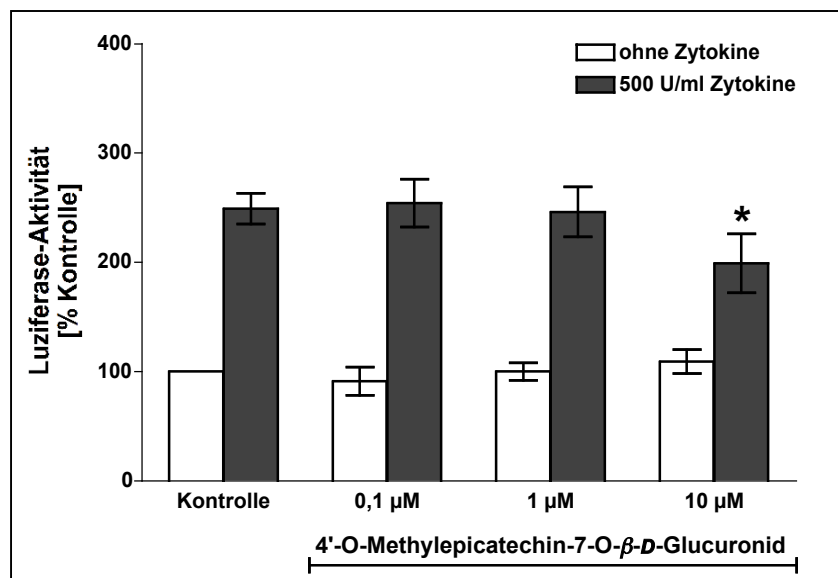


Abbildung 30: Effekt von 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid auf die NF- κ B-abhängige zytokininduzierte Reporter-gen-Aktivität in stabil transfizierten A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des (-)-Epicatechin-Metabolits für 48 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere vierstündige Inkubation ohne Zytokine oder mit je 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ . Die Luziferase-Aktivität des Zelllysats wurde mittels Luziferase-Reporter-gen-Assay bestimmt und auf den Proteingehalt normiert. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SD; n=3; *p < 0,05 bezogen auf die zytokinaktivierte Kontrolle.

6 Effekte von Kakao-Flavanolen *in vivo* (Humanstudie)

In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, das (-)-Epicatechin die endotheliale Isoform der Arginase und NOS auf RNA- bzw. Proteinebene *in vitro* beeinflusst (vgl. Kapitel III.1). Ein Flavanol-Gemisch, dessen Zusammensetzung dem plasmatischen Metabolitenmuster entsprach, zwei Stunden nach Einnahme eines Flavanol-reichen Kakaos, führte in den Zellkulturversuchen zu gleichen Ergebnissen (vgl. Kapitel III.2). Im Rahmen dieser Arbeit sollte neben den erhaltenen *in vitro* Daten auch der Effekt von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel *in vivo* untersucht werden. Da Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen von Kakao-Flavanolen auf das Endothel *in vivo* nur schwer möglich sind, wurden stattdessen Erythrozyten näher betrachtet. Neben dem Endothel sind auch Erythrozyten an der Endothelhomöostase beteiligt. Zudem besitzen sie eine funktionsfähige Arginase und NOS, die der endothelialen Isoform entspricht (vgl. Kapitel I.4). Da es experimentell sehr schwierig war die NOS-Aktivität in Erythrozyten zu bestimmen, beschäftigte sich die Humanstudie mit den Effekten von Kakao-Flavanolen auf die erythrozytäre Arginase-Aktivität.

6.1 Bestimmung der Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten

Vor dem Beginn der humanen Interventionsstudie wurde die basale Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten bestimmt. Dazu wurden 40 gesunde Erwachsene beider Geschlechter rekrutiert (näheres zum Probandenkollektiv vgl. Kapitel II.14.2). Den nüchternen Probanden wurde, unter Verwendung des Antikoagulanz Heparin, Vollblut entnommen (vgl. Kapitel II.14.4). Darauf folgend wurden gemäß Kapitel II.14.4.1 die Erythrozyten isoliert und die Arginase-Aktivität durch photometrische Bestimmung der gebildeten Harnstoffmenge bestimmt (vgl. Kapitel II.11). In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten, unabhängig vom Geschlecht, eine große Schwankungsbreite hat (zwischen 1,59 und 6,52 $\mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Im Mittel war die Enzymaktivität von Frauen und Männern vergleichbar ($3,15 \pm 0,25$ vs. $3,21 \pm 0,18$). Die durchschnittliche Arginase-Aktivität konnte auf $3,18 \pm 0,15 \mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ bestimmt werden ($n=40$).

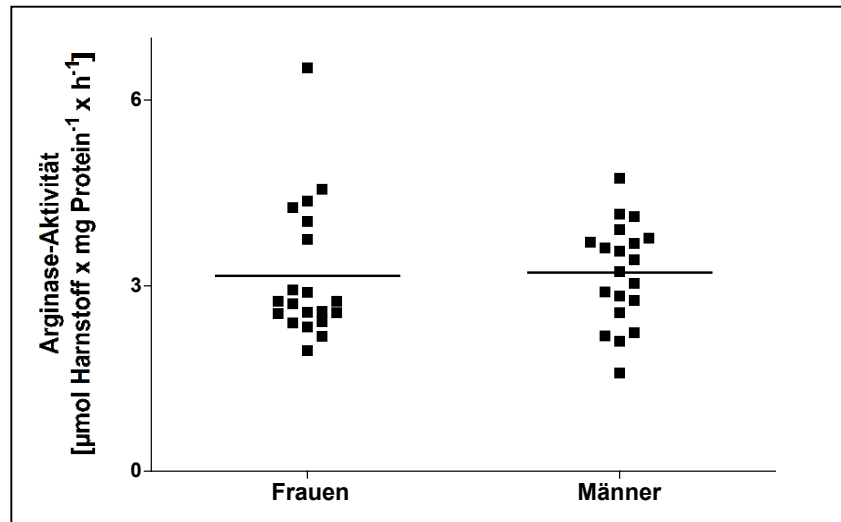


Abbildung 31: Basale Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten. n=40 gesunde Probanden (je 20 Frauen und Männer). (■) Arginase-Aktivität der Probanden; (–) Mittelwert.

6.2 Humane Interventionsstudie I

Um den Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität humaner Erythrozyten zu ermitteln, nahmen 10 gesunde Probanden (6 Frauen und 4 Männer) in einer *Cross-Over* Studie sowohl einen Flavanol-reichen, als auch einen Flavanol-armen Kakao ein (detaillierte Beschreibung der Interventionsstudie vgl. Kapitel II.14). Zwischen den Einnahmen lag eine Auswaschphase von mindestens einer Woche. Den Probanden wurde vor sowie zwei und 24 h danach Vollblut entnommen (vgl. Kapitel II.14.4). Im Anschluss daran wurden die Erythrozyten gemäß Kapitel II.14.4.1 isoliert und die Arginase-Aktivität durch photometrische Bestimmung der Harnstoffsynthese ermittelt (vgl. Kapitel II.11). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst und in Abbildung 32 graphisch dargestellt. Innerhalb des Probandenkollektivs konnte auch hier eine große Schwankungsbreite der basalen Arginase-Aktivität (0 h) verzeichnet werden (2,25 bis 6,62 $\mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Da kein Unterschied zwischen dem männlichen und weiblichen Probandenkollektiv festgestellt wurde, wurden die Ergebnisse in einem gemeinsamen Mittelwert zusammengefasst. Verglichen mit der Kontrolle ($3,61 \pm 0,43 \mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) konnten sowohl 2 h als auch 24 h nach Einnahme des Flavanol-armen Kakaos keine signifikanten Änderungen der Arginase-Aktivität beobachtet werden ($3,33 \pm 0,35$ bzw. $3,43 \pm 0,46 \mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Im Gegensatz dazu wurde die basale Arginase-Aktivität 24 h nach Einnahme des Flavanol-reichen

Kakaos von $3,86 \pm 0,41$ auf $3,09 \pm 0,30$ $\mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ signifikant vermindert ($p < 0,05$).

Tabelle 8: Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten nach Kakao-Einnahme. Die Enzymaktivität, angegeben in $\mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$, wurde davor (0 h) sowie 2 h und 24 h danach bestimmt. Flavanol-armer Kakao: 80 mg Gesamtflavanole; Flavanol-reicher Kakao: 985 mg Gesamtflavanole. MW: Mittelwert; SEM: Standardfehler; $n=10$; * $p < 0,05$ bezogen auf die zugehörige Basalaktivität (0 h).

Proband	Flavanol-armer Kakao			Flavanol-reicher Kakao		
	0 h	2 h	24 h	0 h	2 h	24 h
1	6,62	5,73	6,62	6,42	5,45	4,71
2	4,62	4,06	4,28	4,50	4,11	2,85
3	2,82	2,59	2,39	2,67	2,38	2,55
4	2,42	2,43	2,10	2,69	2,50	2,22
5	2,25	2,23	2,34	2,59	2,17	2,19
6	2,44	2,35	2,14	3,21	2,38	2,33
7	3,05	2,72	2,62	2,75	2,62	2,57
8	3,63	3,28	3,36	4,69	4,17	3,86
9	3,85	3,51	3,64	3,98	3,69	3,10
10	4,45	4,37	4,76	5,05	4,87	4,49
MW	3,61	3,33	3,43	3,86	3,43	3,09*
SEM	0,43	0,35	0,46	0,41	0,37	0,30

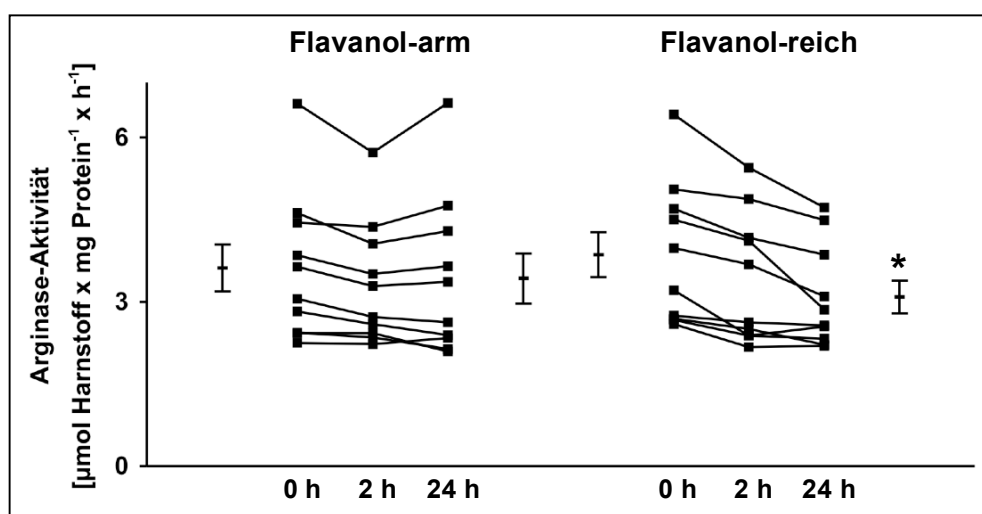


Abbildung 32: Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten. Die Enzymaktivität wurde vor Kakao-Einnahme (0 h) sowie 2 h und 24 h danach bestimmt. Flavanol-arm: 80 mg Gesamtflavanole; Flavanol-reich: 985 mg Gesamtflavanole. (■) Arginase-Aktivität der einzelnen Probanden; (–) Mittelwert $\pm$ SEM; $n=10$ (6 Frauen und 4 Männer); * $p < 0,05$ bezogen auf die zugehörige Basalaktivität (0 h).

Es konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Gabe eines Flavanol-reichen Kakaos mit insgesamt 985 mg Gesamtflavanolen zu einer Senkung der Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten führt. Verglichen mit der basalen Arginase-Aktivität konnte nach 24 h eine signifikante Verminderung um $19\% \pm 3\%$ verzeichnet werden ($p < 0,05$; vgl. Abbildung 33). Der Verzehr des Flavanol-armen Kakaos dagegen führte 24 h nach Einnahme zu keiner signifikanten Abnahme der Enzymaktivität ($6\% \pm 2\%$).

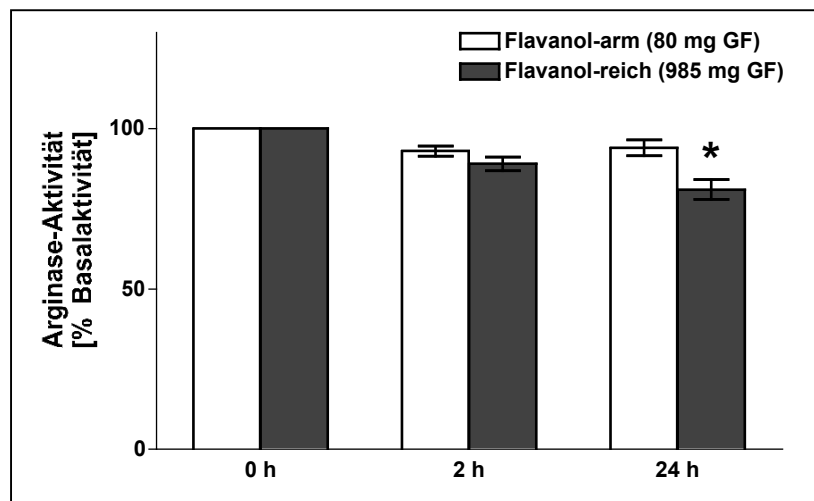


Abbildung 33: Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten (Studie I). Die Enzymaktivität wurde vor Kakao-Einnahme (0 h) sowie 2 h und 24 h danach bestimmt. GF: Gesamtflavanole. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM; $n=10$ (6 Frauen und 4 Männer); * $p < 0,05$ bezogen auf die zugehörige Basalaktivität (0 h).

6.3 Humane Interventionsstudie II

Um den beobachteten Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten zu verifizieren, wurde die humane Interventionsstudie mit 10 weiteren Probanden wiederholt (je 5 Frauen und Männer). Zudem wurde während der zweiten Interventionsstudie die Konzentration des Gesamtprocatechins im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Das Studiendesign entsprach dem der ersten Interventionsstudie.

6.3.1 Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten

Vor der Einnahme der beiden Kakao-Getränke sowie 2 h und 24 h danach wurde den Probanden Vollblut entnommen. Die Erythrozyten wurden wie in Kapitel II.14.4.1 beschrieben isoliert und bis zur Bestimmung der Arginase-Aktivität bei -80°C gelagert. Die Enzymaktivität der Arginase wurde durch photometrische Bestimmung der gebildeten Harnstoffmenge ermittelt (vgl. Kapitel II.11). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst und in Abbildung 34 graphisch dargestellt. Verglichen mit der basalen Enzymaktivität ($1,82 \pm 0,18 \mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) führte der Flavanol-arme Kakao weder nach 2 h noch nach 24 h zu einer signifikanten Abnahme der Arginase-Aktivität ($1,78 \pm 0,17$ bzw. $1,75 \pm 0,16 \mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Dagegen nahm die basale Arginase-Aktivität 24 h nach Einnahme eines Flavanol-reichen Kakaos in signifikanten Maße ab ($1,77 \pm 0,12$ vs. $1,59 \pm 0,10 \mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$).

Tabelle 9: Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten nach Kakao-Einnahme. Die Enzymaktivität, angegeben in $\mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$, wurde davor (0 h) sowie 2 h und 24 h danach bestimmt. Flavanol-armer Kakao: 80 mg Gesamtflavanole; Flavanol-reicher Kakao: 985 mg Gesamtflavanole. MW: Mittelwert; SEM: Standardfehler; $n=10$; * $p < 0,05$ bezogen auf die zugehörige Basalaktivität (0 h).

Proband	Flavanol-armer Kakao			Flavanol-reicher Kakao		
	0 h	2 h	24 h	0 h	2 h	24 h
1	1,61	1,54	1,52	1,48	1,50	1,43
2	1,56	1,72	1,48	1,82	1,68	1,56
3	2,40	2,19	2,18	2,32	1,92	1,95
4	1,19	1,12	1,21	1,32	1,31	0,96
5	1,80	1,63	1,72	1,56	1,60	1,62
6	2,41	2,24	2,45	2,42	1,63	2,02
7	2,71	2,81	2,58	1,76	1,84	1,84
8	1,16	1,21	1,22	1,43	1,72	1,37
9	1,21	1,30	1,19	1,54	1,33	1,42
10	2,10	2,08	1,98	2,00	1,87	1,76
MW	1,82	1,78	1,75	1,77	1,64	1,59*
SEM	0,18	0,17	0,16	0,12	0,07	0,10

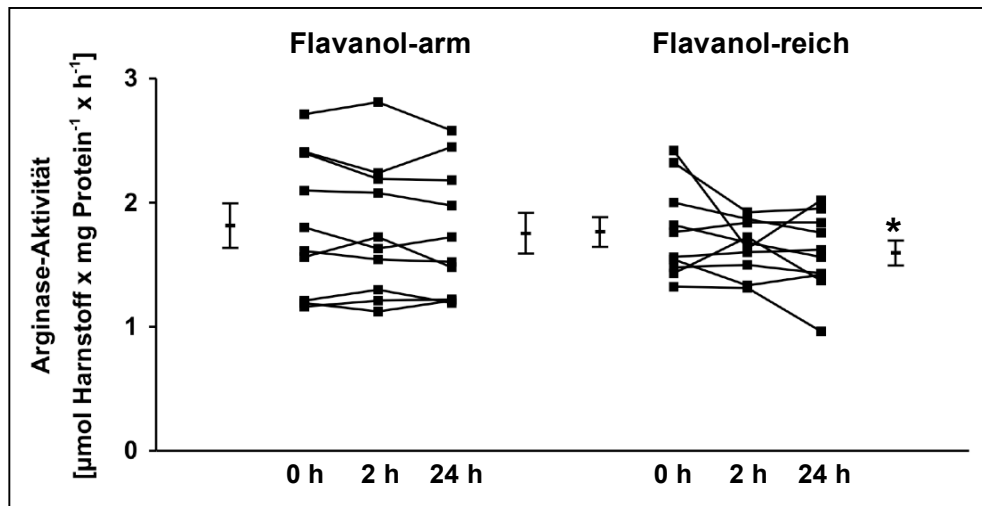


Abbildung 34: Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten. Die Enzymaktivität wurde vor Kakao-Einnahme (0 h) sowie 2 h und 24 h danach bestimmt. Flavanol-arm: 80 mg Gesamtflavanole; Flavanol-reich: 985 mg Gesamtflavanole. (■) Arginase-Aktivität der einzelnen Probanden; (–) Mittelwert $\pm$ SEM; $n=10$ (je 5 Frauen und Männer); * $p < 0,05$ bezogen auf die zugehörige Basalaktivität (0 h).

Die Abnahme der Arginase-Aktivität 24 h nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos konnte in der zweiten Interventionsstudie bestätigt werden. Verglichen mit der ersten Interventionsstudie (vgl. Abbildung 33), war die Änderung der Arginase-Aktivität nicht so stark ausgeprägt ($19\% \pm 3,14\%$ vs. $9\% \pm 3,13\%$). Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse in Tabelle 9 wurde jedoch ersichtlich, dass die Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos bei Proband 5 und 7 keine Auswirkung hatte. Dies sprach dafür, dass es sich um so genannte *non-responder* handelte, die nicht auf die Kakao-Flavanole reagierten. Ohne diese beiden *non-responder* beträgt die Abnahme der Arginase-Aktivität 24 h nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos $13\% \pm 2,75\%$ (vgl. Abbildung 35) und ist somit mit der Abnahme der ersten Studie vergleichbar.

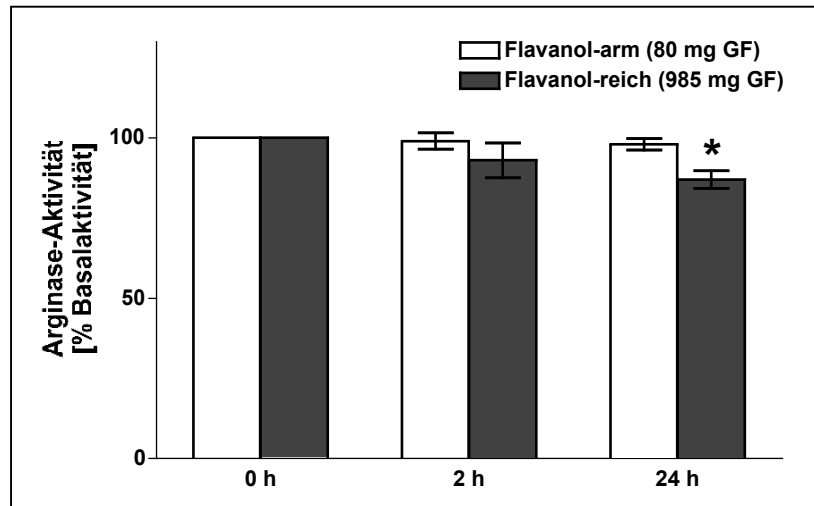


Abbildung 35: Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten (Studie II). Die Enzymaktivität wurde vor Kakao-Einnahme (0 h) sowie 2 h und 24 h danach bestimmt. GF: Gesamtflavanole. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM; $n=8$ (je 4 Frauen und Männer); * $p < 0,05$ bezogen auf die zugehörige Basalaktivität (0 h).

Um die Ergebnisse der beiden Studien abschließend zusammenzufassen, wurden jeweils die prozentualen Effekte ohne Berücksichtigung der *non-responder* bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt. Aus beiden Interventionsstudien geht hervor, dass eine einmalige Gabe von 985 mg Gesamtflavanolen in Form eines Kakao-Getränks die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten vermindert und zwar 24 h nach Einnahme um durchschnittlich $16\% \pm 2,19\%$.

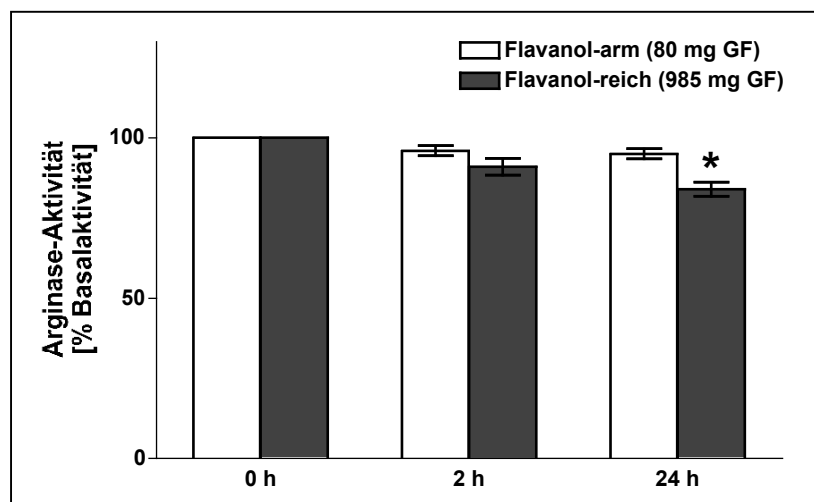


Abbildung 36: Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten (Studie I + II). GF: Gesamtflavanole. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM; $n=18$ (10 Frauen und 8 Männer); * $p < 0,05$ bezogen auf die zugehörige Basalaktivität (0 h).

6.3.2 Bestimmung des Gesamtepicatechins im Serum nach Kakao-Einnahme

Neben des Effekts von Kakao-Flavanolen auf die erythrozytäre Arginase-Aktivität wurde in der zweiten Interventionsstudie die Serum-Konzentration des Gesamtepicatechins vor Kakao-Einnahme sowie 2 h, 4 h und 24 h danach bestimmt (Serumgewinnung vgl. Kapitel II.14.4.2). Zur Bestimmung des Gesamtepicatechins, welches freies sowie glukuronidiertes und sulfatiertes (-)-Epicatechin umfasst, wurde das Serum zuvor mit β -Glukuronidase/Sulfatase inkubiert. Die anschließende Extraktion erfolgte mit *tert*-Butylmethylether. Das Extrakt wurde mit Stickstoff getrocknet und die Konzentration des Gesamtepicatechins mit Hilfe der HPLC bestimmt (vgl. Kapitel II.15.1). Abbildung 37 zeigt beispielhaft typische HPLC-Chromatogramme von humanem Serum eines Probanden vor sowie 2 h, 4 h und 24 h nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen von Gesamtepicatechin sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Serum-Konzentration des Gesamtepicatechins vor Einnahme beider Kakaos besteht. Frauen weisen eine durchschnittliche Konzentration von $46,54 \pm 1,42$ nM auf, während die von Männern $28,99 \pm 0,84$ nM beträgt. Nach Einnahme des Flavanol-armen Kakaos konnte unabhängig vom Geschlecht kein signifikanter Anstieg der Konzentration innerhalb von 24 h festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde bei Frauen 2 h nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos ein signifikanter Anstieg des Gesamtepicatechins von $48,20 \pm 1,63$ nM auf $749,22 \pm 126,40$ nM verzeichnet ($p < 0,05$). Innerhalb der nächsten 2 h nahm die Konzentration wieder ab und betrug 4 h nach Kakao-Einnahme $300 \pm 39,06$ nM. Nach 24 h entsprach die Konzentration des Gesamtepicatechins wieder der Ausgangskonzentration ($50,69 \pm 1,44$ vs. $48,20 \pm 1,63$ nM). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnte bei Männern nach 2 h ein maximaler Anstieg von $28,53 \pm 1,03$ nM auf $320,21 \pm 48,98$ nM beobachtet werden. Vier Stunden nach Einnahme des Kakaos betrug die Konzentration noch $147,15 \pm 11,78$ nM und nach 24 h war die Ausgangskonzentration wieder erreicht ($28,78 \pm 0,60$ nM vs. $28,53 \pm 1,03$ nM).

Aus Tabelle 10 wird ersichtlich, dass auch die als *non-responder* definierten Probanden (5 und 7 aus Tabelle 9) einen Konzentrationsanstieg des Gesamtepicatechins 2 h nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos zeigten. Die ausgebliebene Verminderung der Arginase-Aktivität konnte daher nicht auf eine mangelhafte Resorption der Flavanole zurückgeführt werden.

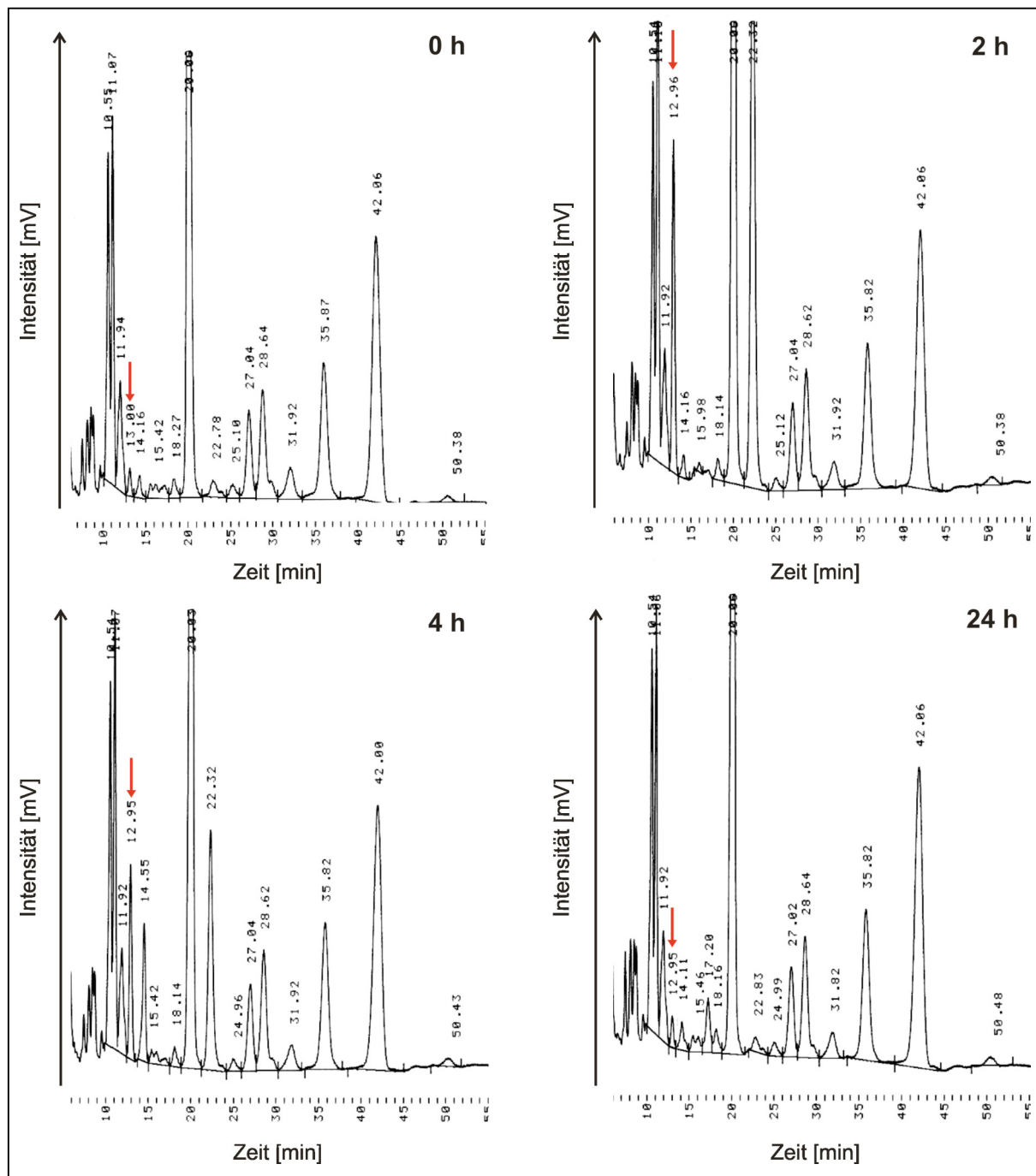


Abbildung 37: Typische HPLC-Chromatogramme von humanem Plasma vor (0 h) sowie 2 h, 4 h und 24 h nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos (985 mg Gesamtflavanole). Roter Pfeil: Gesamtepicatechin. Temperatur: 35°C, elektrochemische Detektion: +0,75 V.

Tabelle 10: Gesamtepicatechin [nM] im Serum nach Kakao-Einnahme. Die Messung erfolgte mittels RP-HPLC. Flavanol-armer Kakao: 80 mg Gesamtflavanole; Flavanol-reicher Kakao: 985 mg Gesamtflavanole. MW: Mittelwert; SEM: Standardfehler; n=10; *p < 0,05 bezogen auf die zugehörige Serum-Konzentration vor Kakao-Einnahme (0 h).

Proband	Flavanol-armer Kakao				Flavanol-reicher Kakao			
	0 h	2 h	4 h	24 h	0 h	2 h	4 h	24 h
1	42,54	50,87	49,89	43,86	46,39	1189,72	383,29	46,68
2	41,63	47,82	36,86	39,97	47,16	868,21	352,11	55,27
3	47,23	52,25	47,12	44,88	53,90	519,32	298,20	49,50
4	46,12	50,70	45,72	45,54	44,32	538,66	313,21	49,86
5	47,41	53,51	46,96	49,64	49,23	630,19	156,16	52,12
MW	44,99	51,03	45,31	44,78	48,20	749,22*	300,59*	50,69
SEM	1,21	0,95	2,22	1,55	1,63	126,40	39,06	1,44
6	27,64	31,29	32,84	29,17	28,70	239,66	126,04	27,83
7	29,66	28,97	30,20	30,11	28,19	425,98	187,72	28,74
8	30,91	35,87	30,40	27,59	25,61	199,39	157,13	29,67
9	28,32	34,83	26,44	27,77	28,09	293,41	123,75	27,19
10	30,69	41,24	37,44	31,25	32,07	442,62	141,10	30,48
MW	29,44	34,44	31,46	29,18	28,53	320,21*	147,15*	25,78
SEM	0,64	2,10	1,81	0,70	1,03	48,98	11,78	0,60

Unabhängig vom Geschlecht konnte gezeigt werden, dass die Einnahme eines Flavanol-armen Kakaos keine signifikanten Auswirkungen auf die Konzentration des Gesamtepicatechins im Serum hat. Ein Flavanol-reicher Kakao führte hingegen zu einem Anstieg der Konzentration. Bei der hier durchgeführten Messung wurde die höchste Serum-Konzentration an Gesamtepicatechin nach 2 h beobachtet (vgl. Abbildung 38). Die maximale Konzentration bei Frauen war doppelt so hoch, verglichen mit der bei den männlichen Probanden. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Männer schon vor Kakao-Einnahme eine geringere Konzentration des Gesamtepicatechins im Serum gegenüber den Frauen aufwiesen (vgl. Tabelle 10). Vergleicht man die prozentuale Zunahme innerhalb von 2 h bei jedem einzelnen Probanden konnte bei Frauen ein 15,7-facher Anstieg ($\pm 2,6$) und bei Männern ein 11,1-facher Anstieg ($\pm 1,7$) beobachtet werden. Bezüglich der Zunahme von Gesamtepicatechin 2 h nach Einnahme eines Flavanol-reichen Kakaos bestand somit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern.

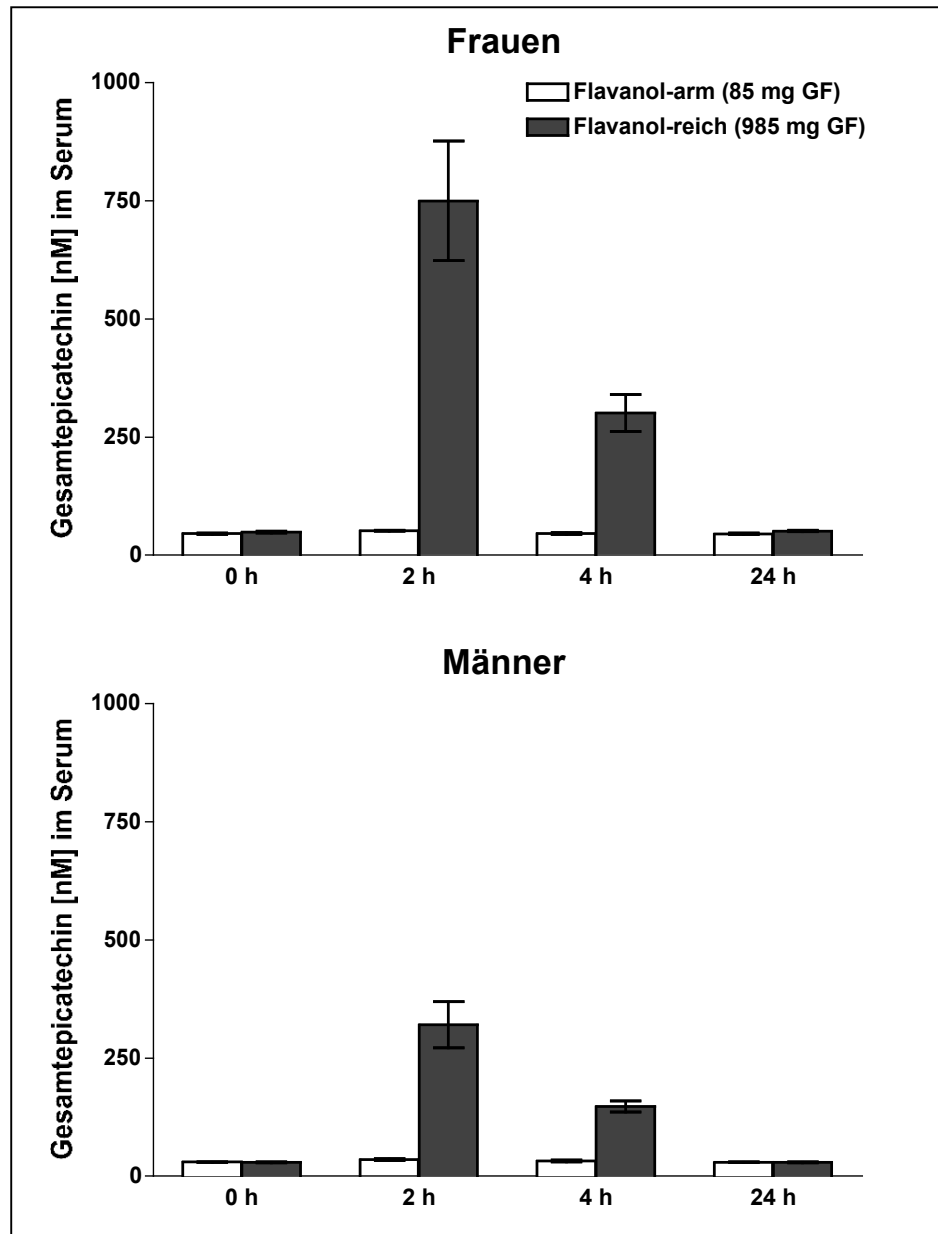


Abbildung 38: Effekt von Kakao-Flavanolen auf die Serum-Konzentration von Gesamtepicatechin. Die Konzentration an Gesamtepicatechin wurde vor Kakao-Einnahme (0 h) sowie 2 h, 4 h und 24 h danach mittels RP-HPLC bestimmt. GF: Gesamtflavanole. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM; n = je 5 Frauen und Männer.

IV Diskussion

Epidemiologische und klinische Studien haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Ernährung und dem Gesundheitsstatus besteht. Es ist bekannt, dass Populationen, die eine große Menge pflanzlicher Nahrung wie Obst und Gemüse konsumieren, ein vermindertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und bestimmte Krebsarten zeigen (Fitzpatrick *et al.*, 1995; Jansen *et al.*, 1999; Menotti *et al.*, 1999). Pflanzliche Nahrungsmittel enthalten Ballaststoffe, Vitamine, Phytosterole, Karotinoide und andere organische Verbindungen, die zu den gesundheitsfördernden Wirkungen beitragen. Insbesondere enthalten sie eine Vielfalt an Polyphenolen, die zunehmend als protektive Wirkstoffe angesehen werden. In den letzten Jahren wurde eine große Zahl wissenschaftlicher Studien veröffentlicht, welche die präventivmedizinische Wirkung der Kakao-Flavanole u.a. gegen Infarkt, Krebs, Arteriosklerose und entzündliche Prozesse im menschlichen Körper thematisierten (Wang *et al.*, 2000; Osakabe *et al.*, 2001; Heiss *et al.*, 2003; Buijsse *et al.*, 2006; Hollenberg, 2006; Alspach, 2007; Cooper *et al.*, 2008). Über den Umfang der Resorption und den Wirkmechanismus von mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoiden liegen aber bisher nur unzureichende Daten vor. Verschiedene *in vitro* Versuche deuten darauf hin, dass Flavonoide als starke Antioxidantien und Modulatoren zahlreicher Enzyme wirken, die Genexpression und zelluläre Signalwege beeinflussen und die Eigenschaften von Zellmembranen sowie Rezeptoren verändern können (Kondo *et al.*, 1996; Waterhouse *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 2000; Scalbert *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob der L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen und Erythrozyten einen möglichen Angriffspunkt der Kakao-Flavanole darstellt und für die kardioprotektiven Eigenschaften eine Rolle spielt.

1 Einfluss von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen

Das Endothel ist eine einfache Monolayerschicht, welche die Innenwände der Gefäße auskleidet und auf physikalische und chemische Signale durch Produktion einer Vielzahl vasoaktiver Faktoren reagiert, die den Gefäßtonus, die zelluläre Adhäsion, die Thrombozytenaggregation, die Proliferation der glatten Gefäßmuskelnzellen und Entzündungsprozessen der Gefäßwand regulieren. Unter physiologischen Bedingungen wirken die sekretierten Substanzen vasodilatorisch, antiproliferativ, antithrombotisch und antiinflammatorisch. Eine zentrale Rolle spielt dabei NO, welches aus der proteinogenen Aminosäure L-Arginin durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) synthetisiert wird. Die endotheliale Arginase (Arginase-2) konkurriert mit der eNOS um das gemeinsame Substrat L-Arginin und kann darüber die NO-Produktion regulieren (Yang and Ming, 2006). Zur Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase ist daher das Zusammenspiel der eNOS und Arginase-2 entscheidend. Aus klinischen Studien geht hervor, dass Kakao-Flavanole unter anderem zu einer Verbesserung der Vasodilatation (Fisher *et al.*, 2003; Heiss *et al.*, 2003; Schroeter *et al.*, 2006), einer Senkung des Blutdrucks (Taubert *et al.*, 2003) und zu einer verminderten Thrombozytenaggregation (Rein *et al.*, 2000b; Holt *et al.*, 2002b) führen und somit positive Effekte auf das Gefäßsystem ausüben. Da dies die NO-vermittelten Wirkungen widerspiegelt, ist es wahrscheinlich, dass die Flavanol-vermittelten kardioprotektiven Effekte mit einer gesteigerten NO-Verfügbarkeit zusammenhängen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits bestätigen, dass der Konsum von Flavanol-reichem Kakao zu einer Zunahme der eNOS-abhängigen NO-Bildung und somit zu einer erhöhten NO-Verfügbarkeit führt (Fisher *et al.*, 2003; Heiss *et al.*, 2003; Schroeter *et al.*, 2006). Der Mechanismus ist noch nicht geklärt, was u.a. auf die komplexe Regulation der eNOS-Aktivität zurückzuführen ist. Obwohl die Arginase die NO-Produktion über den Eingriff in die Substratverfügbarkeit regulieren kann, wurde jedoch nie eine Modulation des Enzyms selbst durch Kakao-Flavanole untersucht. Bisher wurden eher Effekte von Kakao-Flavanolen auf die posttranslationale Regulation der eNOS vermutet.

1.1 Methoden zur Bestimmung der eNOS-Aktivität: Vor- und Nachteile

Die eNOS katalysiert die Oxidation von L-Arginin zu äquimolaren Mengen L-Citrullin und NO. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt daher über die gebildete L-Citrullin- oder NO-Menge. Ersteres kann mit Hilfe eines L-Arginin/L-Citrullin-Umwandlungsassay ermittelt werden, der jedoch den Einsatz von radioaktiv markiertem L-Arginin (L-[³H]-Arginin) erfordert (Heller *et al.*, 1999). Aufgrund der chemischen Instabilität in biologischen Systemen ist es schwierig NO sensitiv und selektiv nachzuweisen. Eine Bestimmung der NO-Produktion erfolgt *in vitro* daher meist indirekt über die Oxidationsprodukte (v.a. über Nitrit oder Nitrat). In Tabelle 11 sind die gängigen Methoden aufgeführt, um NO quantitativ (direkt und indirekt) zu erfassen.

Tabelle 11: Methoden zur direkten und indirekten Bestimmung von NO.

Direkte NO-Bestimmung	Nachweisgrenze	Bemerkung
Elektrochemische Detektion (Malinski <i>et al.</i> , 1996)	10 nM	Messung von extrazellulärem NO, welches nur bedingt die Bioverfügbarkeit des intrazellulären NO widerspiegelt
Elektronenspinresonanz-Messung (Batz <i>et al.</i> , 1999)	4,0 µM	Erfasst Moleküle mit ungepaarten Elektronen (Radikale)
Fluoreszenzmikroskopie 4,5-Diaminfluoreszein (DAF-2) (Kojima <i>et al.</i> , 1998)	5,0 nM	DAF-2 reagiert nicht spezifisch mit NO, sondern auch mit den Oxidationsprodukten, semiquantitativ
Indirekte NO-Bestimmung	Nachweisgrenze	Bemerkung
Griess-Assay (Green <i>et al.</i> , 1982)	1,0 µM	Messung von Nitrit und/oder Nitrat
Hämoglobinoxidation (Murphy and Noack, 1994)	1,0 nM	Messung von Methämoglobin
reduktive Chemilumineszenz (Tarpey and Fridovich, 2001)	0,1 nM	Messung von Nitrit und/oder Nitrat

Da Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen NO nur im picomolaren Bereich produzieren, war die reduktive Chemilumineszenzdetektion (CLD) die einzige Methode, um die NO-Bildung (indirekt über Nitrit) und somit die eNOS-Aktivität in den, in dieser Arbeit verwendeten humanen venösen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) zu bestimmen. Aufgrund der hohen Sensitivität für NO birgt diese Methode auch Nachteile. Wenn Zellkulturschalen (oder generell Materialien aus Plastik) mit Flüssigkeit in Berührung kommen, wird Nitrit aus den enthaltenen Weichmachern in die Lösung abgegeben und mittels CLD detektiert. Da in den durchgeführten Zellkulturversuchen der Effekt von Kakao-Flavanolen auf die eNOS-Aktivität schon nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen ermittelt wurde, war die Störung durch das aus der Zellkulturschale freigesetzte Nitrit jedoch tolerabel. Zur Untersuchung von längerfristigen Effekten auf die eNOS-Aktivität wäre die CLD aber nicht mehr geeignet, da die NO-unabhängige Nitritbildung zu hoch wird und die Genauigkeit der Messung beeinflusst.

Kürzlich wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (4-Methoxy-2-(1*H*-naphtho[2,3-*d*]imidazol-2-yl)phenol, MNIP) beschrieben, mit dem man spezifisch NO detektieren kann (Nachweisgrenze 20 nM NO) (Ouyang *et al.*, 2008). Die Methode beruht auf der Reaktion von NO mit dem nichtfluoreszierenden MNIP-Cu-Komplex zu dem fluoreszierenden MNIP-NO. Es handelt sich um eine sehr sensitive und im Gegensatz zur CLD um eine direkte Methode der NO-Bestimmung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Detektion der intrazellulären NO-Bildung in HUVEC mit MNIP etabliert werden. Weiterhin konnte zum ersten mal spezifisch nachgewiesen werden, dass eine Behandlung der Zellen mit (-)-Epicatechin zu einer Zunahme der intrazellulären NO-Konzentration führt. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie kann jedoch nur eine semiquantitative Messung der NO-Bildung durchgeführt werden. Um eine genaue Bestimmung der eNOS-Aktivität mittels MNIP zu erzielen, müsste jedoch eine validierte, quantitative Auswertung der NO-Bildung vorliegen. Da der Fluoreszenzfarbstoff erst gegen Ende der Arbeit zur Verfügung stand, war es nicht mehr möglich eine quantitative Bestimmung der NO-Bildung mittels MNIP zu etablieren. Mit Hilfe dieser Methode könnten letztendlich auch längerfristige Effekte von Substanzen wie (-)-Epicatechin auf die eNOS-abhängige NO-Bildung untersucht werden, da die oben beschriebene Nitritbelastung aus den Plastikmaterialien die Messung nicht beeinflusst.

1.2 Effekt von (-)-Epicatechin auf den L-Argininstoffwechsel in HUVEC

Ob und auf welche Weise die eNOS und die Arginase durch Kakao-Flavanole wie (-)-Epicatechin moduliert werden, wurde anhand von Zellkulturexperimenten untersucht. Als Modellsystem dienten HUVEC. Da es sich hierbei um Primärzellen und nicht um eine Zelllinie handelt, ist dieses Zellsystem der *in vivo* Situation sehr nahe.

1.2.1 Regulation der Arginase-Expression

Bisher ist über den Signalweg, welcher die Arginase-Expression bzw. Aktivität in vaskulären Zellen reguliert wenig bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass eine erhöhte Arginase mRNA-Expression durch einen Thrombin-Rho/Rock Signalweg vermittelt wird (Ming *et al.*, 2004) oder mit der Aktivierung des *Epidermal-growth-factor* Rezeptors und der daraus resultierenden Signalkaskade einhergeht (Nelin *et al.*, 2005). Über welche Signalwege bzw. Rezeptoren die physiologische Arginase-Expression und Aktivität reguliert wird ist noch unklar.

In Zellkulturversuchen konnte nach Inkubation der HUVEC mit (-)-Epicatechin eine dosisabhängige Verminderung der mRNA-Expression (bis zu 37%) sowie der Enzymaktivität (bis zu 30%) der Arginase verzeichnet werden. Diese Effekte unterliegen jedoch einem unterschiedlichen zeitlichen Verlauf. Die Abnahme der mRNA-Expression war nach 24 h zu beobachten während die Enzymaktivität erst nach 48 h absank. Da die Halbwertszeit der Arginase-mRNA mit ca. 24 h bestimmt werden konnte, kann die verminderte Enzymaktivität auf die vorangegangene Abnahme der mRNA-Expression zurückgeführt werden. Analoge Versuche mit einem proinflammatorischen Zytokin-Mix untermauern diese Hypothese. Auch hier war die Arginase mRNA-Expression nach 24 h vermindert, was in gleichem Maße zu einer Senkung der Enzymaktivität nach 48 h führte. (-)-Epicatechin wirkt daher nicht als direkter Modulator der Arginase-Aktivität, sondern führt primär zu einer verminderten mRNA-Expression. Ob (-)-Epicatechin über Rezeptoren bestimmte Signalkaskaden beeinflusst und/oder seine Wirkung erst nach Aufnahme intrazellulär entfaltet, kann anhand dieser *in vitro* Versuche nicht geklärt werden.

1.2.2 Regulation der eNOS-Aktivität

Trotz konstitutiver Expression unterliegt die eNOS einer Vielzahl von unterschiedlichen Regulationsmechanismen, die bis jetzt nur teilweise aufgeklärt werden konnten. Die Regulation findet auf transkriptioneller (Govers and Rabelink, 2001) und posttranskriptioneller Ebene statt (Forstermann *et al.*, 1998), primär jedoch über Veränderungen der Enzymaktivität durch Protein-Protein-Interaktionen, posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Substratverfügbarkeit (Brunini *et al.*, 2003). Im aktiven Zustand liegt die eNOS an Kalzium-Calmodulin assoziiert vor. Das Caveolae-Membranprotein Caveolin-1 ist ein direkter Antagonist von Kalzium-Calmodulin, der um die Bindung an die eNOS konkurriert und die eNOS-Aktivität erniedrigt. Kalziummobilisierende Substanzen wie Bradykinin, Acetylcholin, Histamin und Ionophore sind in der Lage, über die Zunahme des intrazellulären Kalzium-Spiegels die eNOS kurzfristig zu aktivieren (Gosink and Forsberg, 1993; Nathan and Xie, 1994b; Michel *et al.*, 1997; Feron *et al.*, 1998). Neben Caveolin-1 interagiert die eNOS auch mit dem Hitzeschock-Protein 90 (Garcia-Cardena *et al.*, 1998) und Dynamin-2 (Fulton *et al.*, 2001), was mit einer erhöhten eNOS-Aktivität einhergeht. Das eNOS interagierende Protein NOSIP hingegen bewirkt eine Verminderung der eNOS-Aktivität (Dedio *et al.*, 2001). Eine wichtige Rolle für die eNOS-Aktivität spielt auch deren Phosphorylierungsmuster, das von diversen Kinasen und Phosphatasen vermittelt wird und sehr komplex ist. Eine Phosphorylierung an Serin 1177 (durch Proteinkinase A, oder Proteinkinase B/Akt) erhöht die Aktivität, während eine Phosphorylierung an Threonin 495 (durch Proteinkinase C) zu einer Abnahme der Aktivität führt (Chen *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999). Bei einer Aktivitätssteigerung durch Phosphorylierung kann sich die Zelle innerhalb kürzester Zeit der physiologischen Situation anpassen und so beispielsweise auf eine Belastung durch Scherkräfte unmittelbar mit einer erhöhten NO-Produktion reagieren.

Eine Inkubation der HUVEC mit 0,3 μM und 1 μM (-)-Epicatechin führte nach zwei Stunden jeweils in einer Steigerung der eNOS-Aktivität um 35% und 45%. Diese schnelle Aktivitätssteigerung deutet darauf hin, dass es sich um eine posttranslationale Regulation handelt. Die zur eNOS mRNA-Expression und mRNA-Stabilität durchgeführten Untersuchungen bestätigten diese Hypothese. Weder die mRNA-Expression, noch die mRNA-Stabilität wurden von (-)-Epicatechin beeinflusst. Eine

Regulation über die L-Argininverfügbarkeit durch die Arginase kann ausgeschlossen werden, da die beobachtete Abnahme der Arginase-Aktivität erst nach 48-stündiger Inkubation mit (-)-Epicatechin zu verzeichnen war. Der Effekt von (-)-Epicatechin auf die eNOS-Aktivität könnte durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bedingt sein. (-)-Epicatechin könnte die Wirkweise von Kalziumionophoren nachahmen. Da Flavanole in der Lage sind Rezeptoreigenschaften und zelluläre Signalkaskaden zu beeinflussen, könnte (-)-Epicatechin aber auch über den Acetylcholin- und/oder Bradykinin-Rezeptor wirken. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade erhöht über eine Aktivierung der Phospholipase C die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Rezeptoren, über die (-)-Epicatechin in primären Endothelzellen wirkt, sind bis jetzt jedoch nicht bekannt. Eine weitere Erklärung für die schnelle eNOS-Aktivitätssteigerung könnte auch in einer Veränderung des Phosphorylierungsmusters liegen. In Zellkulturversuchen mit bovinen Aortaendothelzellen führte eine 15-minütige Behandlung mit Epigallocatechingallat, einem Flavanol aus Tee, ebenfalls zu einer Steigerung der eNOS-Aktivität. Diese wurde durch eine Phosphatidylinositol-3-Kinase-, PKA- und Akt-abhängige Phosphorylierung des Serin 1179 (analog dem Serin 1177 im Menschen) hervorgerufen (Lorenz *et al.*, 2004).

Eine Inkubation der HUVEC mit 3 μM und 10 μM (-)-Epicatechin zeigte überraschenderweise keine Wirkung mehr auf die eNOS-Aktivität. NO weist eine hohe Affinität gegenüber Hämgruppen auf. Auch die eNOS besitzt eine Hämgruppe im aktiven Zentrum, welche eine wichtige Rolle bei der L-Arginin-Umsetzung spielt. Im Vergleich zur NO-Bildung durch 1 μM (-)-Epicatechin führte eine Behandlung der Zellen mit 10 μM (-)-Epicatechin zu einer stärkeren NO-Bildung. Die NO-Konzentrationen, die nach Inkubation mit 3 μM und 10 μM (-)-Epicatechin erzielt wurden, könnten eine Konzentration erreicht haben, die zu einer negativen *feedback* Hemmung der eNOS durch Bindung von NO an die Hämgruppe führt, was den Effektverlust in den beiden höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen erklären könnte.

Damit konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin in der Lage ist den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen zu modulieren. Die eNOS-Aktivität wurde gesteigert, während die Arginase mRNA-Expression abnahm. *In vivo* könnte dies zu einer gesteigerten NO-Bildung führen, was mit einer verbesserten Endothelfunktion einhergeht. Die Regulation des L-Argininstoffwechsels könnte somit für die kardioprotektiven Effekte von Kakao-Flavanolen verantwortlich sein.

1.3 Effekt des Flavanol-Gemisches auf den L-Argininstoffwechsel in HUVEC

Mit der Nahrung aufgenommene Flavanole werden unmittelbar nach der Resorption in den Enterozyten und anschließend in der Leber zum größten Teil metabolisiert. Zu diesen Reaktionen zählen Glukuronidierung, Methylierung und Sulfatierung von Hydroxylgruppen. *In vivo* erreicht deshalb nicht (-)-Epicatechin die Endothelzellen, sondern hauptsächlich dessen im Plasma zirkulierende Metabolite. Diese haben u.U. verglichen mit der Muttersubstanz unterschiedliche Eigenschaften. Daher sollten bei der Aufklärung der gesundheitsfördernden Effekte von Kakao-Flavanolen auch Zellkulturversuche mit den entsprechenden Metaboliten berücksichtigt werden. Infolgedessen wurden die mit (-)-Epicatechin durchgeführten Zellkulturversuche auch mit einem Flavanol-Gemisch wiederholt. Das Gemisch entsprach im Wesentlichen dem Metabolitenmuster an (-)-Epicatechin, welches 2 h nach Einnahme eines Flavanol-reichen Kakaos (wie er auch in dieser Arbeit verwendet wurde) in humanem Plasma zu finden ist. Die entsprechenden Sulfatkonjugate wurden dabei nicht berücksichtigt (Schroeter *et al.*, 2006). Wie auch (-)-Epicatechin führte eine Behandlung der HUVEC mit dem Flavanol-Gemisch zu einer dosisabhängigen Abnahme der Arginase-2 mRNA-Expression innerhalb von 24 h, die mit einer Verminderung der Arginase-Aktivität nach 48 h korrelierte. Im Gegensatz dazu blieb die mRNA-Expression der eNOS unverändert, während nach einer zweistündigen Inkubation eine dosisabhängige Steigerung der eNOS-Aktivität zu verzeichnen war. Sowohl die Arginase mRNA-Expression als auch die eNOS-Aktivität konnten mit physiologischen Konzentrationen des Flavanol-Gemisches (~ 2,6 µM) beeinflusst werden (Abnahme der Arginase mRNA-Expression um 35%, Steigerung der eNOS-Aktivität um 25%).

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass sowohl (-)-Epicatechin als auch ein Gemisch seiner Hauptmetabolite den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen beeinflussen. Welche (-)-Epicatechin-Metabolite für die *in vivo* Effekte von Kakao verantwortlich sind, konnte noch nicht identifiziert werden. Die zelluläre Aufnahme und weitere Verstoffwechselung der Metabolite ist noch weitgehend ungeklärt. Die Aufnahme von 3'- und 4'-O-Methylepicatechin in Hautfibroblasten und Endothelzellen konnte bereits nachgewiesen werden, die von Glukuroniden jedoch nicht (Schroeder *et al.*, 2003). Da die Glukuronidierung eine Phase-II-Reaktion der Biotransformation darstellt, wird vermutet, dass (-)-Epicatechin-Glukuronide *in vivo*

schnell ausgeschieden werden und somit pharmakologisch weniger bedeutend sind. In einigen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Glukuronide bestimmter Arzneistoffe pharmakologisch aktiv sind (Kroemer and Klotz, 1992), wie z.B. das Morphin-Glukuronid (Thompson *et al.*, 1995; Milne *et al.*, 1996). Da im Falle von (-)-Epicatechin die Glukuronidkonjugate zu den Hauptmetaboliten zählen, stellt sich die Frage, ob diese *in vivo* bioaktiv sind. Spencer *et al.* ziehen in Erwägung, dass die Glukuronide durch im Serum vorhandene β -Glukuronidase-Aktivität wieder in die Aglykone gespalten und diese dann von Zellen aufgenommen werden (Spencer *et al.*, 2001b). Bei den Sulfaten geht man davon aus, dass es sich um die Harnausscheidungsprodukte handelt (Baba *et al.*, 2000). Bis jetzt ist nur eine limitierte Anzahl von Studien durchgeführt worden, die den biologischen Effekt von (-)-Epicatechin-Konjugaten untersuchten. Harada *et al.* beobachteten, dass (-)-Epicatechin-Glukuronide eine ähnliche antioxidative Aktivität wie die Aglykone haben, während Methylglukuronide eine verminderte Aktivität aufweisen (Harada *et al.*, 1999). Ausschlaggebend für das antioxidative Potential von (-)-Epicatechin ist die Catecholstruktur des B-Rings. Methyliert werden genau diese Hydroxylgruppen, während eine Konjugation mit Glukuronsäure hauptsächlich am A-Ring erfolgt. Dies könnte den von Harada *et al.* beobachteten Unterschied in der antioxidativen Aktivität zwischen Glukuroniden und Methylglukuroniden erklären. Spencer *et al.* beobachteten, dass (-)-Epicatechin und 3'-O-Methylepicatechin humane Fibroblasten im selben Maß gegen Apoptose schützen (Spencer *et al.*, 2001a). Steffen *et al.* zeigen, dass (-)-Epicatechin, dessen Methyl- und Glukuronid-Derivate zu einer Abnahme der endothelialen NADPH-Oxidase-Aktivität führen (Steffen *et al.*, 2008). Es wird deutlich, dass sowohl die Methyl- als auch die Glukuronid-Derivate von (-)-Epicatechin *in vitro* Effekte aufweisen. Da die Metabolite unterschiedliche Eigenschaften haben, sind die jeweiligen Effekte möglicherweise auch auf unterschiedliche Wirkmechanismen zurückzuführen.

Um herauszufinden, wie sich bestimmte (-)-Epicatechin-Metabolite des verwendeten Flavanol-Gemisches auf die Arginase mRNA-Expression und eNOS-Aktivität auswirken, wurden HUVEC mit Methyl- und Glukuronid-Derivaten des Flavanol-Gemisches behandelt. Es stellte sich heraus, dass 4'-O-Methylepicatechin, jedoch nicht Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid zu einer Abnahme der Arginase mRNA-Expression führen. Im Gegensatz dazu sind es die Glukuronide (Epicatechin-7-O- β -D-Glukuronid und 4'-O-Methylepicatechin-7-O- β -D-Glukuronid), die eine Aktivitätssteigerung der eNOS

bewirken. Somit konnte belegt werden, dass auch die (-)-Epicatechin-Glukuronide bioaktiv sind. Inwieweit diese Ergebnisse die *in vivo* Situation widerspiegeln, ist noch unklar. Es scheint jedoch, dass die protektiven Effekte von Kakao-Flavanolen auf ein Zusammenwirken der im Plasma zirkulierenden Metabolite zurückzuführen sind. So könnten Glukuronide aufgrund ihrer verminderten Aufnahme in die Zelle über Rezeptoren wirken, während Methylderivate innerhalb der Zelle agieren könnten.

1.4 Die Rolle der eNOS und Arginase bei der endothelialen Dysfunktion

Eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase spielt die NO-Bildung durch die eNOS. Eine Störung durch Risikofaktoren wie Rauchen, Hypercholesterinämie, Hyperglykämie, Bluthochdruck und Diabetes mellitus führt zur endothelialen Dysfunktion, die durch eine reduzierte NO-Verfügbarkeit gekennzeichnet ist (Fuster *et al.*, 1992b; Fuster *et al.*, 1992a; Celermajer *et al.*, 1993). Charakteristisch ist dabei eine verminderte Vasodilatation, eine erhöhte Gefäßpermeabilität für Plasmaproteine und eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten mit proliferativen, proinflammatorischen und proarteriosklerotischen Folgen. Eine verminderte NO-Verfügbarkeit kann durch einen verstärkten Abbau von NO und/oder durch eine Abnahme der NO-Bildung bedingt sein (Cai and Harrison, 2000). Letzteres geht mit einer geringeren eNOS-Aktivität einher, die durch eine begrenzte Verfügbarkeit von Kofaktoren wie z.B. Tetrahydrobiopterin (Alp and Channon, 2004) oder einer limitierten L-Argininverfügbarkeit hervorgerufen werden kann. Die Modulation der Substratverfügbarkeit durch die Arginase gewinnt dabei immer mehr an Bedeutung (Li *et al.*, 2001). So ist die endothelialen Dysfunktion in einer Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen wie alters-bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen (Berkowitz *et al.*, 2003; White *et al.*, 2006), Diabetes mellitus (De Vriese *et al.*, 2000; Bivalacqua *et al.*, 2001), Bluthochdruck (Xu *et al.*, 2004; Demougeot *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005) und Arteriosklerose (Ming *et al.*, 2004; Ryoo *et al.*, 2006) auf eine erhöhte Arginase-Expression bzw. Aktivität zurückzuführen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine wiederholte Einnahme von Flavanol-reichem Kakao über Wochen sowohl bei Gesunden als auch bei Risikopatienten für kardiovaskuläre Erkrankungen (Rauchern, Probanden mit Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus) die Endothelfunktion verbessert,

gemessen anhand einer gesteigerten Vasodilatation und erniedrigtem Blutdruck (Wang-Polagruto *et al.*, 2006; Heiss *et al.*, 2007; Erdman *et al.*, 2008).

In Rahmen dieser Arbeit konnte die Modulation des L-Argininstoffwechsel in HUVEC durch das Kakao-Flavanol (-)-Epicatechin und dessen Metabolite nachgewiesen werden. Innerhalb von kurzer Zeit (2 h) ist ein Aktivitätsanstieg der eNOS zu verzeichnen, was mit einer erhöhten NO-Bildung einhergeht. Im Gegensatz dazu wird eine verminderte Arginase mRNA-Expression nach 24 h beobachtet, was nach 48 h in einer Abnahme der Arginase-Aktivität resultiert. Da die Modulation der eNOS-Aktivität kurzfristig erfolgt, ist ein lang anhaltender Effekt nach regelmäßiger Einnahme von Kakao vermutlich auf die verminderte Arginase-Aktivität, bedingt durch eine anhaltende Inhibierung der Arginase mRNA-Expression, zurückzuführen. Dies bestätigt die aufgestellte Hypothese, dass die Arginase eine wichtige Rolle in der Regulation der eNOS-Aktivität durch Kakao-Flavanole spielt und für die gesteigerte NO-Bildung mitverantwortlich ist.

2 Einfluss von Kakao-Flavanolen auf den L-Argininstoffwechsel unter inflammatorischen Bedingungen

Neben der kardioprotektiven Wirkung sind Kakao-Flavanole auch in der Lage das Immunsystem sowie Entzündungsreaktionen zu modulieren (Sanbongi *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2001; Ramiro *et al.*, 2005; Sies *et al.*, 2005). Während einer Entzündung verändert sich in humanen Endothelzellen der L-Argininstoffwechsel. Proinflammatorische Zytokine führen zu einer Inhibition der eNOS- sowie Arginase-Expression und gleichzeitig zu einer Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Suschek *et al.*, 2004). Um zu gewährleisten, dass der L-Argininbedarf der Zelle unter inflammatorischen Bedingungen gedeckt wird, findet neben der iNOS eine Koinduktion der Expression des kationischen Aminosäure-Transporters 2B (CAT-2B) statt, was eine gesteigerte L-Argininaufnahme zur Folge hat. Dadurch ist die Zelle in der Lage die physiologische NO-Synthese um das Tausendfache zu steigern. Die produzierte NO-Menge im mikromolaren Bereich erfolgt kontinuierlich über Stunden bis hin zu Tagen. Diese zytotoxische NO-Konzentration dient im Rahmen einer Immunantwort unter anderem der Abwehr von Bakterien, verursacht aber auch Gewebeschäden.

2.1 Regulation der iNOS und CAT-2B mRNA-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Kakao-Flavanole den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen beeinflussen. Es stellte sich daher die Frage, ob der L-Argininstoffwechsel auch unter inflammatorischen Bedingungen Angriffspunkt der Kakao-Flavanole ist und darüber eine immunmodulierende Wirkung vermittelt wird. Um die Effekte von (-)-Epicatechin und dem Flavanol-Gemisch in diesem Kontext zu untersuchen, wurden die Auswirkungen auf die iNOS und CAT-2B mRNA-Expression ermittelt. Zu diesem Zweck wurde in HUVEC durch Inkubation mit einem proinflammatorischen Zytokin-Mix (TNF- α , IF- γ und IL-1 β) eine Entzündung simuliert. Sowohl (-)-Epicatechin als auch das Flavanol-Gemisch führten zu einer dosisabhängigen Abnahme der zytokininduzierten iNOS und CAT-2B mRNA-Expression um bis zu 60%.

Die Expression vieler Gene, die bei der Entzündung eine Rolle spielen, wird durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert (Pahl and Baeuerle, 1997). Ohne entsprechende Stimuli wird NF- κ B im Zytoplasma von dem Inhibitorprotein I- κ B gebunden und liegt somit inaktiv vor (Baeuerle and Baltimore, 1988). Eine Stimulation der Zelle durch virale und bakterielle Proteine, energiereiche Strahlung oder proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α führt zu einer Phosphorylierung von I- κ B durch die I- κ B-Kinase (Beg *et al.*, 1993; Traenckner *et al.*, 1995). Dies hat eine Polyubiquitinierung zur Folge, was zum Abbau des I- κ B durch das 26S Proteasom führt (Henkel *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995). Das nun freie aktivierte NF- κ B wandert in den Zellkern. Dort bindet es an κ B-Motive in Promotor- und Enhancer-Regionen der DNA und induziert u.a. die Expression von iNOS und CAT-2B. Es stellte sich daher die Frage, ob die verminderte iNOS und CAT-2B mRNA-Expression durch (-)-Epicatechin und das Flavanol-Gemisch auf eine Beeinflussung der NF- κ B-Aktivität zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu untermauern, wurden A549/8-pNF- κ B-Luc-Zellen verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um die stabil transfizierte humane Lungenepithelzelllinie A549/8, welche NF- κ B Bindungsmotive vor einem Luziferase-Reportergen enthält. Somit konnte eine Modulation der zytokininduzierten NF- κ B-Aktivität anhand der Luziferase-Reportergen-Aktivität ermittelt werden. Eine Inkubation der Zellen mit je 10 μ M (-)-Epicatechin oder des Flavanol-Gemisches führten zu einer Abnahme der Luziferase-Aktivität um 30 % und 40%. Mit

dieser Versuchsreihe konnte bestätigt werden, dass (-)-Epicatechin und das Flavanol-Gemisch in der Lage sind die NF- κ B-Aktivität zu vermindern und womöglich über diesen Weg die iNOS und CAT-2B mRNA-Expression zu regulieren. Der Mechanismus der einer Abnahme der NF- κ B-Aktivität zugrunde liegt konnte mit dieser Versuchreihe nicht geklärt werden. Eine verminderte Phosphorylierung von I- κ B durch Hemmung der I- κ B-Kinase könnte eine mögliche Erklärung sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin und das Flavanol-Gemisch den L-Argininstoffwechsel in humanen Endothelzellen unter inflammatorischen Bedingungen beeinflussen und darüber eine immunmodulierende Wirkung ausüben. Die beobachtete Abnahme der iNOS und CAT-2B mRNA-Expression ist vermutlich auf eine verminderte NF- κ B-Aktivität zurückzuführen und mit einer Senkung der zytotoxischen NO-Bildung verbunden. Während einer Entzündung stimuliert das von der iNOS gebildete NO u.a die Zykllooxygenase und erhöht somit die proinflammatorische Prostaglandin-Synthese (Salvemini *et al.*, 1995). Eine Abnahme der iNOS und CAT-2B mRNA-Expression könnte daher die Bildung dieser Entzündungsmediatoren senken und damit verbundene Folgen wie eine gesteigerte Endothelpermeabilität, Fieber und Schmerzen vermindern.

2.2 Die Rolle der iNOS bei chronischen Entzündungen

Während die zu geringe Produktion von NO durch eine verminderte eNOS-Aktivität ein wichtiger Pathomechanismus kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein scheint, ist für eine pathologische, anhaltende Überproduktion von NO das Isoenzym iNOS von Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen sind iNOS mRNA und Protein nicht nachweisbar. Im Zuge der Immunantwort kommt es nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen zur Expression der iNOS, wobei eine zytotoxische NO-Menge gebildet wird und der Immunabwehr dient. Bei chronischen Entzündungen (wie z.B. Arteriosklerose oder entzündliche Gelenk- und Darmerkrankungen) hingegen ist die Produktion von NO durch die iNOS nicht erregerbedingt. Die Folge ist eine anhaltend gesteigerte NO-Produktion in zytotoxischen Mengen, die chronische Gewebeschädigungen nach sich zieht und nicht mehr primär der Immunantwort dient. Eine regelmäßige Einnahme von Flavanol-reichem Kakao

könnte die iNOS-abhängige NO-Produktion vermindern und den Begleitscheinungen von chronischen Entzündungen entgegenwirken.

3 Einfluss von Kakao-Flavanolen auf die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten

Die primäre Aufgabe der Erythrozyten besteht in der Sauerstoffversorgung von stoffwechselaktivem Gewebe. Daneben spielen sie aber auch eine wichtige Rolle im vaskulären NO-Stoffwechsel. Aufgrund der Reaktion von im Plasma befindlichem NO mit Oxyhämoglobin zu dem vaso-inaktiven Nitrat und Methämoglobin wurden sie hauptsächlich mit dem NO-Abbau in Verbindung gebracht (Lancaster, 1994). Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass Erythrozyten eine aktive NOS besitzen, die NO in physiologischen Konzentrationen produziert (Kleinbongard *et al.*, 2006). Die Enzymaktivität der erythrozytären NOS ist vergleichbar mit der eNOS-Aktivität von kultivierten HUVEC (0,7 pmol/min/mg Protein). Obwohl das meiste NO vermutlich an Hämoglobin bindet, erhöht das freigesetzte NO die lokale Konzentration in der Umgebung des Erythrozyten. Neben dem Endothel tragen vermutlich auch Erythrozyten zum im Plasma zirkulierenden NO-Pool bei und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase durch Regulation des Gefäßtonus und der Thrombozytenaggregation. Bei der erythrozytären NOS handelt es sich um die endotheliale Isoform. Die Regulation des Enzyms erfolgt entsprechend über die Substratverfügbarkeit, den intrazellulären Kalziumspiegel und die Phosphorylierung an Serin 1177. Analog zur beschriebenen Situation im Endothel kann L-Arginin in Erythrozyten ebenfalls von der Arginase umgesetzt werden. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob neben dem L-Argininstoffwechsel humaner Endothelzellen *in vitro* auch der erythrozytäre L-Argininstoffwechsel *in vivo* durch Kakao-Flavanole moduliert werden kann. Da es experimentell sehr schwierig war, die NOS-Aktivität zu bestimmen, wurde nur der Einfluss der Kakao-Flavanole auf die Arginase-Aktivität untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine humane Interventionsstudie im *Cross-Over Design* mit insgesamt 20 gesunden Erwachsenen durchgeführt. Diese nahmen sowohl einen Flavanol-reichen als auch einen Flavanol-armen Kakao mit einem Gesamtflavanolgehalt von 985 mg bzw. 80 mg ein. Anschließend wurde die Konzentration an

Gesamtepicatechin im Plasma und die Arginase-Aktivität in den Erythrozyten gemessen.

3.1 Bestimmung von Gesamtepicatechin im Serum

Das Flavanolmuster des hier verwendeten Flavanol-reichen Kakaos setzt sich aus 244 mg monomeren Flavanole (183 mg (-)-Epicatechin und 61 mg (+)-Catechin) und 741 mg Procyanidinen (Dimere bis Oktamere) zusammen. Literaturdaten weisen darauf hin, dass eine Resorption der Procyanidine nur in geringem Umfang stattfindet. Holt et al. konnten zwei Stunden nach Konsum von Kakaoextrakten im Blut allenfalls Dimere in geringen Mengen (in ca. 100-fach geringerer Konzentration als (-)-Epicatechin) nachweisen (Holt *et al.*, 2002a). Bei einer äquimolaren Einnahme von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin betrug die (+)-Catechin-Konzentration nach zwei Stunden nur 3% der (-)-Epicatechin-Konzentration. Von den im Kakao enthaltenen Flavanolen ((-)-Epicatechin, (+)-Catechin und Procyanidine) wird demnach (-)-Epicatechin am besten resorbiert. Daher wurde in dieser Humanstudie die Änderung der Konzentration an Gesamtepicatechin (unmetabolisiertes sowie glukuronidiertes und sulfatiertes (-)-Epicatechin) nach Kakao-Einnahme bestimmt, ohne Berücksichtigung der Procyanidine oder des (+)-Catechins. Die maximale Plasmakonzentration an Gesamtepicatechin ist zwei bis drei Stunden nach Einnahme Flavanol-reicher Nahrungsmittel erreicht. Innerhalb von 24 h werden die Metabolite über die Galle und Urin ausgeschieden. Diese Beobachtungen konnten durch die beschriebene Interventionsstudie bestätigt werden. Zwei Stunden nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos konnte ein maximaler Anstieg der Gesamtepicatechin-Konzentration auf das 14-fache, von 38 nM auf 535 nM, verzeichnet werden. Nach 24 h war wieder die Ausgangskonzentration erreicht. Dies entspricht den Beobachtungen von Rein et al., der zwei Stunden nach Einnahme von 80 g dunkler Schokolade (Epicatechingehalt 140 mg) eine 12-fache Zunahme an Gesamtepicatechin von 22 nM auf 260 nM nachweisen konnte (Rein *et al.*, 2000a). Ähnlich hohe Konzentrationen an Gesamtepicatechin wurden von Richelle et al. (700 nM) und Wang et al. (400 nM) beschrieben, zwei Stunden nach Gabe von dunkler Schokolade mit einem dem Flavanol-reichen Kakao vergleichbaren (-)-Epicatechingehalt (Richelle *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu bestimmten Schroeter et al. zwei Stunden nach Einnahme des in dieser Studie verwendeten

Flavanol-reichen Kakaos eine Konzentration an Gesamtepicatechin von 2,6 μM (Schroeter *et al.*, 2006). Baba *et al.* ermittelten eine Konzentration von 5 μM Gesamtepicatechin, zwei Stunden nach Schokoladegenuss mit entsprechendem (-)-Epicatechingehalt (Baba *et al.*, 2000). Die große Schwankungsbreite kann durch unterschiedliche Resorptionsraten und Verstoffwechselung von (-)-Epicatechin der einzelnen Probanden bedingt sein. Mit Flavanol-armem Kakao (80 mg Gesamtflavanole, davon 20 mg (-)-Epicatechin) konnte keine Änderung der Konzentration an Gesamtepicatechin verzeichnet werden. Eine Einnahme von 20 mg (-)-Epicatechin ist somit nicht ausreichend, um die Flavanol-vermittelten Effekte hervorzurufen.

3.2 Regulation der Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten

Um die Wirkung von Kakao-Flavanolen auf die erythrozytäre Arginase-Aktivität zu untersuchen, wurden die Erythrozyten vor Einnahme des Kakaos sowie 2 h und 24 h danach isoliert und die Arginase-Aktivität bestimmt. Zuvor konnte die basale Arginase-Aktivität von 40 gesunden Erwachsenen auf durchschnittlich 3,2 $\mu\text{mol Harnstoff} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ bestimmt werden. In der Literatur sind bislang keine Daten über die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten vorhanden. Die Ergebnisse belegen eine Verminderung der Enzymaktivität 24 h nach Einnahme des Flavanol-reichen Kakaos, während der Flavanol-arme Kakao keinen Effekt auf die erythrozytäre Arginase-Aktivität aufwies. Dabei konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Konzentration an Gesamtepicatechin und der prozentualen Abnahme der Arginase-Aktivität verzeichnet werden. Unter den 20 Probanden wurden zwei *non-responder* identifiziert, die gar nicht auf den Flavanol-reichen Kakao ansprachen. Da deren Konzentration an Gesamtepicatechin zu den gemessenen Zeitpunkten aber der Konzentration der restlichen Probanden entsprach, konnte eine erniedrigte Resorptionsrate als Grund der ausbleibenden Modulation der Arginase-Aktivität ausgeschlossen werden. Da nicht bekannt ist, welche (-)-Epicatechin-Metabolite für die verminderte Arginase-Aktivität in Erythrozyten verantwortlich sind, könnten interindividuelle Unterschiede im Flavanol-Metabolismus eine mögliche Erklärung dafür sein. So variiert die Aktivität der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) aufgrund eines Polymorphismus im COMT-Gen um das 3-4-fache (Tiihonen *et al.*, 1999; Dawling *et al.*, 2001). Die Glukuronidierung wird durch Umwelteinflüsse,

Nahrung und genetische Polymorphismen verändert, was zu einem interindividuellen Glukuronidierungsmuster von Flavanolen führt (Yang *et al.*, 1998).

Auch *in vitro* führte eine Behandlung der Endothelzellen mit (-)-Epicatechin und dem Flavanol-Gemisch zu einer Abnahme der Arginase-Aktivität. Diese Beobachtung war primär jedoch auf eine verminderte mRNA-Expression zurückzuführen. Da es sich bei Erythrozyten aber um organellenlose Zellen handelt, muss die erniedrigte Arginase-Aktivität nach Konsum des Flavanol-reichen Kakaos in diesem Fall auf einem anderen Mechanismus beruhen. Mögliche Erklärungen liegen in einer verminderten Proteinstabilität. Eine Regulation der Enzymaktivität durch die erythrozytäre NOS ist fraglich, da bis jetzt nur das umgekehrte Phänomen, eine Regulation der eNOS-Aktivität durch die Arginase, beschrieben wurde.

In dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Kakao-Flavane den L-Argininstoffwechsel in humanen Erythrozyten durch Modulation der Arginase beeinflussen. Eine Abnahme der Arginase-Aktivität könnte *in vivo* eine erhöhte L-Argininverfügbarkeit für die erythrozytäre NOS bedeuten, was in einer gesteigerten NO-Bildung resultiert. Dies wiederum führt zu einer verbesserten Vasodilatation und zu einer verminderten Thrombozytenaggregation. Die Modulation der Arginase in humanen Erythrozyten könnte demnach eine Schlüsselrolle im Rahmen der kardioprotektiven Effekte von Kakao-Flavanolen einnehmen.

4 Bedeutung der Regulation des L-Argininstoffwechsels *in vivo*

Seit mehr als 20 Jahren ist der L-Argininstoffwechsel von großem Interesse, hauptsächlich wegen der Rolle des L-Arginin als Stickstoffdonor für die Synthese von NO. Andere wichtige Aspekte wie der L-Arginintransport oder Katabolismus durch Arginase sind jedoch weniger gut untersucht. Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass neben der eNOS bzw. iNOS auch die Arginase bei verschiedenen Erkrankungen von Bedeutung ist. Eine Verminderung der eNOS und somit auch NO-Verfügbarkeit ist aufgrund einer Überexpression der endothelialen Arginase in einer Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen wie alters-bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen (Berkowitz *et al.*, 2003; White *et al.*, 2006), Diabetes mellitus (De Vriese *et al.*, 2000; Bivalacqua *et al.*, 2001), Bluthochdruck (Xu *et al.*, 2004; Demougeot *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005) und Arteriosklerose (Ming *et al.*,

2004; Ryoo *et al.*, 2006) nachgewiesen, was eine endotheliale Dysfunktion zur Folge hat. Weiterhin ist eine erhöhte Arginase-Aktivität in Erythrozyten bei Patienten mit Sichelzellanämie und Diabete mellitus beschrieben, was mit einem verminderten NO-Plasmaspiegel einhergeht und sowohl die Erythrozyten- als auch die Endothelfunktion beeinträchtigt (Jiang *et al.*, 2003; Iyamu *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2005). Die Entwicklung spezifischer Substanzen, welche auf die Arginase-Aktivität und/oder Expression abzielen ist daher ein viel versprechendes Forschungsgebiet, welches zu neuen therapeutischen Ansätzen in der Behandlung vaskulärer Erkrankungen führen kann. Im Gegensatz zur endothelialen Dysfunktion, die mit einer verminderten NO-Verfügbarkeit aufgrund einer erhöhten Arginase- und erniedrigten eNOS-Aktivität einhergeht, ist bei chronischen Entzündungen die anhaltende Produktion einer zytotoxischen NO-Konzentration durch die iNOS problematisch. Daher ist auch die Entwicklung von Substanzen, die gezielt die übermäßige, erregerunabhängige NO-Produktion hemmen, Gegenstand der pharmakologischen Forschung.

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass (-)-Epicatechin und dessen Metabolite in humanen Endothelzellen zu einer verminderten Arginase mRNA-Expression sowie einer gesteigerten eNOS-Aktivität führen. Unter inflammatorischen Bedingungen hemmen (-)-Epicatechin und dessen Metaboliten die iNOS und CAT-2B. In humanen Erythrozyten wurde nach Einnahme eines Flavanol-reichen Kakaos eine Abnahme der Arginase-Aktivität beobachtet. Kakao könnte somit nicht nur präventivmedizinisch, sondern auch im Rahmen einer Therapie gegen Arteriosklerose, Diabetes mellitus und Bluthochdruck, aber auch bei chronischen Entzündungen eingesetzt werden. Es bedarf jedoch weitere Studien, die die Effekte von Kakao-Flavanolen über einen längeren Zeitraum untersuchen.

V Zusammenfassung

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass der regelmäßige Verzehr von Kakaoprodukten mit einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen korreliert. Mit den protektiven Wirkungen werden insbesondere polyphenolische Inhaltsstoffe aus der Gruppe der Flavanole, wie z.B. (-)-Epicatechin, in Zusammenhang gebracht. Flavanole sind weit verbreitete Sekundärmetabolite in Pflanzen und Bestandteile unserer Nahrung. Unzureichend verstanden sind bisher die molekularen Mechanismen, die den Wirkungen beim Menschen unterliegen. Vermutet werden antioxidative Eigenschaften der Verbindungen und Einflüsse auf zelluläre Signalwege wie die Bereitstellung von Stickstoffmonoxid (NO).

In der vorliegenden Arbeit konnte in Zellkulturexperimenten mit humanen venösen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) und Interventionsstudien am Menschen gezeigt werden, dass neben der NO-Synthese selbst, Enzyme des L-Argininstoffwechsels Zielstrukturen von Kakao-Flavanolen sind. L-Arginin ist Substrat der NO-Synthase und somit eine Schlüsselverbindung des NO-Stoffwechsels, gleichzeitig aber auch Substrat der Arginase und somit wichtig für die Bereitstellung von L-Ornithin und Folgeprodukten (wie Polyamine und L-Prolin). (-)-Epicatechin und seine Primärmetabolite vermindern in HUVEC die mRNA-Expression der Arginase und somit zeitversetzt die Arginase-Aktivität auf Proteinebene. Eine Inkubation mit Kakao-Flavanolen führt zu einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), wobei die mRNA-Expression des Enzyms jedoch unverändert ist. Die NO-Bildung wurde neben der indirekten Nitrit-Methode auch mit Hilfe eines neuen Fluoreszenzfarbstoffs (4-Methoxy-2-(1*H*-naphtho[2,3-*d*]imidazol-2-yl)phenol, MNIP) nachgewiesen, der spezifisch intrazellulär gebildetes NO erfasst. Somit wurde die erhöhte, eNOS-abhängige NO-Bildung in HUVEC nach Inkubation mit (-)-Epicatechin erstmals direkt in Zellen gezeigt.

Die Ergebnisse der Arbeit lassen vermuten, dass unter Behandlung mit Kakao-Flavanolen nach Hemmung des Konkurrenzzyms mehr L-Arginin für die NO-Synthese verfügbar ist, was zudem mit einer gesteigerten eNOS-Aktivität einhergeht. Die so erhöhte Verfügbarkeit des vasoaktiven Mediators NO beeinflusst die Endothelfunktion und könnte einer endothelialen Dysfunktion entgegenwirken.

Erythrozyten synthetisieren ebenfalls NO und spielen eine wichtige Rolle bei der lokalen Regulation des Gefäßtonus. Sie enthalten auch die L-argininmetabolisierenden Enzyme, Arginase und NOS. In einer Interventionsstudie mit 20 Probanden wurde der Effekt eines Flavanol-reichen und eines Flavanol-armen Kakaotranks auf die erythrozytäre Arginase-Aktivität untersucht. Nach Verzehr des Flavanol-reichen Kakaos war die Arginase-Aktivität in humanen Erythrozyten signifikant vermindert; kein Effekt wurde hingegen mit Flavanol-armem Kakao erzielt. *In vitro* und *in vivo* Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Arginase eine Zielstruktur von Kakao-Flavanolen ist, die über eine Modulation des L-Argininstoffwechsels die NO-Verfügbarkeit und somit die Endothelfunktion beeinflussen.

Entzündungsreaktionen und endotheliale Dysfunktion werden zunehmend in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen im Zusammenhang gesehen. Unter inflammatorischen Bedingungen ändert sich der L-Argininstoffwechsel und anstelle von eNOS und Arginase werden die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowie der kationische Aminosäuretransporter 2B (CAT-2B) exprimiert. NO wird in hoher Konzentration gebildet, was bei fehlender Gegenregulation zu Gewebeschäden führen kann. In der vorliegenden Arbeit beschriebene Zellkulturversuche zeigten, dass (-)-Epicatechin und seine Metabolite unter inflammatorischen Bedingungen die mRNA-Expression von iNOS und CAT-2B vermindern, was eine Abnahme der überhöhten NO-Konzentration zur Folge hat. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein zentraler Schalter bei Immunantworten und im Entzündungs-geschehen. Experimente in Zellkultur belegten, dass (-)-Epicatechin und Epicatechinmetabolite die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B senken. Eine verminderte iNOS und CAT-2B mRNA-Expression in HUVEC ist somit auf die Abnahme der NF- κ B-Aktivität zurückzuführen.

VI Summary

Epidemiological studies have shown that a regular consumption of cocoa products is correlated with diminished risk for cardiovascular diseases. Cardioprotective effects have been attributed to flavanols such (-)-epicatechin. These polyphenolic compounds are ubiquitous secondary metabolites of plants and thus part of our nutrition. The molecular mechanism underlying flavanol-mediated effects are not completely understood yet. It is assumed that antioxidant properties and modulation of cellular signal pathways e.g. the supply of nitric oxide (NO) are involved.

Cell culture experiments with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human intervention studies demonstrate that cocoa flavanols influence enzymes of the L-arginine metabolism. L-Arginine is the substrate of the endothelial NO-synthase (eNOS) and plays a pivotal role in NO-metabolism. However, it is also the substrate of arginase and serves as a precursor of L-ornithine and thereof derived products (e.g. polyamine and L-proline). (-)-Epicatechin and its metabolites decrease arginase mRNA-expression in HUVEC, consequently leading to decreased enzyme activity at the protein level. On the contrary, eNOS activity is increased, whereas its mRNA-expression is unchanged. The NO-synthesis was detected using an indirect method (determining nitrite) and in parallel with a new fluorescent dye (4-Methoxy-2-(1*H*-naphtho[2,3-*d*]imidazol-2-yl)phenol, MNIP), specific for intracellular synthesized NO. For the first time, an increased eNOS-dependent NO-production in HUVEC exposed to (-)-epicatechin was directly shown.

The data suggest that repeated intake of cocoa flavanols down-regulates arginase gene expression, thus improves the availability of the substrate arginine for eNOS, and increases eNOS activity. The elevated NO-availability modulates endothelial function and counteracts endothelial dysfunction.

Erythrocytes also produce NO and play an important role in the regulation of vascular tone. They contain both L-arginine metabolising enzymes, arginase and NOS. The effect of the consumption of a high-flavanol versus a low-flavanol cocoa beverage on erythrocyte arginase activity was investigated in a group of 20 healthy volunteers in a study with cross-over design. Intake of the high-flavanol cocoa was associated with a decrease in erythrocyte arginase activity. In contrast, the ingestion of the low-flavanol cocoa beverage did not change arginase activity.

The results of these *in vitro* and *in vivo* studies suggest that arginase is a target molecule of cocoa flavanols and that modulation of the L-arginine metabolism influences NO-availability and consequently endothelial function.

Inflammation and endothelial dysfunction are associated with the pathogenesis of cardiovascular diseases. Under inflammatory conditions the L-arginine metabolism is modified. Instead of eNOS and arginase the inducible NO-synthase (iNOS) and the cationic amino acid transporter 2B (CAT-2B) are expressed. NO is produced in high amounts leading to tissue damage. Cell culture experiments show that (-)-epicatechin and its metabolites lower mRNA-expression of iNOS and CAT-2B under inflammatory conditions, lowering NO-levels. The transcription factor NF- κ B plays a pivotal role in immune response and inflammation. Cell culture experiments demonstrate that (-)-epicatechin and its metabolites diminish NF- κ B activity. A reduced iNOS and CAT-2B mRNA-expression can be attributed to the decreased NF- κ B activity.

VII Literaturverzeichnis

Adam, W. B., Hardy, F. and Nierenstein, M. (1931) The Catechin of Cacao Bean. *J. Am. Chem. Soc.* 53, 727-728.

Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G., Jacobs, P. H., Kremers, B. G., Hammerstone, J. F., Rucker, R. B., Ritter, K. A. and Schmitz, H. H. (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 47, 4184-4188.

Aherne, S. A. and O'Brien, N. M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18, 75-81.

Al-Sa'doni, H. H., Megson, I. L., Bisland, S., Butler, A. R. and Flitney, F. W. (1997) Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol* 121, 1047-1050.

Alp, N. J. and Channon, K. M. (2004) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 413-420.

Alspach, G. (2007) The truth is often bittersweet: chocolate does a heart good. *Crit Care Nurse* 27, 11-15.

Angelo, S., Irarrazabal, C. and Deves, R. (1996) The binding specificity of amino acid transport system y^+L in human erythrocytes is altered by monovalent cations. *J Membr Biol* 153, 37-44.

Arnal, J. F., Munzel, T., Venema, R. C., James, N. L., Bai, C. L., Mitch, W. E. and Harrison, D. G. (1995) Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J Clin Invest* 95, 2565-2572.

Auger, C., Al-Awwadi, N., Bornet, A., Rouanet, J.-M., Gasc, F., Cros, G. and Teissedre, P.-L. (2004) Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Res Int* 37, 233-245.

Azizi, E., Dror, Y. and Wallis, K. (1970) Arginase activity in erythrocytes of healthy and ill children. *Clin Chim Acta* 28, 391-396.

Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T. and Terao, J. (2000) Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res* 33, 635-641.

Bachetti, T., Comini, L., Francolini, G., Bastianon, D., Valetti, B., Cadei, M., Grigolato, P., Suzuki, H., Finazzi, D., Albertini, A., Curello, S. and Ferrari, R. (2004) Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J Mol Cell Cardiol* 37, 515-523.

- Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1988)** Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 53, 211-217.
- Bansal, V. and Ochoa, J. B. (2003)** Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6, 223-228.
- Barbul, A. (1986)** Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *J Parenter Enteral Nutr* 10, 227-238.
- Batz, M., Korth, H. G., Meineke, P. and Sustmann, R. (1999)** Fluorescence detection of nitric oxide based on cheletropic spin traps. *Methods Enzymol* 301, 532-539.
- Bayard, V., Chamorro, F., Motta, J. and Hollenberg, N. K. (2007)** Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama. *Int J Med Sci* 4, 53-58.
- Beg, A. A., Finco, T. S., Nantermet, P. V. and Baldwin, A. S., Jr. (1993)** Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 13, 3301-3310.
- Berkowitz, D. E., White, R., Li, D., Minhas, K. M., Cernetich, A., Kim, S., Burke, S., Shoukas, A. A., Nyhan, D., Champion, H. C. and Hare, J. M. (2003)** Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 108, 2000-2006.
- Beruter, J., Colombo, J. P. and Bachmann, C. (1978)** Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes. *Biochem. J.* 175, 449-454.
- Bivalacqua, T. J., Hellstrom, W. J., Kadowitz, P. J. and Champion, H. C. (2001)** Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 923-927.
- Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Thiele, W., Junker, W., Alexander, K. and Frolich, J. C. (1997)** Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95, 2068-2074.
- Bor-Kucukatay, M., Wenby, R. B., Meiselman, H. J. and Baskurt, O. K. (2003)** Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H1577-1584.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990)** Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186, 343-355.
- Bravo, L. (1998)** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56, 317-333.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M. and Snyder, S. H. (1990)** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.

- Brunini, T. M., Yaqoob, M. M., Novaes Malagris, L. E., Ellory, J. C., Mann, G. E. and Mendes Ribeiro, A. C. (2003)** Increased nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport via system y⁺L. *Pflugers Arch* 445, 547-550.
- Buga, G. M., Singh, R., Pervin, S., Rogers, N. E., Schmitz, D. A., Jenkinson, C. P., Cederbaum, S. D. and Ignarro, L. J. (1996)** Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 271, H1988-1998.
- Buijsse, B., Feskens, E. J., Kok, F. J. and Kromhout, D. (2006)** Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med* 166, 411-417.
- Burchell, B., Brierley, C. H. and Rance, D. (1995)** Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* 57, 1819-1831.
- Butler, A. R. and Rhodes, P. (1997)** Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem* 249, 1-9.
- Cai, H. and Harrison, D. G. (2000)** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87, 840-844.
- Carnesecchi, S., Schneider, Y., Lazarus, S. A., Coehlo, D., Gosse, F. and Raul, F. (2002)** Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 175, 147-155.
- Celermajer, D. S., Sorensen, K. E., Georgakopoulos, D., Bull, C., Thomas, O., Robinson, J. and Deanfield, J. E. (1993)** Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88, 2149-2155.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T. (1995)** Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-1597.
- Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L. A., Power, D. A., Ortiz de Montellano, P. R. and Kemp, B. E. (1999)** AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443, 285-289.
- Cheng, Z., Radominska-Pandya, A. and Tephly, T. R. (1999)** Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos* 27, 1165-1170.
- Clementi, E., Sciorati, C., Riccio, M., Miloso, M., Meldolesi, J. and Nistico, G. (1995)** Nitric oxide action on growth factor-elicited signals. Phosphoinositide hydrolysis and [Ca²⁺]_i responses are negatively modulated via a cGMP-dependent protein kinase I pathway. *J Biol Chem* 270, 22277-22282.
- Closs, E. I. and Graf, P. (1999)** Cationic amino acid transporters (CATs). Targets for the manipulation of NO-synthase activity? *Pharm Biotechnol* 12, 229-249.

- Closs, E. I., Graf, P., Habermeier, A., Cunningham, J. M. and Forstermann, U. (1997)** Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 36, 6462-6468.
- Closs, E. I. and Mann, G. E. (1999)** Identification of carrier systems in plasma membranes of mammalian cells involved in transport of L-arginine. *Methods Enzymol* 301, 78-91.
- Clough, P. N., Trush, B.A (1967)** Mechanism of chemiluminescent reaction between nitric oxide and ozone. *Trans Faraday Soc* 63, 915-925.
- Colleluori, D. M., Morris, S. M., Jr. and Ash, D. E. (2001)** Expression, purification, and characterization of human type II arginase. *Arch Biochem Biophys* 389, 135-143.
- Cooke, J. P., Rossitch, E., Jr., Andon, N. A., Loscalzo, J. and Dzau, V. J. (1991)** Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88, 1663-1671.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L. and Williamson, G. (2008)** Cocoa and health: a decade of research. *Br J Nutr* 99, 1-11.
- Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. and Modolell, M. (1994)** Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174, 231-235.
- Cosby, K., Partovi, K. S., Crawford, J. H., Patel, R. P., Reiter, C. D., Martyr, S., Yang, B. K., Wacławiw, M. A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K. T., Shields, H., Kim-Shapiro, D. B., Schechter, A. N., Cannon, R. O., 3rd and Gladwin, M. T. (2003)** Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 9, 1498-1505.
- Coughtrie, M. W., Sharp, S., Maxwell, K. and Innes, N. P. (1998)** Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem Biol Interact* 109, 3-27.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C. and Remesy, C. (1999)** Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277, G120-126.
- Croft, K. D. (1998)** The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854, 435-442.
- Dawling, S., Roodi, N., Mernaugh, R. L., Wang, X. and Parl, F. F. (2001)** Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res* 61, 6716-6722.
- de Belder, A. J., MacAllister, R., Radomski, M. W., Moncada, S. and Vallance, P. J. (1994)** Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res* 28, 691-694.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H. B., Thannickal, V. J., Rajavashisth, T. B., Gimbrone, M. A., Jr., Shin, W. S. and Liao, J. K. (1995)** Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial

expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96, 60-68.

de Freitas, V. and Mateus, N. (2001) Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J Agric Food Chem* 49, 940-945.

De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N. H. and Vanhoutte, P. M. (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130, 963-974.

de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R. and DeLuca, M. (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7870-7873.

Dedio, J., Konig, P., Wohlfart, P., Schroeder, C., Kummer, W. and Muller-Esterl, W. (2001) NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J* 15, 79-89.

Dejam, A., Hunter, C. J., Schechter, A. N. and Gladwin, M. T. (2004) Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis* 32, 423-429.

Demougeot, C., Prigent-Tessier, A., Marie, C. and Berthelot, A. (2005) Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23, 971-978.

Denninger, J. W. and Marletta, M. A. (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411, 334-350.

Deprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C. and Scalbert, A. (2000) Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr* 130, 2733-2738.

Dillinger, T. L., Barriga, P., Escarcega, S., Jimenez, M., Salazar Lowe, D. and Grivetti, L. E. (2000) Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr* 130, 2057S-2072S.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A. M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.

Ding, E. L., Hutfless, S. M., Ding, X. and Girotra, S. (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab (Lond)* 3, 2.

Donovan, J. L., Bell, J. R., Kasim-Karakas, S., German, J. B., Walzem, R. L., Hansen, R. J. and Waterhouse, A. L. (1999) Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J Nutr* 129, 1662-1668.

Doyle, M. P. and Hoekstra, J. W. (1981) Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem* 14, 351-358.

Engler, M. B., Engler, M. M., Chen, C. Y., Malloy, M. J., Browne, A., Chiu, E. Y., Kwak, H. K., Milbury, P., Paul, S. M., Blumberg, J. and Mietus-Snyder, M. L.

(2004) Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 23, 197-204.

Erdman, J. W., Jr., Carson, L., Kwik-Urbe, C., Evans, E. M. and Allen, R. R. (2008) Effects of cocoa flavanols on risk factors for cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 17 Suppl 1, 284-287.

Feron, O., Michel, J. B., Sase, K. and Michel, T. (1998) Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 37, 193-200.

Fisher, N. D., Hughes, M., Gerhard-Herman, M. and Hollenberg, N. K. (2003) Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J. Hypertens.* 21, 2281-2286.

Fitzpatrick, D. F., Hirschfield, S. L., Ricci, T., Jantzen, P. and Coffey, R. G. (1995) Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J Cardiovasc Pharmacol* 26, 90-95.

Flynn, N. E., Meininger, C. J., Haynes, T. E. and Wu, G. (2002) The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother* 56, 427-438.

Foo, L. Y., Lu, Y., Howell, A. B. and Vorsa, N. (2000) The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli in vitro. *Phytochemistry* 54, 173-181.

Forstermann, U., Boissel, J. P. and Kleinert, H. (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12, 773-790.

Forstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. and Kleinert, H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23, 1121-1131.

Forsyth, W. G. (1955) Cacao polyphenolic substances. 3. Separation and estimation on paper chromatograms. *Biochem J* 60, 108-111.

Forsyth, W. G. and Quesnel, V. C. (1957) Cacao polyphenolic substances. 4. The anthocyanin pigments. *Biochem J* 65, 177-179.

Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.

Fulton, D., Gratton, J. P. and Sessa, W. C. (2001) Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299, 818-824.

Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. and Chesebro, J. H. (1992a)** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326, 242-250.
- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J. and Chesebro, J. H. (1992b)** The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 326, 310-318.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1998)** Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821-824.
- Garg, U. C. and Hassid, A. (1989)** Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83, 1774-1777.
- Geller, D. A. and Billiar, T. R. (1998)** Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 17, 7-23.
- Ghosh, D. K. and Stuehr, D. J. (1995)** Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 34, 801-807.
- Gladwin, M. T., Shelhamer, J. H., Schechter, A. N., Pease-Fye, M. E., Wacławski, M. A., Panza, J. A., Ognibene, F. P. and Cannon, R. O., III (2000)** Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11482-11487.
- Gosink, E. C. and Forsberg, E. J. (1993)** Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca^{2+} homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am J Physiol* 265, C1620-1629.
- Gotti, R., Furlanetto, S., Pinzauti, S. and Cavrini, V. (2006)** Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 1112, 345-352.
- Govers, R. and Rabelink, T. J. (2001)** Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F193-206.
- Gow, A. J., Luchsinger, B. P., Pawloski, J. R., Singel, D. J. and Stamler, J. S. (1999)** The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9027-9032.
- Grassi, D., Necozione, S., Lippi, C., Croce, G., Valeri, L., Pasqualetti, P., Desideri, G., Blumberg, J. B. and Ferri, C. (2005)** Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* 46, 398-405.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982)** Analysis of nitrate, nitrite, and $[^{15}\text{N}]$ nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126, 131-138.

- Green, S. J. and Nacy, C. A. (1993)** Antimicrobial and Immunopathologic Effects of Cytokine-Induced Nitric-Oxide Synthesis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 6, 384-396.
- Griffiths, L. A. (1982)** Mammalian metabolism of Flavonoids. In *The Flavonoids: Advances in Research* (Eds, Harborne, J. and Mabry, T.) Chapman and Hall, London, pp. 681-718.
- Grody, W. W., Argyle, C., Kern, R. M., Dizikes, G. J., Spector, E. B., Strickland, A. D., Klein, D. and Cederbaum, S. D. (1989)** Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia. Enzymatic, pathologic, and molecular analysis. *J Clin Invest* 83, 602-609.
- Gross, S. S. and Lane, P. (1999)** Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9967-9969.
- Halliwell, B. (1994)** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R. and Schmitz, H. H. (1999)** Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 47, 490-496.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A. and Schmitz, H. H. (2000)** Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* 130, 2086S-2092S.
- Harada, M., Kan, Y., Naoki, H., Fukui, Y., Kageyama, N., Nakai, M., Miki, W. and Kiso, Y. (1999)** Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 973-977.
- Haraguchi, Y., Takiguchi, M., Amaya, Y., Kawamoto, S., Matsuda, I. and Mori, M. (1987)** Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 412-415.
- Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H. and Yoshida, T. (2002)** Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry* 59, 749-758.
- Heiss, C., Dejam, A., Kleinbongard, P., Schewe, T., Sies, H. and Kelm, M. (2003)** Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *J Am Med Assoc* 290, 1030-1031.
- Heiss, C., Finis, D., Kleinbongard, P., Hoffmann, A., Rassaf, T., Kelm, M. and Sies, H. (2007)** Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J Cardiovasc Pharmacol* 49, 74-80.
- Heller, R., Munscher-Paulig, F., Grabner, R. and Till, U. (1999)** L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem* 274, 8254-8260.

- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y. and Baeuerle, P. A. (1993)** Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 365, 182-185.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. and Kromhout, D. (1993)** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.
- Hertog, M. G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S. and et al. (1995)** Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155, 381-386.
- Hertog, M. G., Sweetnam, P. M., Fehily, A. M., Elwood, P. C. and Kromhout, D. (1997)** Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 65, 1489-1494.
- Hirata, K., Shimada, K., Watanabe, H., Otsuka, R., Tokai, K., Yoshiyama, M., Homma, S. and Yoshikawa, J. (2004)** Black tea increases coronary flow velocity reserve in healthy male subjects. *Am J Cardiol* 93, 1384-1388, A1386.
- Hogg, N., Singh, R. J. and Kalyanaraman, B. (1996)** The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett* 382, 223-228.
- Hollenberg, K. (2006)** Vascular action of cocoa flavanols in humans: the roots of the story. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 Suppl 2, S99-102.
- Hollman, P. C. (1997)** Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr* 51 Suppl 1, S66-69.
- Hollman, P. C. and Katan, M. B. (1999)** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37, 937-942.
- Holt, R. R., Lazarus, S. A., Sullards, M. C., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., Hammerstone, J. F., Fraga, C. G., Schmitz, H. H. and Keen, C. L. (2002a)** Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* 76, 798-804.
- Holt, R. R., Schramm, D. D., Keen, C. L., Lazarus, S. A. and Schmitz, H. H. (2002b)** Chocolate consumption and platelet function. *J Am Med Assoc* 287, 2212-2213.
- Hurst, W. J., Tarka, S. M., Jr., Powis, T. G., Valdez, F., Jr. and Hester, T. R. (2002)** Cacao usage by the earliest Maya civilization. *Nature* 418, 289-290.
- Huynh, N. N. and Chin-Dusting, J. (2006)** Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 1-8.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. and Wood, K. S. (1987)** Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61, 866-879.

Iyamu, E. W., Cecil, R., Parkin, L., Woods, G., Ohene-Frempong, K. and Asakura, T. (2005) Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *Br. J. Haematol.* 131, 389-394.

Jalal, M. A. F. and Collin, H. A. (1977) Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *theobroma cacao*. *Phytochemistry* 116, 1377-1380.

Jansen, M. C., Bueno-de-Mesquita, H. B., Rasanen, L., Fidanza, F., Menotti, A., Nissinen, A., Feskens, E. J., Kok, F. J. and Kromhout, D. (1999) Consumption of plant foods and stomach cancer mortality in the seven countries study. Is grain consumption a risk factor? Seven Countries Study Research Group. *Nutr Cancer* 34, 49-55.

Janszky, I., Ericson, M., Blom, M., Georgiades, A., Magnusson, J. O., Alinagizadeh, H. and Ahnve, S. (2005) Wine drinking is associated with increased heart rate variability in women with coronary heart disease. *Heart* 91, 314-318.

Jenkinson, C. P., Grody, W. W. and Cederbaum, S. D. (1996) Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114, 107-132.

Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J. and Stamler, J. S. (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380, 221-226.

Jiang, M., Jia, L., Jiang, W., Hu, X., Zhou, H., Gao, X., Lu, Z. and Zhang, Z. (2003) Protein disregulation in red blood cell membranes of type 2 diabetic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 196-200.

Johnson, F. K., Johnson, R. A., Peyton, K. J. and Durante, W. (2005) Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1057-1062.

Kanno, K., Hirata, Y., Imai, T., Iwashina, M. and Marumo, F. (1994) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in rat vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 267, H2318-2324.

Kanyo, Z. F., Chen, C. Y., Daghigh, F., Ash, D. E. and Christianson, D. W. (1992) Crystallization and oligomeric structure of rat liver arginase. *J Mol Biol* 224, 1175-1177.

Kanyo, Z. F., Scolnick, L. R., Ash, D. E. and Christianson, D. W. (1996) Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 383, 554-557.

Karupiah, G., Xie, Q. W., Buller, R. M., Nathan, C., Duarte, C. and MacMicking, J. D. (1993) Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 261, 1445-1448.

Kavanaugh, M. P., Wang, H., Zhang, Z., Zhang, W., Wu, Y. N., Dechant, E., North, R. A. and Kabat, D. (1994) Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family. *J Biol Chem* 269, 15445-15450.

- Keen, C. L., Holt, R. R., Oteiza, P. I., Fraga, C. G. and Schmitz, H. H. (2005)** Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 298S-303S.
- Keli, S. O., Hertog, M. G., Feskens, E. J. and Kromhout, D. (1996)** Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med* 156, 637-642.
- Kelm, M. (1999)** Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1411, 273-289.
- Kim, H. and Keeney, P. G. (1984)** (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *J Food Sci* 49, 1090-1092.
- Kim, K. H., Moriarty, K. and Bender, J. R. (2008)** Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids* 73, 864-869.
- Kim, P. S., Iyer, R. K., Lu, K. V., Yu, H., Karimi, A., Kern, R. M., Tai, D. K., Cederbaum, S. D. and Grody, W. W. (2002)** Expression of the liver form of arginase in erythrocytes. *Mol. Genet. Metab.* 76, 100-110.
- Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P., Kabanova, S., Ozuyaman, B., Schnurch, H. G., Godecke, A., Weber, A. A., Robenek, M., Robenek, H., Bloch, W., Rosen, P. and Kelm, M. (2006)** Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107, 2943-2951.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. and Maatela, J. (1996)** Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 312, 478-481.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Helleovaara, M., Teppo, L., Pukkala, E. and Aromaa, A. (1997)** Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 146, 223-230.
- Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994)** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 (Pt 2), 249-258.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. and Nagano, T. (1998)** Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70, 2446-2453.
- Kondo, K., Hirano, R., Matsumoto, A., Igarashi, O. and Itakura, H. (1996)** Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet* 348, 1514.
- Kroemer, H. K. and Klotz, U. (1992)** Glucuronidation of drugs. A re-evaluation of the pharmacological significance of the conjugates and modulating factors. *Clin Pharmacokinet* 23, 292-310.
- Kubes, P., Suzuki, M. and Granger, D. N. (1991)** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4651-4655.
- Kühnau, J. (1976)** The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24, 117-191.

Kuhnle, G., Spencer, J. P., Schroeter, H., Shenoy, B., Debnam, E. S., Srai, S. K., Rice-Evans, C. and Hahn, U. (2000) Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 507-512.

Lancaster, J. R., Jr. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8137-8141.

Lazarus, S. A., Hammerstone, J. F. and Schmitz, H. H. (1999) Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. *Lancet* 354, 1825.

Li, H., Meininger, C. J., Hawker, J. R., Jr., Haynes, T. E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Morris, S. M., Jr. and Wu, G. (2001) Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E75-E82.

Li, H., Meininger, C. J., Kelly, K. A., Hawker, J. R., Jr., Morris, S. M., Jr. and Wu, G. (2002) Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R64-69.

Liew, F. Y., Li, Y., Severn, A., Millott, S., Schmidt, J., Salter, M. and Moncada, S. (1991) A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 21, 2489-2494.

Lim, H. K., Ryoo, S., Benjo, A., Shuleri, K., Miriel, V., Baraban, E., Camara, A., Soucy, K., Nyhan, D., Shoukas, A. and Berkowitz, D. E. (2007) Mitochondrial arginase II constrains endothelial NOS-3 activity. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 293, H3317-3324.

Lin, J. H., Chiba, M. and Baillie, T. A. (1999) Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev* 51, 135-158.

Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Dusterhoft, T., Baumann, G., Stangl, K. and Stangl, V. (2004) A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem* 279, 6190-6195.

Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Malinski, T., Mesaros, S., Patton, S. R. and Mesarosova, A. (1996) Direct measurement of nitric oxide in the cardiovascular system. *Physiol Res* 45, 279-284.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S-242S.

Mannisto, P. T. and Kaakkola, S. (1999) Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev* 51, 593-628.

Mao, T., Van De Water, J., Keen, C. L., Schmitz, H. H. and Gershwin, M. E. (2000) Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr* 130, 2093S-2099S.

Marletta, M. A. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78, 927-930.

Marsden, P. A., Schappert, K. T., Chen, H. S., Flowers, M., Sundell, C. L., Wilcox, J. N., Lamas, S. and Michel, T. (1992) Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 307, 287-293.

McMahon, T. J., Exton Stone, A., Bonaventura, J., Singel, D. J. and Solomon Stamler, J. (2000) Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin. *J Biol Chem* 275, 16738-16745.

McMahon, T. J., Moon, R. E., Luschinger, B. P., Carraway, M. S., Stone, A. E., Stolp, B. W., Gow, A. J., Pawloski, J. R., Watke, P., Singel, D. J., Piantadosi, C. A. and Stamler, J. S. (2002) Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* 8, 711-717.

Menotti, A., Kromhout, D., Blackburn, H., Fidanza, F., Buzina, R. and Nissinen, A. (1999) Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. The Seven Countries Study Research Group. *Eur J Epidemiol* 15, 507-515.

Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P. and Falkow, S. (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 127, 1529-1537.

Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D. and Michel, T. (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272, 15583-15586.

Michel, T. and Feron, O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100, 2146-2152.

Michels, V. V. and Beaudet, A. L. (1978) Arginase deficiency in multiple tissues in argininemia. *Clin Genet* 13, 61-67.

Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673-751.

Milne, R. W., Nation, R. L. and Somogyi, A. A. (1996) The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metab Rev* 28, 345-472.

- Ming, X. F., Barandier, C., Viswambharan, H., Kwak, B. R., Mach, F., Mazzolai, L., Hayoz, D., Ruffieux, J., Rusconi, S., Montani, J. P. and Yang, Z. (2004)** Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation* 110, 3708-3714.
- Moncada, S. and Higgs, E. A. (1991)** Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21, 361-374.
- Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. (1991)** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-142.
- Morris, C. R., Kato, G. J., Poljakovic, M., Wang, X., Blackwelder, W. C., Sachdev, V., Hazen, S. L., Vichinsky, E. P., Morris, S. M., Jr. and Gladwin, M. T. (2005)** Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *J Am Med Assoc* 294, 81-90.
- Morris, S. M., Jr., Bhamidipati, D. and Kepka-Lenhart, D. (1997)** Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 193, 157-161.
- Morrison, R. F. and Seidel, E. R. (1995)** Vascular endothelial cell proliferation: regulation of cellular polyamines. *Cardiovasc Res* 29, 841-847.
- Murphy, M. E. and Noack, E. (1994)** Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods Enzymol* 233, 240-250.
- Nakachi, K., Suemasu, K., Suga, K., Takeo, T., Imai, K. and Higashi, Y. (1998)** Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn J Cancer Res* 89, 254-261.
- Nakane, M., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Forstermann, U. and Murad, F. (1993)** Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316, 175-180.
- Nathan, C. (1992)** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051-3064.
- Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994a)** Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918.
- Nathan, C. and Xie, Q. W. (1994b)** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269, 13725-13728.
- Nelin, L. D., Chicoine, L. G., Reber, K. M., English, B. K., Young, T. L. and Liu, Y. (2005)** Cytokine-induced endothelial arginase expression is dependent on epidermal growth factor receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 394-401.
- Nussler, A. K. and Billiar, T. R. (1993)** Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54, 171-178.

O'Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Sly, W. S., O'Brien, N. M. and Williamson, G. (2001) Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett* 503, 103-106.

Osakabe, N., Baba, S., Yasuda, A., Iwamoto, T., Kamiyama, M., Takizawa, T., Itakura, H. and Kondo, K. (2001) Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res* 34, 93-99.

Ouyang, J., Hong, H., Shen, C., Zhao, Y., Ouyang, C., Dong, L., Zhu, J., Guo, Z., Zeng, K., Chen, J., Zhang, C. and Zhang, J. (2008) A novel fluorescent probe for the detection of nitric oxide in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 45, 1426-1436.

Pahl, H. L. and Baeuerle, P. A. (1997) The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci* 22, 63-67.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

Peiro, C., Redondo, J., Rodriguez-Martinez, M. A., Angulo, J., Marin, J. and Sanchez-Ferrer, C. F. (1995) Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 25, 748-751.

Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Muhl, H., Nitsch, D., Pluss, C. and Walker, G. (1996) Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase-potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell Biol Int* 20, 51-58.

Porter, L. J., Ma, Z. and Chan, B. G. (1991) Cacao Procyanidins: Major Flavonoids and Identification of some Minor Metabolites. *Phytochemistry* 30, 1657-1663.

Radomski, M. W., Rees, D. D., Dutra, A. and Moncada, S. (1992) S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 107, 745-749.

Radomski, M. W., Vallance, P., Whitley, G., Foxwell, N. and Moncada, S. (1993) Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res* 27, 1380-1382.

Ramiro, E., Franch, A., Castellote, C., Andres-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M. and Castell, M. (2005) Effect of Theobroma cacao flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br J Nutr* 93, 859-866.

Rassaf, T., Preik, M., Kleinbongard, P., Lauer, T., Heiss, C., Strauer, B. E., Feelisch, M. and Kelm, M. (2002) Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J. Clin. Invest.* 109, 1241-1248.

Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P. and Rice-Evans, C. A. (2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* 33, 220-235.

- Rein, D., Lotito, S., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H. and Fraga, C. G. (2000a)** Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 130, 2109S-2114S.
- Rein, D., Paglieroni, T. G., Pearson, D. A., Wun, T., Schmitz, H. H., Gosselin, R. and Keen, C. L. (2000b)** Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr* 130, 2120S-2126S.
- Reutov, V. P. and Sorokina, E. G. (1998)** NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry (Mosc)* 63, 874-884.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996)** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Enslen, M. and Offord, E. A. (1999)** Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr* 53, 22-26.
- Rimm, E. B., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J. and Willett, W. C. (1996)** Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 125, 384-389.
- Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazarus, S. A., Remesy, C., Scalbert, A. and Williamson, G. (2002)** Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr* 76, 1106-1110.
- Robinson, J. M. and Lancaster, J. R., Jr. (2005)** Hemoglobin-mediated, hypoxia-induced vasodilation via nitric oxide: mechanism(s) and physiologic versus pathophysiologic relevance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 257-261.
- Roholt, O. A., Jr. and Greenberg, D. M. (1956)** Liver arginase. IV. Effect of pH on kinetics of manganese-activated enzyme. *Arch Biochem Biophys* 62, 454-470.
- Roth, E. and Wessner, B. (2005)** L-arginine: an amino acid with multiple effects. *Wien Klin Wochenschr* 117, 666-672.
- Russell, W. C., Newman, C. and Williamson, D. H. (1975)** A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 253, 461-462.
- Ryoo, S., Lemmon, C. A., Soucy, K. G., Gupta, G., White, A. R., Nyhan, D., Shoukas, A., Romer, L. H. and Berkowitz, D. E. (2006)** Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. *Circ. Res.* 99, 951-960.
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P. and Rice-Evans, C. (1995)** Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322, 339-346.
- Salvemini, D., Settle, S. L., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P. (1995)** Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 114, 1171-1178.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press.

Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S. and Osawa, T. (1998) Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *J Agric Food Chem* 46, 454-457.

Sanbongi, C., Suzuki, N. and Sakane, T. (1997) Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro. *Cell Immunol* 177, 129-136.

Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacuera, C., Izquierdo-Pulido, M. and Lamuela-Raventós, R. M. (2003) Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J Mass Spectrom* 38, 35-42.

Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D. and Drilleau, J. P. (1999) Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *J Agric Food Chem* 47, 4847-4853.

Scalbert, A., Johnson, I. T. and Saltmarsh, M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 215S-217S.

Scalbert, A. and Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.

Schechter, A. N. and Gladwin, M. T. (2003) Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med* 348, 1483-1485.

Schroeder, P., Klotz, L. O. and Sies, H. (2003) Amphiphilic properties of (-)-epicatechin and their significance for protection of cells against peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 69-73.

Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H. H. and Kelm, M. (2006) (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1024-1029.

Scorza, G., Pietraforte, D. and Minetti, M. (1997) Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 22, 633-642.

Selmi, C., Mao, T. K., Keen, C. L., Schmitz, H. H. and Eric, G. M. (2006) The anti-inflammatory properties of cocoa flavanols. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47 Suppl 2, S163-S171.

Shima, Y., Maeda, T., Aizawa, S., Tsuboi, I., Kobayashi, D., Kato, R. and Tamai, I. (2006) L-arginine import via cationic amino acid transporter CAT1 is essential for both differentiation and proliferation of erythrocytes. *Blood* 107, 1352-1356.

Shimoi, K., Saka, N., Nozawa, R., Sato, M., Amano, I., Nakayama, T. and Kinae, N. (2001) Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab Dispos* 29, 1521-1524.

Sies, H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91, 31S-38S.

Sies, H., Schewe, T., Heiss, C. and Kelm, M. (2005) Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 304S-312S.

Singel, D. J. and Stamler, J. S. (2005) Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. *Annu Rev Physiol* 67, 99-145.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82, 1107-1112.

Sneddon, J. M. and Vane, J. R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2800-2804.

Spector, E. B., Rice, S. C., Kern, R. M., Hendrickson, R. and Cederbaum, S. D. (1985) Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mammals, primates, and man: evolution to high activity in primates. *Am J Hum Genet* 37, 1138-1145.

Spencer, J. P. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr* 133, 3255S-3261S.

Spencer, J. P., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E. and Rice-Evans, C. (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 236-241.

Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srai, S. K. and Rice-Evans, C. (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458, 224-230.

Spencer, J. P., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S. K., Tyrrell, R. M., Hahn, U. and Rice-Evans, C. (2001a) Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J* 354, 493-500.

Spencer, J. P., Schroeter, H., Rechner, A. R. and Rice-Evans, C. (2001b) Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antioxid Redox Signal* 3, 1023-1039.

Sperandeo, M. P., Borsani, G., Incerti, B., Zollo, M., Rossi, E., Zuffardi, O., Castaldo, P., Taglialatela, M., Andria, G. and Sebastio, G. (1998) The gene encoding a cationic amino acid transporter (SLC7A4) maps to the region deleted in the velocardiofacial syndrome. *Genomics* 49, 230-236.

Stamler, J. S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936.

Stamler, J. S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D. I., Keaney, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C. R. and Loscalzo, J. (1992a) Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7674-7677.

Stamler, J. S., Jia, L., Eu, J. P., McMahon, T. J., Demchenko, I. T., Bonaventura, J., Gernert, K. and Piantadosi, C. A. (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276, 2034-2037.

Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J. and Loscalzo, J. (1992b) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 444-448.

Starp, C., Alteheld, B. and Stehle, P. (2006) Characteristics of (+)-catechin and (-)-epicatechin transport across pig intestinal brush border membranes. *Ann Nutr Metab* 50, 59-65.

Steffen, Y., Gruber, C., Schewe, T. and Sies, H. (2008) Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 469, 209-219.

Stein, J. H., Keevil, J. G., Wiebe, D. A., Aeschlimann, S. and Folts, J. D. (1999) Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100, 1050-1055.

Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M. and Bogdan, C. (1994) Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med* 180, 783-793.

Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P. and Tukey, R. H. (1998) Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol* 54, 647-654.

Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P. and Tukey, R. H. (1999) UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology* 116, 149-160.

Suschek, C. V., Schnorr, O. and Kolb-Bachofen, V. (2004) The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? *Curr Mol Med* 4, 763-775.

Tarpey, M. M. and Fridovich, I. (2001) Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89, 224-236.

Taubert, D., Berkels, R., Roesen, R. and Klaus, W. (2003) Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *J Am Med Assoc* 290, 1029-1030.

Tedeschi, E., Menegazzi, M., Yao, Y., Suzuki, H., Forstermann, U. and Kleinert, H. (2004) Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α activation. *Mol Pharmacol* 65, 111-120.

Terao, J. (1999) Dietary flavonoids as antioxidants in vivo: conjugated metabolites of (-)-epicatechin and quercetin participate in antioxidative defense in blood plasma. *J Med Invest* 46, 159-168.

Thompson, P. I., Joel, S. P., John, L., Wedzicha, J. A., Maclean, M. and Slevin, M. L. (1995) Respiratory depression following morphine and morphine-6-glucuronide in normal subjects. *Br J Clin Pharmacol* 40, 145-152.

Tiihonen, J., Hallikainen, T., Lachman, H., Saito, T., Volavka, J., Kauhanen, J., Salonen, J. T., Ryyanen, O. P., Koulou, M., Karvonen, M. K., Pohjalainen, T., Syvalahti, E. and Hietala, J. (1999) Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Mol Psychiatry* 4, 286-289.

Tomas-Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerda, B., Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Ibarra, A., Pasamar, M. A., Ramón, D. and Espín, J. C. (2007) A New Process to Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3926-3935.

Traenckner, E. B., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S. and Baeuerle, P. A. (1995) Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* 14, 2876-2883.

Tsuchiya, H., Sato, M., Kato, H., T., O., Juneja, L. R. and Kim, M. (1997) Simultaneous determination of catechins in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 703, 253-258.

Vane, J. R., Anggard, E. E. and Botting, R. M. (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323, 27-36.

Vekony, N., Wolf, S., Boissel, J. P., Gnauert, K. and Closs, E. I. (2001) Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 40, 12387-12394.

Villiotou, V. and Deliconstantinos, G. (1995) Nitric oxide, peroxynitrite and nitroso-compounds formation by ultraviolet A (UVA) irradiated human squamous cell carcinoma: potential role of nitric oxide in cancer prognosis. *Anticancer Res* 15, 931-942.

- Vockley, J. G., Jenkinson, C. P., Shukla, H., Kern, R. M., Grody, W. W. and Cederbaum, S. D. (1996)** Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics* 38, 118-123.
- Wadkins, R. M. and Jovin, T. M. (1991)** Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry* 30, 9469-9478.
- Wan, Y., Vinson, J. A., Etherton, T. D., Proch, J., Lazarus, S. A. and Kris-Etherton, P. M. (2001)** Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 74, 596-602.
- Wang, J. F., Schramm, D. D., Holt, R. R., Ensunsa, J. L., Fraga, C. G., Schmitz, H. H. and Keen, C. L. (2000)** A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 130, 2115S-2119S.
- Wang-Polagruto, J. F., Villablanca, A. C., Polagruto, J. A., Lee, L., Holt, R. R., Schrader, H. R., Ensunsa, J. L., Steinberg, F. M., Schmitz, H. H. and Keen, C. L. (2006)** Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 2, S177-186; discussion S206-179.
- Waterhouse, A. L., Shirley, J. R. and Donovan, J. L. (1996)** Antioxidants in chocolate. *Lancet* 348, 834.
- Watzl, B. and Rechkemmer, G. (2001)** Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 48, 498-502.
- White, A. R., Ryoo, S., Li, D., Champion, H. C., Steppan, J., Wang, D., Nyhan, D., Shoukas, A. A., Hare, J. M. and Berkowitz, D. E. (2006)** Knockdown of arginase I restores NO signaling in the vasculature of old rats. *Hypertension* 47, 245-251.
- White, M. F., Gazzola, G. C. and Christensen, H. N. (1982)** Cationic amino acid transport into cultured animal cells. I. Influx into cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 257, 4443-4449.
- Williamson, G. and Manach, C. (2005)** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 81, 243S-255S.
- Wolf, S., Janzen, A., Vekony, N., Martine, U., Strand, D. and Closs, E. I. (2002)** Expression of solute carrier 7A4 (SLC7A4) in the plasma membrane is not sufficient to mediate amino acid transport activity. *Biochem J* 364, 767-775.
- Wolzt, M., MacAllister, R. J., Davis, D., Feelisch, M., Moncada, S., Vallance, P. and Hobbs, A. J. (1999)** Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity. *J Biol Chem* 274, 28983-28990.
- Wu, G. and Morris, S. M., Jr. (1998)** Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1), 1-17.

Xie, Q. and Nathan, C. (1994) The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* 56, 576-582.

Xu, W., Kaneko, F. T., Zheng, S., Comhair, S. A., Janocha, A. J., Goggans, T., Thunnissen, F. B., Farver, C., Hazen, S. L., Jennings, C., Dweik, R. A., Arroliga, A. C. and Erzurum, S. C. (2004) Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J* 18, 1746-1748.

Yang, C. S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D., Kuo, M. C. and Schantz, S. P. (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 351-354.

Yang, Z. and Ming, X. F. (2006) Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* 8, 54-59.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. and Vitzthum, F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32, e103.

VIII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ACN	Acetonitril
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
hCAT	humaner kationischer Aminosäuretransporter
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphat</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECGS/H	<i>Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
for	<i>forward</i>
x g	relativen Zentrifugalkraft (g = Erdbeschleunigung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
h	Stunde
hbFGF	<i>human basic Fibroblast Growth Factor</i>
HCl	Salzsäure
hEGF	<i>human Epidermal Growth Factor</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
H₂O	Wasser
H₃PO₄	Phosphorsäure
H₂SO₄	Schwefelsäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ISPF	α-Isonitrosopropiophenon

KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kJ	Kilojoule
M	Molar; mol/l
min	Minute
MnCl₂	Manganchlorid
MNIP	4-Methoxy-2-(1 <i>H</i> -naphtho[2,3- <i>d</i>]imidazol-2-yl)phenol
n	Anzahl der Versuchsreihen
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO₃	Natriumbicarbonat
Na₂HPO₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat gepufferte Salzsäure (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> oder <i>potentia Hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SRB	Sulforhodamin B
TAE	Tris Acetat EDTA-Lösung
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
v/v	Volumenprozent
w/o	Ohne (<i>without</i>)
w/v	Gewichtsprozent

2 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Dr. Helmut Sies für die Überlassung des überaus interessanten Themas und die ständige Förderung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wilhelm Stahl und Dr. Oliver Schnorr für die Unterstützung und guten Anregungen, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit sehr hilfreich waren.

Herrn Prof. Dr. Joachim Jose (Institut für Pharmazeutische Chemie) danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats und das Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Dr. Kwik Uribe (Mars Incorporated, Hackettstown, New Jersey, USA) danke ich für die Bereitstellung des Cocoapro® Kakao-Pulver, welches im Rahmen der humanen Interventionsstudie eingesetzt wurde.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Hagen Schroeter (UC Davis, Kalifornien, USA) für die Bereitstellung der *in vitro* verwendeten Kakao-Flavanole.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I für die gute Zusammenarbeit und das hervorragende Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt Tanja Protugall, die mir einen guten Einstieg in die Arbeit ermöglicht hat und mich auch während meiner Promotion durch ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und ihr aufmunterndes Wesen unterstützt hat. Danke! Heide Krahl danke ich herzlich für die Hilfe bei der Interventionsstudie und für das überaus lustige Miteinander. Weiterhin danke ich Peter Graf für die Durchführung der HPLC-Messungen. Kaya Lutter danke ich für die witzigen, aber auch ernsten Gespräche und die aufmunternden und mitfühlenden Worte während der Schreibphase. Bedanken möchte ich mich auch bei Tanja Wagener und Dr. Silke de Spirt für die angenehme Zusammenarbeit im Labor. Thomas Becher danke ich für die Unterstützung bei EDV-Problemen und für die tägliche Koffeinzufuhr. Marlies Scholtes danke ich für ihr Engagement in bürokratischen sowie organisatorischen Fragen. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Dr. Gunter Wagner bedanken, der sich immer für mich eingesetzt hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit immer tatkräftig unterstützt haben.

Meinen größten Dank möchte ich jedoch Andreas Gratz aussprechen, der immer an mich geglaubt hat und mir bei einer schweren Zeit zur Seite stand und in der Lage war mich aufzubauen und zu motivieren. Danke für das Verständnis und die unglaubliche Kraft, die du mir stets gegeben hast.

3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht (Veröffentlichungen nach §4 (3) der Promotionsordnung bleiben hiervon ausgenommen).

Düsseldorf, den 27.05.2009

.....

Tatjana Brossette