

---

**Die biologische Bedeutung des Flavonoids Epicatechin  
im Schutz vor Peroxynitrit**

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von Peter Schröder

aus Duisdorf

Düsseldorf 2002

---

---

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

Referent: Prof. Sies

Korreferent: Prof. Krause

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2002

---

---

Die biologische Bedeutung des Flavonoids Epicatechin im Schutz vor Peroxynitrit .....	1
1 Einleitung .....	1
1.1 Peroxynitrit .....	1
1.2 Signaleffekte von Peroxynitrit .....	4
1.3 Epicatechin.....	5
1.4 Ziel dieser Arbeit .....	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Reagenzien .....	9
2.1.1. Epicatechin und seine Oligomere	9
2.1.2. Peroxynitrit	10
2.1.3. Tyrosin und Tyrosinderivate	11
2.2 Epicatechin- und Peroxynitritbehandlung .....	12
2.3 Zellkultur .....	13
2.3.1. Behandlung der Zellen und Probennahme	13
2.3.2. Herstellung von wässrigem Zelllysate	13
2.4 Analytik .....	14
2.4.1. Charakterisierung von Substanzen	14
2.4.2. Bestimmung der Aktivität von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	14
2.4.3. Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen	14
2.4.4. Messung der Oxidation von 2,7-Dichlordihydrofluorescein	15
2.4.5. Bestimmung der Lipoxygenase-1-Aktivität	15
2.5 Proteingelelektrophorese.....	15
2.6 Immunochemische Methoden .....	16
2.6.1. Western-Blot	16
2.6.2. Dot-Blot	17
2.6.3. Quantifizierung	18
2.7 HPLC Methoden.....	18
2.7.1. Trennung von Epicatechin und den Produkten seiner Reaktion mit Peroxynitrit	18
2.7.2. Trennung und Quantifizierung der Reaktionsprodukte von Tyrosin bzw. BTBE und Peroxynitrit	18
2.8 Mikroskopische Untersuchungen.....	19
3 Ergebnisse: .....	20
3.1 Reaktion von (-)-Epicatechin mit Peroxynitrit .....	20
3.2 Zelluläre Aufnahme von (-)-Epicatechin.....	21
3.2.1. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von Epicatechin	22
3.2.2. Abnahme der Epicatechinkonzentration im Medium	23
3.2.3. Nachweis von Epicatechin in Zellen	23
3.3 (-)-Epicatechin: Schutz vor Peroxynitrit.....	24
3.3.1. Zellfreie Systeme	25
3.3.1.1 Schutz von Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase vor oxidativem Funktionsverlust und Nitrierung von proteingebundenen Tyrosinresten.....	25
3.3.1.2 Schutz von Lipoxygenase vor oxidativem Funktionsverlust und Nitrierung von proteingebundenen Tyrosinresten .....	26
3.3.1.3 Schutz von Zelllysate vor oxidativer Entleerung des Thiolpools und Nitrierung von proteingebundenen Tyrosinresten .....	28
3.3.1.4 Vergleich der Wirkung von Epicatechin in hydrophilen und hydrophoben Systemen .....	29
3.3.2. Zellkultur	32
3.3.2.1 Anwesenheit von Epicatechin: Schutz vor Oxidation und Nitrierung .....	32
3.3.2.2 Präinkubation mit Epicatechin: Schutz vor Oxidation und Nitrierung .....	34
3.3.3. Zusammenfassung: Schutz vor Peroxynitrit durch Epicatechin in den verwendeten Testsystemen	36

---

---

3.4	Einfluß von (-)-Epicatechin auf durch Peroxynitrit aktivierbare Signalwege.....	37
3.5	Vergleich der Fähigkeiten des Epicatechinmonomers mit seinen Oligomeren .....	39
4	Diskussion.....	41
4.1	Reaktion von Epicatechin und Peroxynitrit .....	41
4.2	Epicatechin wird von Endothelzellen aufgenommen.....	41
4.3	Epicatechin schützt besser gegen Tyrosinnitrierung als gegen die Oxidation anderer Zielmoleküle durch Peroxynitritbehandlung.....	42
4.4	Epicatechin schützt gleichermaßen gut gegen Tyrosinmodifikationen in hydrophilen und hydrophoben Umgebungen.....	43
4.5	Oligomere des Epicatechins besitzen eine dem Monomer vergleichbare Schutzwirkung.....	44
4.6	Bei der Aktivierung von Stresskinasen durch Peroxynitrit spielt die Nitrierung von Tyrosin keine Hauptrolle .....	45
4.7	Die biologische Bedeutung des Epicatechin – Einordnung dieser Arbeit .....	45
5	Zusammenfassung.....	47
6	Literatur.....	48
7	Anhang.....	59

---

---

## Abkürzungen:

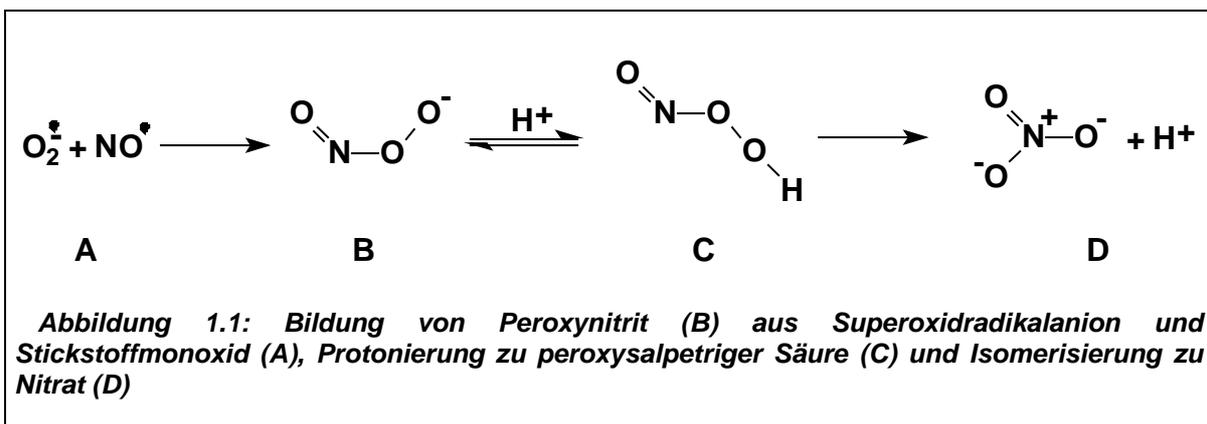
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BOC	<i>tert</i> -Butylpyrocarbonat
BTBE	N-t-BOC L-Tyrosin- <i>tert</i> -butylester
d.c.	Zerfallskontrolle (decomposition control)
DCDHF	2,7-Dichlordihydrofluorescein
DCF	2,7-Dichlorfluorescein
DLPC	1,2-Di-Lauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Epicatechin
ECGF	Endothelzellwachstumsfaktor
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LOX	Lipoxygenase
MAEC	Mausaortaendothelzellen
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PN	Peroxyinitrit
PSG	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Glucose
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tyr	Tyrosin

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Peroxynitrit

Peroxynitrit (Oxoperoxonitrat(1-)) ist ein potentes Oxidations- und Nitrierungsmittel, welches in einer diffusionskontrollierten Reaktion ( $k = 0,5 - 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; (Goldstein und Czapski, 1995; Huie und Padmaja, 1993; Kissner et al., 1997)) aus dem Superoxidradikalanion ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) und Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) gebildet wird (Abbildung 1.1). Die beiden Reaktionspartner entstehen während entzündlichen Prozessen durch erhöhte Aktivität von NADPH-Oxidase und NO-Synthase (für Übersichtsartikel siehe (Beckman, 1996; Radi et al., 2001)). Während das in der *cis*-Form vorliegende Anion relativ stabil und bei pH 12 und  $-80^\circ\text{C}$  mehrere Wochen haltbar ist, wird die durch Protonierung entstandene korrespondierende Säure ( $\text{pKs} = 6,8$  bei  $25^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$ , (Koppenol et al., 1992; Pryor und Squadrito, 1995)) deutlich instabiler; diese isomerisiert entweder zu Nitrat oder zerfällt in Hydroxyl- und Stickstoffdioxidradikale, die wiederum mit Biomolekülen reagieren können. Die Halblebensdauer von Peroxynitrit bei  $37^\circ\text{C}$  und pH 7,4 liegt bei ungefähr einer Sekunde.

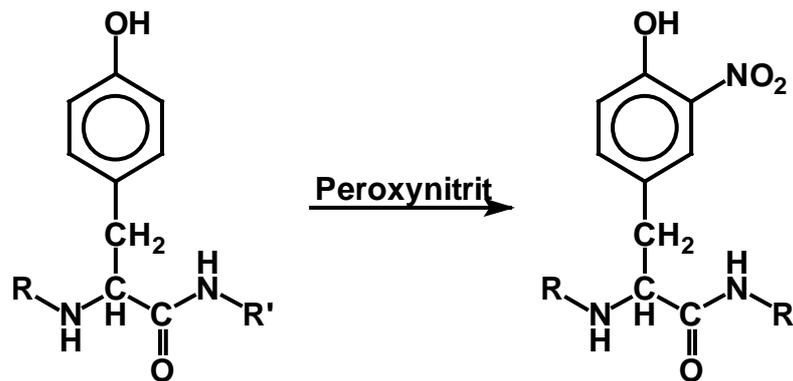


Im Organismus entsteht Peroxynitrit vor allem intravasal unter Beteiligung von Phagozyten, welche das Superoxidradikalanion und andere Sauerstoffradikale bilden, und Endothelialzellen, die das Stickstoffmonoxid generieren (Beckman et al., 1994). Insbesondere die erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid kontrolliert die

---

Peroxynitritbildung (Koppenol, 1998), da Stickstoffmonoxid um den Reaktionspartner Superoxidradikalanion mit den Superoxiddismutasen konkurrieren muß, welche die Dismutation von  $O_2^{\cdot -}$  zu  $O_2$  und  $H_2O_2$  katalysieren (McCord und Fridovich, 1969).

Peroxynitrit vermag mit jeder Klasse von Biomolekülen, z.B. DNA (Inoue und Kawanishi, 1987; Salgo et al., 1995), Proteinen (Grune et al., 2001; Ischiropoulos und Al-Mehdi, 1995), Lipiden (Radi et al., 1991), bestimmten Purinen (Douki und Cadet, 1996; Skinner et al., 1998) oder den Aminosäuren Tryptophan (Alvarez et al., 1996) und Tyrosin (Greenacre und Ischiropoulos, 2001; Ischiropoulos, 1998) zu reagieren und ist weiterhin in der Lage, nahezu ungehindert Zellmembranen zu passieren und so mit Zielmolekülen in der Membran und im Zellumen zu interagieren (Goss et al., 1999; Khairutdinov et al., 2000; Macfadyen et al., 1999; Marla et al., 1997). Besonderes Augenmerk gilt in dieser Arbeit der Wirkung des Peroxynitrits auf Proteine; hier treten sowohl Oxidationen als auch Nitrierungen auf, wobei Peroxynitrit unterschiedliche Reaktivität gegenüber verschiedenen Proteinen hat. So wird z.B. die Prostacyclinsynthase bereits bei sehr niedrigen Peroxynitritkonzentration nitriert und inaktiviert (Zou et al., 1997), wohingegen andere Proteine erst bei höheren Konzentrationen von Peroxynitrit nachweisbar modifiziert werden. Die Reaktivität von Peroxynitrit und damit seine Wirkung gegenüber einem bestimmten Protein ist nicht nur abhängig von Struktur und Zusammensetzung des Proteins, z.B. werden Tyrosinreste an der Moleküloberfläche in Nachbarschaft einer negativen Ladung leichter nitriert (Souza et al., 1999), sondern auch die (intrazelluläre) Konzentration, die Lokalisation des Zielmoleküls und Interaktionen mit anderen Molekülen sind von Bedeutung. So fördert z.B. die Cu/Zn-Superoxiddismutase die Nitrierung des Proteins Neurofilament-L (Crow et al., 1997). Als Marker für die Reaktion von Peroxynitrit mit einem Protein gilt neben anderen Modifikationen die Bildung des – immunologisch detektierbaren – 3-Nitrotyrosin (Abbildung 1.2) (Ischiropoulos, 1998), die höchstwahrscheinlich über die Zwischenstufe eines Tyrosylradikals abläuft (Zhang et al., 2001). Es sollte erwähnt werden, daß auch in Systemen ohne Peroxynitrit Nitrotyrosinbildung gezeigt werden konnte, zum einen in Hypochlorit/Nitrit-Systemen (Eiserich et al., 1996; Panasencko et al., 1997) und zum anderen in Peroxidase/Nitrit-Systemen (Kilinc et al., 2001; Pfeiffer et al., 2001).



**Abbildung 1.2: Peroxynitritbehandlung von Proteinen resultiert in der Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Tyrosin**

Weitere Beispiele für peroxynitritbedingte Proteinmodifikationen sind Oxidationen, z.B. von Sulfhydrylgruppen (Ischiropoulos und Al-Mehdi, 1995; Souza und Radi, 1998), oder, am Beispiel der Mn-Superoxiddismutase beschrieben, Oligomerisierungen (MacMillan-Crow und Thompson, 1999).

Die physiologische Bedeutung von Peroxynitrit liegt in der Abwehr von Mikroorganismen, aber auch körpereigene Zellen sind, gewissermaßen als „Kollateralschaden“, von den Auswirkungen des Peroxynitrit betroffen.

Die pathologische Auswirkung dessen wird z.B. bei sporadischem Morbus Parkinson deutlich, wo das durch Peroxynitrit geschädigte Protein  $\alpha$ -Synuclein (Bestandteil der Lewy-Körperchen) sich in der Zelle anreichert und dazu neigt, unlösliche Aggregate zu bilden (Paxinou et al., 2001).

Dieser Mechanismus wird auch für die Pathogenese einer Reihe weiterer neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert, für die alle eine Aggregation von unlöslichen Proteinen typisch ist, z.B. Morbus Alzheimer und Chorea Huntington (zur Übersicht siehe Layfield et al., 2001).

Da vor allem unter inflammatorischen Bedingungen massiv reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies wie Peroxynitrit freigesetzt werden, muß der Organismus gegen die unerwünschten Nebeneffekte geschützt werden. Die Möglichkeiten zum Schutz lassen sich nach ihrer Wirkung und ihrem Angriffspunkt in drei Kategorien unterteilen: Prävention, Intervention und Reparatur der Schäden (Arteel et al.,

---

1999). Prävention heißt im Falle von Peroxynitrit, dessen Bildung durch Verringerung der Konzentration an freiem Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\cdot$ ) und/oder Superoxidradikalanion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) zu verhindern. Die Senkung der Konzentration an freiem  $\text{NO}^\cdot$  kann entweder durch Abfangen des vorhandenen  $\text{NO}^\cdot$  (Hooper et al., 1997) oder durch Hemmung der NO-Synthasen (Matheis et al., 1992) geschehen. Dieselben Möglichkeiten zur Prävention der Peroxynitritbildung bieten sich auch bei  $\text{O}_2^{\cdot-}$ : Abbau des gebildeten  $\text{O}_2^{\cdot-}$  durch Superoxiddismutasen (White et al., 1994) oder Verringerung der Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies z.B. durch Allopurinol (White et al., 1996). Bereits entstandenes Peroxynitrit kann durch verschiedene Substanzen in seiner Wirkung durch Intervention, also z.B. durch „Scavenger“ oder anderweitige Entgiftung, unterdrückt werden, zum einen durch Proteine wie Myeloperoxidase (Floris et al., 1993) oder Glutathionperoxidase (Briviba et al., 1998; Sies et al., 1997), zum anderen durch niedermolekulare Substanzen wie  $\text{CO}_2$  (Denicola et al., 1996), Ascorbat (Bartlett et al., 1995), Ebselen (Masumoto et al., 1996) und Flavonoide (Arteel und Sies, 1999; De Groot und Rauen, 1998). Schließlich können durch Reparatursysteme bereits entstandene Schäden an Proteinen (da Silva und Abdalla, 1998; Graham et al., 1993) oder DNA (Epe et al., 1996) beseitigt werden.

## 1.2 Signaleffekte von Peroxynitrit

Neben seiner zellschädigenden Wirkung hat Peroxynitrit auch Einfluß auf zelluläre Signalwege (zur Übersicht siehe Klotz ,2002). Hinsichtlich möglicher Mechanismen der Aktivierung der Signalwege stellt sich die Frage ob, die nitrierende oder die oxidierende Wirkung von Peroxynitrit für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. So konnten z.B. Kong et al. (1996) zeigen, daß ein tyrosinnitriertes Oligopeptid im Gegensatz zum unnitrierten Oligopeptid nicht mehr durch die Kinase  $\text{p56}^{\text{Lck}}$  tyrosinphosphoryliert werden kann. Desweiteren ist fraglich, ob die Kinaseaktivierung nur auf einem Weg erfolgen kann oder, wie von Zhang et al. (2000) gezeigt, unabhängig über Einflußnahme auf verschiedene Stufen der Signalkaskade, welche zur Aktivierung einer bestimmten Kinase führt.

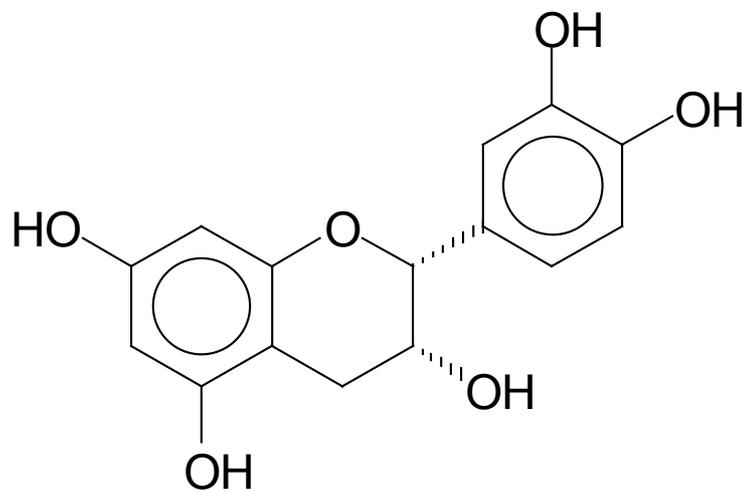
Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluß von Epicatechin auf die peroxynitritinduzierte Aktivierung verschiedener Kinasen untersucht, der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK; MAP-Kinasen) extrazellulär regulierte Kinase (ERK) 1 und

---

ERK2 und p38, sowie weiterhin der antiapoptotischen Kinase Akt (Proteinkinase B). Sowohl für die MAPK (Schieke et al., 1999) als auch für Akt (Klotz et al., 2000) konnte eine Aktivierbarkeit durch Peroxynitrit bereits gezeigt werden.

### 1.3 Epicatechin

Epicatechin (Abbildung 1.3) ist wie auch andere Flavonoide ein pflanzlicher Sekundärmetabolit, der über verschiedene Nahrungsmittel für den Menschen verfügbar ist.



**Abbildung 1.3:** (-)-Epicatechin: [2R,3R]-2-[3,4-Dihydroxyphenyl]-3,4-dihydro-2[2H]-benzopyran-3,5,7-triol

Die Flavonoide leiten sich alle von einem tricyclischen Grundgerüst (Abbildung 1.4) ab und lassen sich, basierend auf verschiedenen Substituentenpositionen und -kombinationen sowie unterschiedlichem Sättigungsgrad des C-Rings in verschiedene Klassen unterteilen: Flavone, Flavanone, Flavanole und Anthocyane.

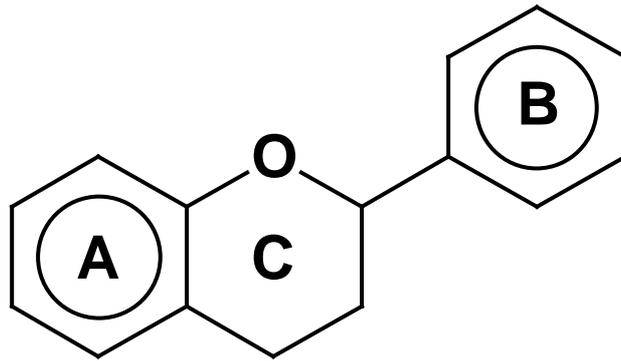


Abbildung 1.4: Grundgerüst der Flavonoide

Epicatechin gehört zu den Flavan-3-olen, welche in Position 3 des C-Ring eine Hydroxylgruppe tragen; sie kommen nicht ausschließlich als Monomere vor, sondern auch oligomerisiert als Proanthocyanidine, die im Falle von Epicatechin und Catechin Procyanidine genannt werden. Diese Procyanidine unterscheidet man in den  $4\beta \rightarrow 8$  verknüpften A-Typ und den in der Natur weitaus häufigeren,  $4\beta \rightarrow 6$  verknüpften B-Typ (Abbildung 1.5).

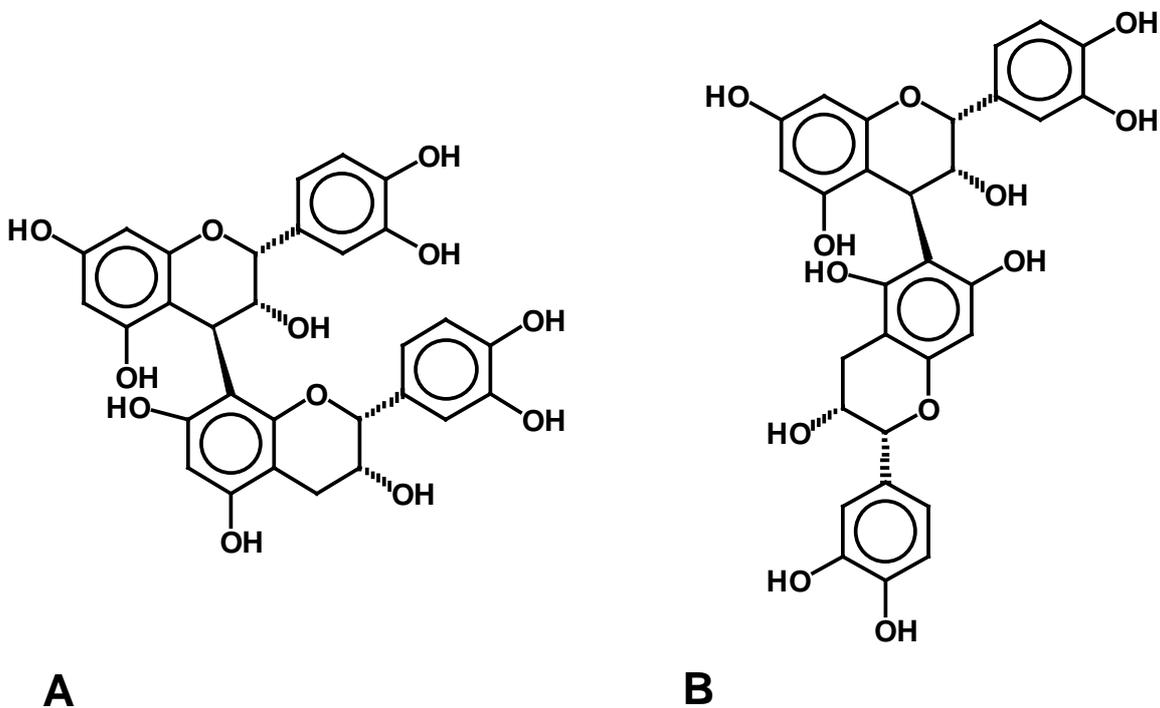


Abbildung 1.5: Strukturen der Oligomere (Procyanidine) des Epicatechin am Beispiel zweier Dimere. A:  $4\beta \rightarrow 8$  Dimer; B:  $4\beta \rightarrow 6$  Dimer.

---

Gute Quellen für Epicatechin und teilweise auch für seine Oligomere sind bestimmte Schokoladen, grüner Tee und Rotwein (Rein et al., 2000a; Scalbert und Williamson, 2000; Wang et al., 2000). Epicatechin und andere Flavonoide des Rotweins werden auch für das sogenannte „französische Paradox“ (Renaud und de Lorgeril, 2000) verantwortlich gemacht, welches die niedrige kardiovaskuläre Mortalität in mediterranen Populationen in Verbindung mit einem hohen Konsum an Rotwein und gesättigten Fettsäuren beschreibt (zur Übersicht siehe Formica und Regelson, 1995). Für Epicatechin ist bewiesen worden, daß es nach Aufnahme mit der Nahrung im Darm resorbiert werden kann (Carbonaro et al., 2001); für die Oligomere des Epicatechins ist dies noch nicht erschöpfend geklärt, da diese im Magensaft zu kleineren Einheiten (Monomeren und Dimeren) hydrolysiert werden sollen (Spencer et al., 2000).

Epicatechin bietet Schutz gegen Peroxynitrit sowohl im Sinne der Prävention, da es sowohl das Stickstoffmonoxid (van Acker et al., 1995) als auch das Superoxidradikalanion (Robak und Gryglewski, 1988) abfangen und so die Entstehung von Peroxynitrit verhindern kann, als auch im Sinne des Abfangens und Entgiftens entstandenen Peroxynitrits (Arteel und Sies, 1999). Auch die Oligomere des Epicatechins besitzen die Fähigkeit, Peroxynitrit abzufangen und so dessen Wirkung auf andere Moleküle zu verringern (Arteel et al., 2000). Die Effektivität, mit welcher Epicatechin *in vitro* Schutz gegen Peroxynitrit bietet, bewegt sich in derselben Größenordnung wie der Schutz, welchen die selenoorganische Substanz Ebselen bietet (Arteel et al., 2000; Arteel und Sies, 1999), welches mit Peroxynitrit mit einer Reaktionskonstanten von  $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  reagiert (Masumoto et al., 1996).

Weitere bekannte Wirkungen von Flavonoiden wie Epicatechin sind z.B. die Inhibition der 15-Lipoxygenase und der 5-Lipoxygenase (Schewe et al., 2001, Schewe et al., 2002), die Modulation der Plättchenaktivierung (Rein et al., 2000b) und der hemmende Einfluß auf Tumoren und ihre Ausbreitung (zur Übersicht siehe Middleton E Jr et al., 2000)

---

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der Bedeutung des Flavonoids Epicatechin im Schutz vor Peroxynitrit. Hierzu wurde zunächst untersucht, ob die beiden Substanzen miteinander chemisch reagieren und ob Epicatechin von Zellen aufgenommen werden kann. Im Anschluß daran wurde der Schutz, welchen Epicatechin vor Oxidation und Nitrierung durch Peroxynitrit bietet, in verschiedenen Testsystemen evaluiert. Die Schutzwirkung des Epicatechins wurde zunächst bei der Peroxynitritbehandlung isolierter Enzyme (GAPDH und LOX-1) und wässrigen Zellsatzs untersucht. Weiterführend wurde ermittelt, wie effektiv Epicatechin Tyrosin bzw. das Tyrosinanalogen BTBE in wässriger oder hydrophober Umgebung gegen Nitrierung und Oxidation durch Peroxynitrit schützt. Schließlich wurde die Schutzwirkung von Epicatechin gegen die Wirkungen des Peroxynitrit an murinen Aortaendothelzellen untersucht.

Weiterführend wurden auch Oligomere des Epicatechins in hydrophiler und hydrophober Umgebung hinsichtlich ihrer Schutzwirkung mit dem Monomer verglichen.

Die gewonnenen Erkenntnisse zum weitaus besseren Schutz vor Tyrosinnitrierung und Dimerisierung als vor anderen Effekten des Peroxynitrit wurde schließlich angewendet um die Bedeutung der peroxynitritinduzierten Tyrosinmodifikationen bei der Aktivierung verschiedener Stresskinasen durch Peroxynitrit zu untersuchen.

---

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Reagenzien**

Soweit nicht anders ausgewiesen, handelt es sich bei den verwendeten Substanzen, Flüssigkeiten und Lösungen um handelsübliche Chemikalien, welche bei Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) gekauft wurden. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt, welches auf einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) aufbereitet worden war.

Die benutzten Antikörper gegen phosphorylierte Kinasen (anti-phospho-Akt<sup>Ser473</sup>, anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38) stammten von Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA), der Antikörper gegen GAPDH stammt von Chemicon (Temecula, CA, USA). Der Antikörper gegen Nitrotyrosin stammt von Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Die sekundären Antikörper stammen von Sigma (Deisenhofen) und ICN (Costa Mesa, CA, USA).

#### **2.1.1 Epicatechin und seine Oligomere**

Das Epicatechin für die Experimente stammt aus grünem Tee (Sigma), die Procyanidinfraktionen wurden von Mars Inc. (Hackettstown, NJ, USA) aufgereinigt (Adamson et al., 1999; Hammerstone et al., 1999) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt, die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen ergibt sich aus Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1: Zusammensetzung (in Prozent) der Oligomerfraktionen, isoliert aus Cocoaprokakaopulver (Mars, Hackettstown, NJ)**

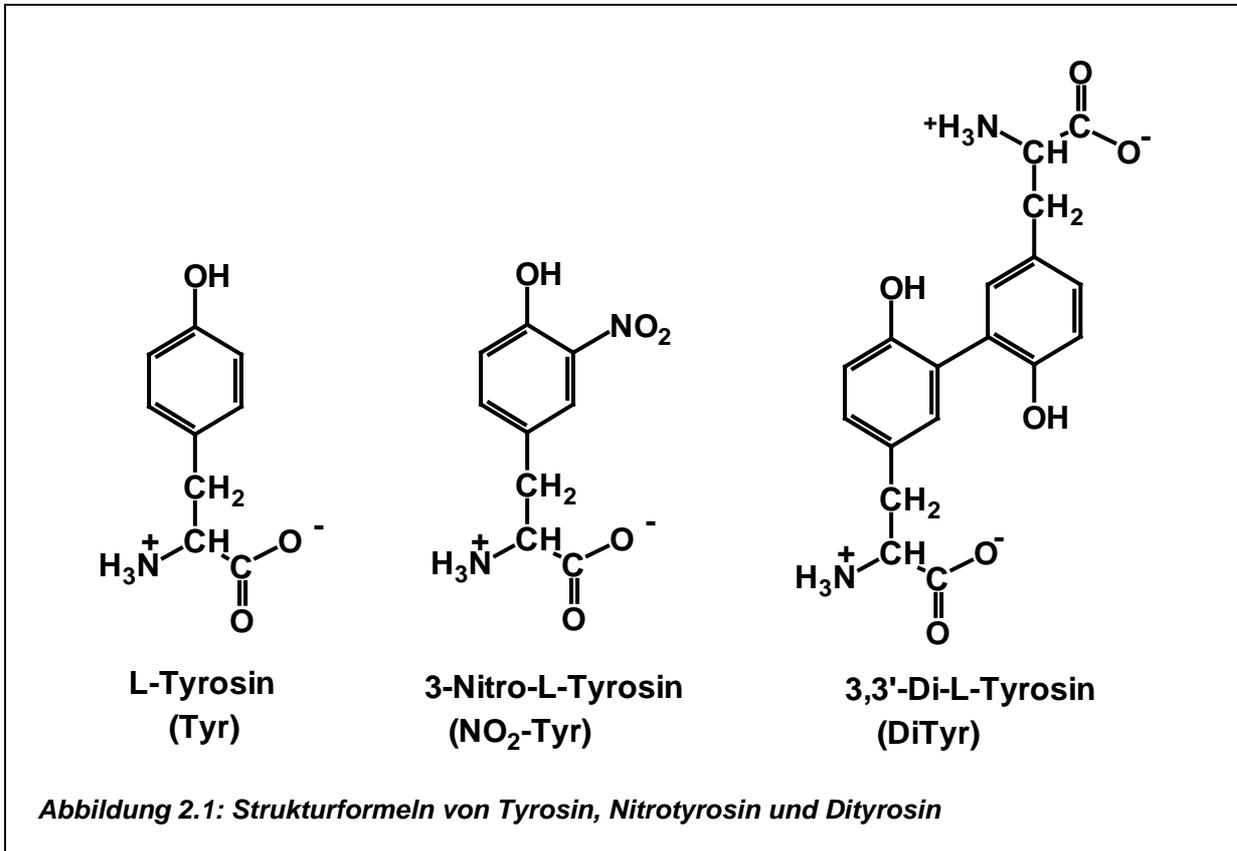
	Oligomerfraktion						
	Dimer	Trimer	Tetramer	Pentamer	Hexamer	Heptamer	Octamer
Monomer	1,0						
Dimer	<b>99,0</b>	5,2	0,5	0,3	0,2	0,4	0,3
Trimer		<b>94,8</b>	4,1	0,6	0,4	0,4	0,3
Tetramer			<b>95,4</b>	5,8	2,9	1,5	0,8
Pentamer				<b>92,0</b>	7,2	4,9	1,4
Hexamer				1,3	<b>86,2</b>	25,1	9,1
Heptamer					1,3	<b>61,0</b>	12,9
Octamer					0,8	2,8	<b>64,6</b>
Nonamer					1,0	3,9	10,6

### 2.1.2 Peroxynitrit

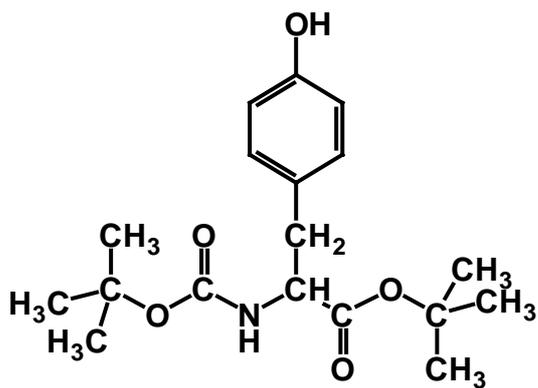
Die Synthese von Peroxynitrit erfolgte in einem „quenched-flow-reactor“, nach Koppenol et al. (1996). Dazu wurden je 125 mL Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$  0,6 M) und saure Wasserstoffperoxidlösung (1,2 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1,2 M HCl) mittels Peristaltikpumpen (Fluß: 34 mL / min) unter schnellem Rühren in 250 mL NaOH-Lösung mit Braunstein ( $\text{MnO}_2$ ) infundiert. Dabei wurden  $\text{NaNO}_2$  und die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung möglichst kurz vor Einlauf in die NaOH-Lösung in einer Y-förmigen Schlauchkupplung vereinigt. Nach Synthese wurden die Ansätze mindestens 30 min bei 4°C gerührt, um überschüssiges  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu entfernen. Anschließend wurde das verbliebene  $\text{MnO}_2$  abfiltriert und das erhaltene Peroxynitrit bei -80°C gelagert. Die Konzentrationen der resultierenden Peroxynitritlösungen lagen zwischen 20 mM und 100 mM, bestimmt durch photometrische Messung bei 302 nm ( $\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Lösungen höherer Konzentration wurden durch Ausfrieren der synthetisierten Peroxynitritlösung hergestellt, Verdünnungen wurden in 0,1 % (w/v) Kaliumhydroxidlösung angesetzt.

### 2.1.3 Tyrosin und Tyrosinderivate

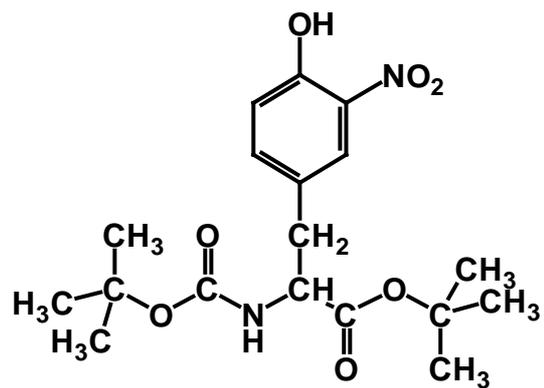
Tyrosin (Tyr) und 3-Nitrotyrosin ( $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ ) stammten von Sigma, Deisenhofen, Dityrosin (DiTyr) (Abbildung 2.1) wurde von Dr. Hao Zhang (Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA) nach (Malencik et al., 1996) hergestellt.



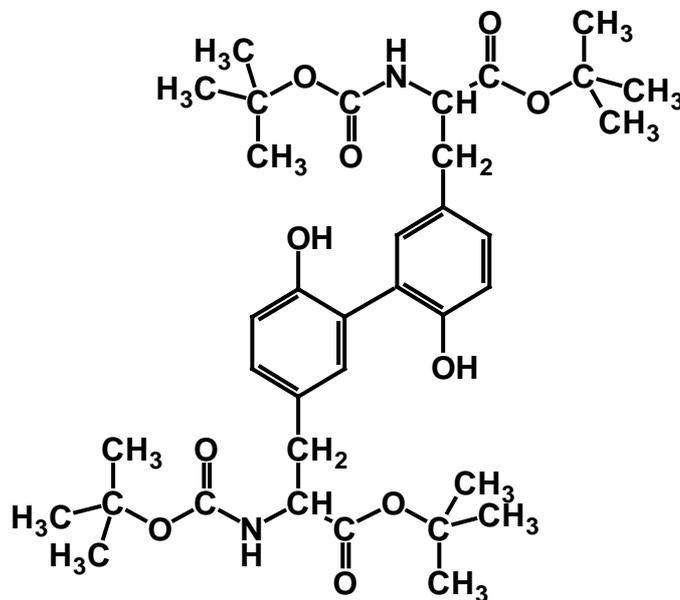
Die Synthese von N-t-BOC L-Tyrosin-*tert*-butylester (BTBE), 3-nitro-(N-t-BOC L-Tyrosin-*tert*-butylester) ( $\text{NO}_2\text{-BTBE}$ ), 3,3'-Di-(N-t-BOC L-Tyrosin-*tert*-butylester) (Di-BTBE) (Abbildung 2.2) erfolgte nach bekannten Prozeduren (Zhang et al., 2001) und wurde ebenfalls von Dr. Hao Zhang durchgeführt. Der Einbau von BTBE in 1,2-Di-Lauroyl-*sn*-glycero-3-Phosphatidylcholin-Liposomen (DLPC-Liposomen) geschah in mehreren Schritten: Methanolische BTBE-Lösung wurde mit DLPC in Methanol gemischt und im Stickstoffstrom eingetrocknet. Nach weiterer Trocknung über Nacht im Exsikkator wurden Lipide und BTBE in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,4 mit 100  $\mu\text{M}$  DTPA) aufgenommen. Unilaminare Liposomen wurden dann durch fünfmaliges Einfrieren / Auftauen in flüssigem Stickstoff und anschließende Druckextrusion (fünf Durchgänge) durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  Polycarbonatfilter (Nucleopore, Pleasanton, CA, USA) in einer Extrusionsapparatur (Lipex Biomembranes Inc, Vancouver, BC, USA) (Zhang et al., 2001) hergestellt.



N-t-BOC L-Tyrosin t-butyl ester  
(BTBE)



3-Nitro N-t-BOC L-Tyrosin t-butyl ester  
(NO<sub>2</sub>-BTBE)



3,3'-di N-t-BOC L-Tyrosin t-butyl ester  
(di-BTBE)

Abbildung 2.2: Strukturformeln von BTBE, seinem Nitroderivat, und dem Dimer

## 2.2 Epicatechin- und Peroxynitritbehandlung

Bei allen Experimenten, bei denen Epicatechin im Testansatz anwesend war, wurde aus einer 100-fach konzentrierten Epicatechinlösung in Methanol (maximal 100 mM) die Konzentration im Testansatz vor der Zugabe von Peroxynitrit einge-

---

stellt. Das somit eingebrachte Methanol (Endkonzentration 1% (v/v)) hatte in keinem der Fälle einen Einfluß auf das Testsystem.

Peroxynitrit wurde in allen Versuchen als einmaliger Bolus ins Testsystem gegeben; dabei wurde jeweils aus der Peroxynitritstammlösung (in 0,1 % (w/v) KOH ) 1:100 im Testansatz verdünnt. Zum Abpuffern des mit dem Peroxynitrit eingebrachten KOH wurden die Versuche in PSG-Puffer (100 mM Kaliumphosphat, 10 mM Natriumchlorid; 5 mM Glucose; pH 7,4) durchgeführt.

## **2.3 Zellkultur**

Die verwendeten primären murinen Aortaendothelzellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Christoph V. Suschek aus der immunologischen Arbeitsgruppe der Hautklinik im BMFZ (Prof. Victoria Kolb-Bachhofen) zur Verfügung gestellt. Die Verbrauchsmaterialien zur Zellkultur stammten von Greiner, Frickenhausen. Die Zellen wurden in RPMI-1640 Zellkulturmedium mit 20 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS; Greiner) und Endothelialzellwachstumsfaktor (ECGF; 1,8 µg / mL; Boehringer, Mannheim) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) Kohlendioxid herangezogen. Waren die Zellen nahezu konfluent, wurden sie für mindestens weitere 20 Stunden in Medium mit 20 % FCS, aber ohne ECGF inkubiert.

### **2.3.1 Behandlung der Zellen und Probennahme**

Die Behandlung von lebenden Zellen erfolgte in PSG-Puffer, nach vorherigem Waschen der Zellen mit PBS-Puffer. Nach Boluszugabe von Peroxynitrit und 5-minütiger Inkubation wurden die Zellen entweder direkt oder nach 30-minütiger Postinkubation mit serumfreiem Medium in 2x-Probenpuffer (4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 250 mM Tris-HCl; 0,2 % Bromphenolblau; 40 mM DTT; pH 6,8) lysiert, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und bis zur Weiterbehandlung bei -20°C gelagert.

### **2.3.2 Herstellung von wässrigem Zelllysat**

Wässriges Zelllysat von murinen Aortaendothelzellen wurde hergestellt, indem konfluente Zellen mit kaltem PBS, welches 2 mM PMSF und 1 µg/mL Leupeptin

---

enthielt geerntet wurden. Die Zellen wurden durch Sonifizieren und Einfrieren vollständig lysiert, das Lysat wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Versuche wurde 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand verwendet. Die Messungen der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte über die Verrechnung der Absorptionen bei 235 nm und 280 nm (Whitaker und Granum, 1980).

## **2.4 Analytik**

### **2.4.1 Charakterisierung von Substanzen**

Die UV / Vis-Spektren der Versuchsansätze mit Epicatechin und Peroxynitrit wurden in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) auf einem Lambda-2 Spektrophotometer (Perkin-Elmer, Freiburg) aufgenommen.

### **2.4.2 Bestimmung der Aktivität von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase**

Die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase wurde nach Souza und Radi (1998) bestimmt. Isolierte GAPDH wurde zum Testpuffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM Natriumarsenat; 0,1 mM DTPA; 1 mM  $\text{NAD}^+$ , pH 8,5) hinzugegeben und die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Endkonzentration 1 mM) gestartet. Anhand der Extinktionszunahme bei 340 nm (Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu NADH;  $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in den ersten 30 s der Reaktion wurde die Enzymaktivität berechnet. Die Messungen der GAPDH-Aktivität wurden von Herrn Dipl.-Biol. Darius P. Buchczyk durchgeführt.

### **2.4.3 Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen**

Thiolgruppen wurden nach der Methode von (Ellman, 1959) in Zelllysaten durch Zugabe von 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) bestimmt. Zur Ermittlung der Thiolkonzentration wurde das hierbei entstehende Thionitrobenzoat ( $\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei 412 nm gemessen.

---

#### **2.4.4 Messung der Oxidation von 2,7-Dichlordihydrofluorescein**

Zur Messung der Oxidation von 2,7-Dichlordihydrofluorescein (DCDHF) zu 2,7-Dichlorfluorescein (DCF) in lebenden Zellen wurden diese zunächst für eine Stunde auf 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert und mit 100 µM 2,7-Dichlordihydrofluoresceindiacetat in RPMI-1640 Zellkulturmedium inkubiert, wobei die Esterbindungen durch zelluläre Esterasen hydrolysiert werden, wodurch das entstandene DCDHF am Verlassen der Zellen gehindert wird. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und behandelt. Unmittelbar nach der Behandlung wurde die Fluoreszenz des entstandenen DCF (Anregung 485 nm; Emission 535 nm; in einem Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac, Freiburg) gemessen.

#### **2.4.5 Bestimmung der Lipoxygenase-1-Aktivität**

Die Aktivität der Sojabohnen-Lipoxygenase-1 (6 nM; Sigma) wurde über den Sauerstoffumsatz des Enzyms (Oxygenmeter 781, Strathkelvin Instruments, Glasgow, GB) in luft-äquilibriertem 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) gemessen. Diese Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Schewe und Herrn Christian D. Sadik durchgeführt.

### **2.5 Proteingelelektrophorese**

Die eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele entsprechen den Vorgaben von Laemmli (1970) und Towbin et al. (1979):

Trenngel (12% Acrylamid): 4%(v/v) Lösung 1; 2,5% (v/v) Lösung 2; 3,5% (v/v) H<sub>2</sub>O;  $7 \times 10^{-3}$  % (v/v) APS;  $7 \times 10^{-4}$  % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED);

Sammelgel (4% Acrylamid): 1,34% (v/v) Lösung 1; 3% (v/v) Lösung 3; 5,66% (v/v) H<sub>2</sub>O;  $7,5 \times 10^{-3}$  % (v/v) APS;  $7,5 \times 10^{-4}$  % (v/v) TEMED.

Zusammensetzung der einzelnen Lösungen:

Lösung 1: 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

---

Lösung 2: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA); pH 8,8

Lösung 3: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA); pH 6,8

Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8

APS: 10-12% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Die 1 mm dicken Gele wurden in zwei Schritten hergestellt, im ersten Schritt wurde das Trenngel gegossen und während des Polymerisierens mit Isopropanol überschichtet, im zweiten Schritt wurde das Sammelgel gegossen. Fertige Gele sind im Kühlschrank mehrere Tage haltbar. Die Gelläufe wurden in Novex-Minigel-Kammern (Novex, Frankfurt) durchgeführt.

Proben wurden zunächst in 2x-Probenpuffer nach Laemmli (4 % SDS, 20 % Glycerin, 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2 % Bromphenolblau, 40 mM DTT) aufgenommen. Nach Beladen der Geltaschen mit 5 – 40 µL Probe erfolgte der Gellauf stromkontrolliert mit 70 mA pro Gel in Elektrophoresepuffer (0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8) für ca. 60 Minuten, bis das Bromphenolblau aus dem Gel austrat.

## **2.6 Immunochemische Methoden**

### **2.6.1 Western-Blot**

Im Anschluß an die Auftrennung der Proteine per SDS-PA-Gelelektrophorese wurden die Proteine per Elektrotransfer auf PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid; Amersham, Buckinghamshire, GB) übertragen. Dies geschah nach kurzem Aktivieren der Membran in Methanol und anschließendem Äquilibrieren von Gel und Membran in Transferpuffer (25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5) in einer Semi-Dry-Blotting Apparatur (Pharmacia-Multiphor-Kammer; Pharmacia, Freiburg) für mindestens 60 Minuten stromreguliert bei 100 mA pro Minigel (Richtwert:  $0.8 \text{ mA/cm}^2$  für 1-2 h, die Spannung übersteigt hierbei keine 15 V). Anschließend wurde der Transfer durch Anfärben der Membran mit Coomassie-Färbelösung (0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R; 10% (v/v) Essigsäure; 40%

---

(v/v) Methanol) und teilweiser Entfärbung (Entfärbelösung: 10% Essigsäure; 30% Methanol o. Ethanol) wobei Proteinbanden blau sichtbar wurden, verifiziert.

Nun wurde die Membran durch einstündige Inkubation mit einer 5%igen Lösung von fettfreiem Milchpulver (Biorad, Hercules, CA, USA) in TBST („Tris buffered saline with Tween“; 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6 + 0,1% (v/v) Tween-20) abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe 2.1), ebenfalls in 5% Lösung von Milchpulver in TBST, entweder für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran dreimal jeweils fünf Minuten mit TBST gewaschen, bevor sie mit dem passenden sekundären Antikörper wiederum für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach nochmaligem Waschen wurden die Membran für 10 Minuten mit „ECL+“ (Amersham) inkubiert, welches von der an den jeweiligen sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase umgesetzt wird, wobei Chemilumineszenz entsteht. Diese wurde im Anschluß zur Belichtung eines geeigneten Films (Amersham) genutzt.

Sollten mehrere verschiedene Immunodetektionen nacheinander durchgeführt werden, so wurde die Membran nach der Belichtung des Films kurz mit TBST gewaschen, dann 30 Minuten bei 55°C in Stripping-Puffer (100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8) inkubiert, um die gebundenen Antikörper zu entfernen, mehrfach mit TBST gewaschen und schließlich wie oben beschrieben, angefangen mit dem Blockieren der Membran, behandelt.

### **2.6.2 Dot-Blot**

Zur Untersuchung von nicht per Gelelektrophorese aufgetrennten Proben auf Nitrierung der Aminosäure Tyrosin wurde die entsprechende Probe in SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe oben) aufgenommen, ein kleines Volumen (1 – 2  $\mu$ L) auf trockene Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel) überführt und nach dem Eintrocknen der Probe analog zum Vorgehen beim Western-Blot weiterbehandelt.

---

### **2.6.3 Quantifizierung**

Die Quantifizierung der Signale auf den aus Western-Blot oder Dot-Blot stammenden Filmen wurde mittels densitometrischer Auswertung mit Hilfe des Programms „ScanPack 3.0“ (Biometra, Göttingen) vorgenommen.

## **2.7 HPLC Methoden**

### **2.7.1 Trennung von Epicatechin und den Produkten seiner Reaktion mit Peroxynitrit**

Die chromatographische Trennung der Reaktionsprodukte von Epicatechin und Peroxynitrit erfolgte mit 1 mL Probenvolumen über eine C18 Reversed-Phase-Chromatographiesäule (Merck, Darmstadt), die mobile Phase war ein diskontinuierlicher Gradient von 10 mM Phosphatpuffer und Acetonitril (Zeitpunkt (min) / % Acetonitril: 0/0; 5/0; 35/10; 50/20; 60/20; 65/0). Das Elutionsprofil wurde nach der Absorption bei 280 nm erstellt. Zur Bestimmung der Epicatechinkonzentration wurden die Proben aufgetrennt, die so erlangten Elutionsprofile durch Auswertung der Flächen unter den Kurven quantifiziert und die Epicatechinkonzentrationen ausgehend von adäquaten Standardmessungen berechnet.

### **2.7.2 Trennung und Quantifizierung der Reaktionsprodukte von Tyrosin bzw. BTBE und Peroxynitrit**

Die Experimente zur Wirksamkeit von Epicatechin in hydrophiler und hydrophober Umgebung wurden im Free Radical Research Center des Medical College of Wisconsin in Milwaukee, WI, USA, mit freundlicher Unterstützung von Dr. Hao Zhang und Prof. Dr. Balaraman Kalyanaraman durchgeführt.

Die Trennung und Quantifizierung wurde nach Zhang et al. (2001) wie folgt vorgenommen: Tyrosin, 3-Nitrotyrosin und Dityrosin aus Experimenten mit wässrigem Tyrosin, Epicatechin und Peroxynitrit wurden mittels einer mobilen Phase von Methanol und Phosphatpuffer (50 mM, pH 3,0) (4% / 96%) auf einer C18 Reversed-Phase-Säule (Partisil ODS-3, 250 mm x 4,6 mm; Alltech, Nicholasville, KY, USA) aufgetrennt. Die Konzentration von Tyrosin und 3-Nitrotyrosin wurden per

---

UV-Detektion (280 nm) verfolgt, während die Dityrosinkonzentration über Fluoreszenzdetektion (Anregung 284 nm, Emission 410 nm) gemessen wurde. Peroxynitrit-behandelte BTBE-Proben wurden zunächst mit Chloroform (Trichlormethan,  $\text{CHCl}_3$ ) extrahiert und nach Trocknen im Stickstoffstrom in HPLC Laufpuffer (70 % Methanol, 30 % 15 mM Phosphatpuffer, pH 3,0) resuspendiert. Die Trennung wurde ebenfalls auf einer C18 Reversed-Phase-HPLC-Säule durchgeführt, BTBE und sein Nitroderivat  $\text{NO}_2$ -BTBE wurden bei 280 nm, Di-BTBE wurde über Fluoreszenz (Anregung 294 nm, Emission 401 nm) detektiert. Die Quantifizierung wurde in allen Fällen anhand von Standardreihen über die Fläche der Elutionssignale vorgenommen.

## **2.8 Mikroskopische Untersuchungen**

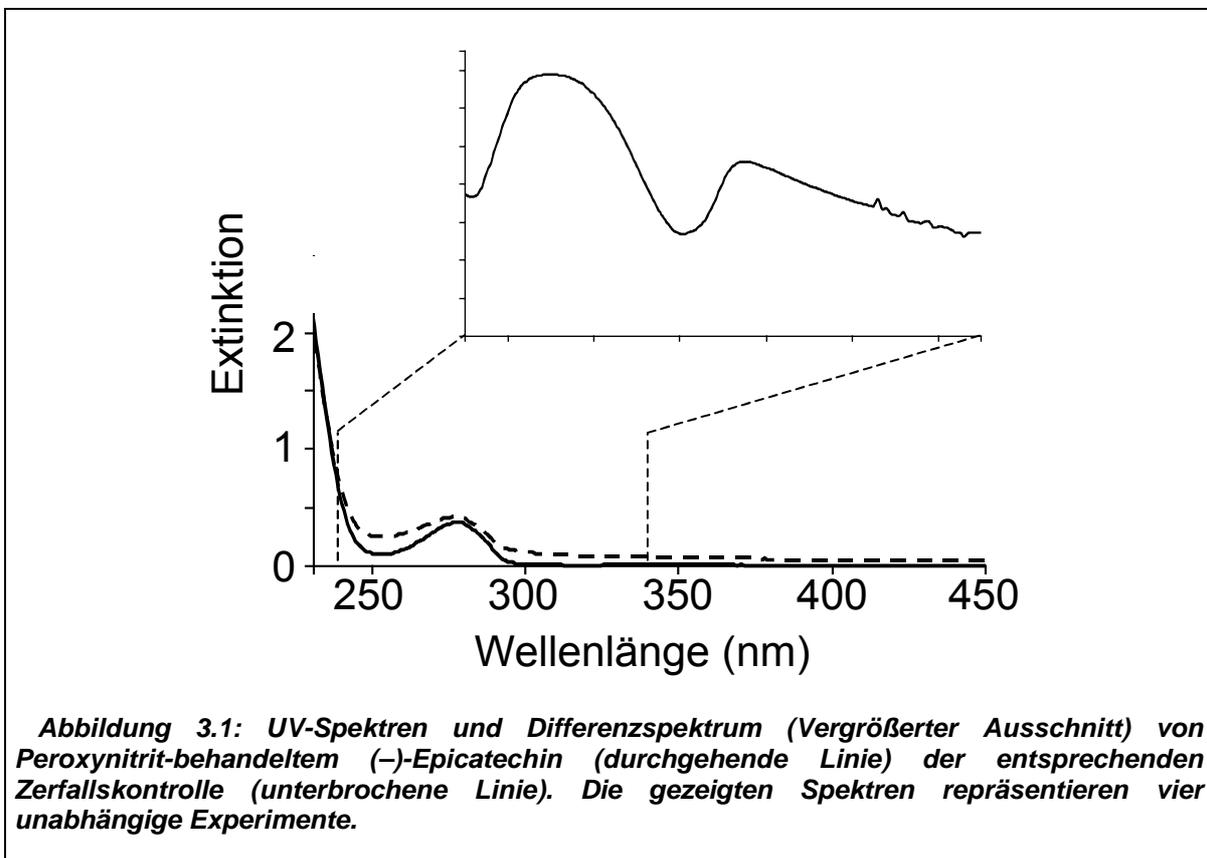
Die Aufnahmen von Zellen mit DCF wurden an einen Zeiss Axiovert 100 TV Mikroskop (Zeiss, Göttingen) mit einer Hamamatsu C4742-95 Digitalkamera und der Software AquaCosmos (Hamamatsu, Herrsching) erstellt. Um Photooxidation der Proben hierbei zu vermeiden, wurden diese außer für die Aufnahmen weitgehend im Dunkeln gelagert.

---

### 3 ERGEBNISSE:

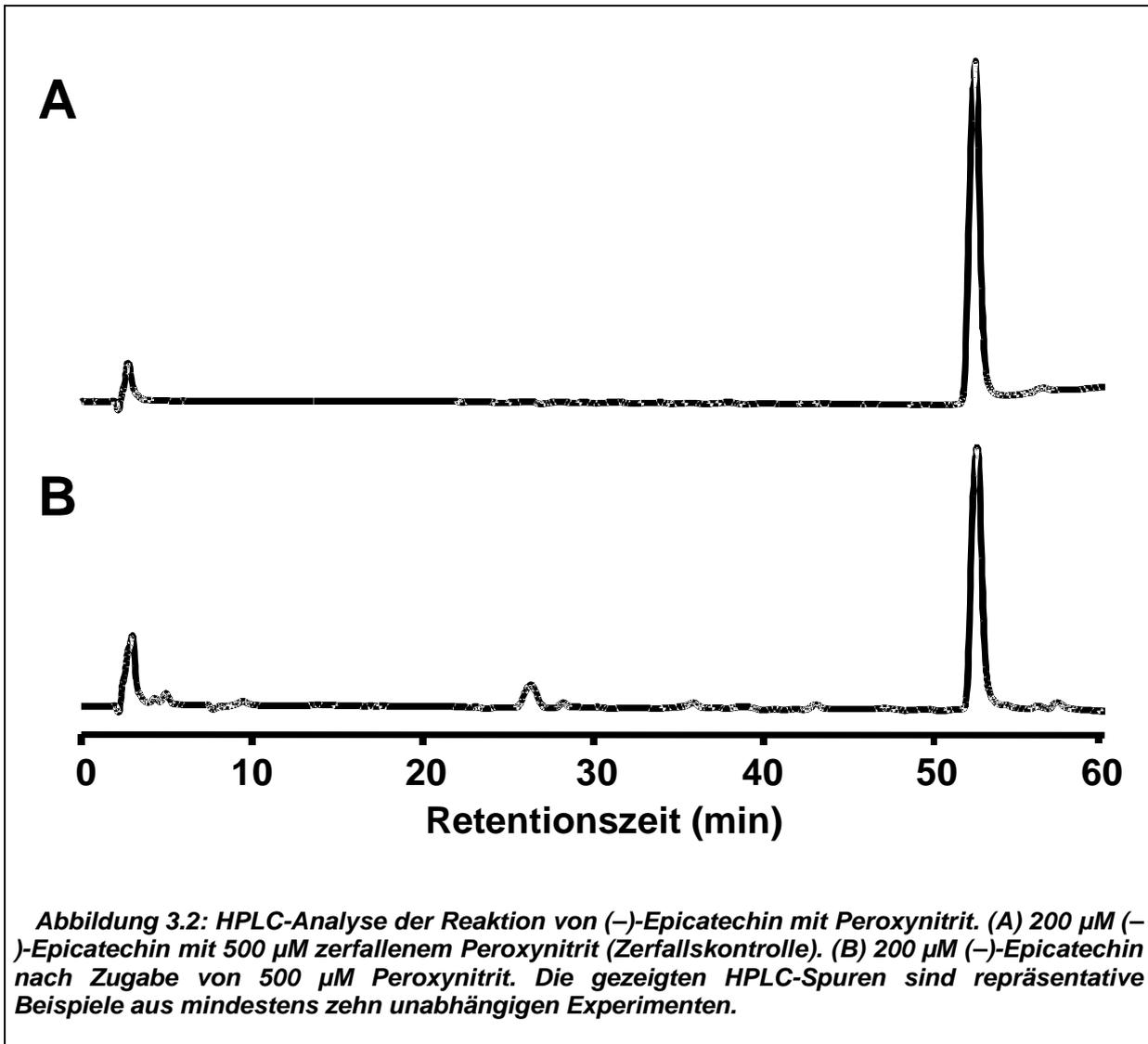
#### 3.1 Reaktion von (–)-Epicatechin mit Peroxynitrit

Zur Charakterisierung der Eigenschaften von (–)-Epicatechin in Bezug auf Peroxynitrit und dessen Wirkungen wurde zunächst untersucht, ob (–)-Epicatechin und Peroxynitrit miteinander reagieren. Nach Umsetzung von 200 µM (–)-Epicatechin mit 500 µM Peroxynitrit per Bolusaddition zeigte sich sowohl im UV/Vis-Spektrum als auch in der HPLC-Analyse, daß eine Reaktion stattgefunden hatte.



Der direkte Vergleich der UV/Vis-Spektren der Zerfallskontrolle ((–)-Epicatechin mit zerfallenem Peroxynitrit) und des peroxynitritbehandelten Epicatechins als auch das resultierende Differenzspektrum (Abbildung 3.1) belegen, daß eine Umsetzung stattgefunden hat. Der weitergehende Vergleich per HPLC-Analyse (Abbildung 3.2) bestätigt das vorangehende Ergebnis und deckt auf, daß durch die Reaktion mit Peroxynitrit ein Teil des (–)-Epicatechins (Retentionszeit 53 Minuten) umgesetzt

wird und mehrere Produkte entstehen, deren Peaks (Retentionszeiten: 5; 10; 27; 36; 43 und 58 Minuten) in der HPLC-Spur zu sehen sind.

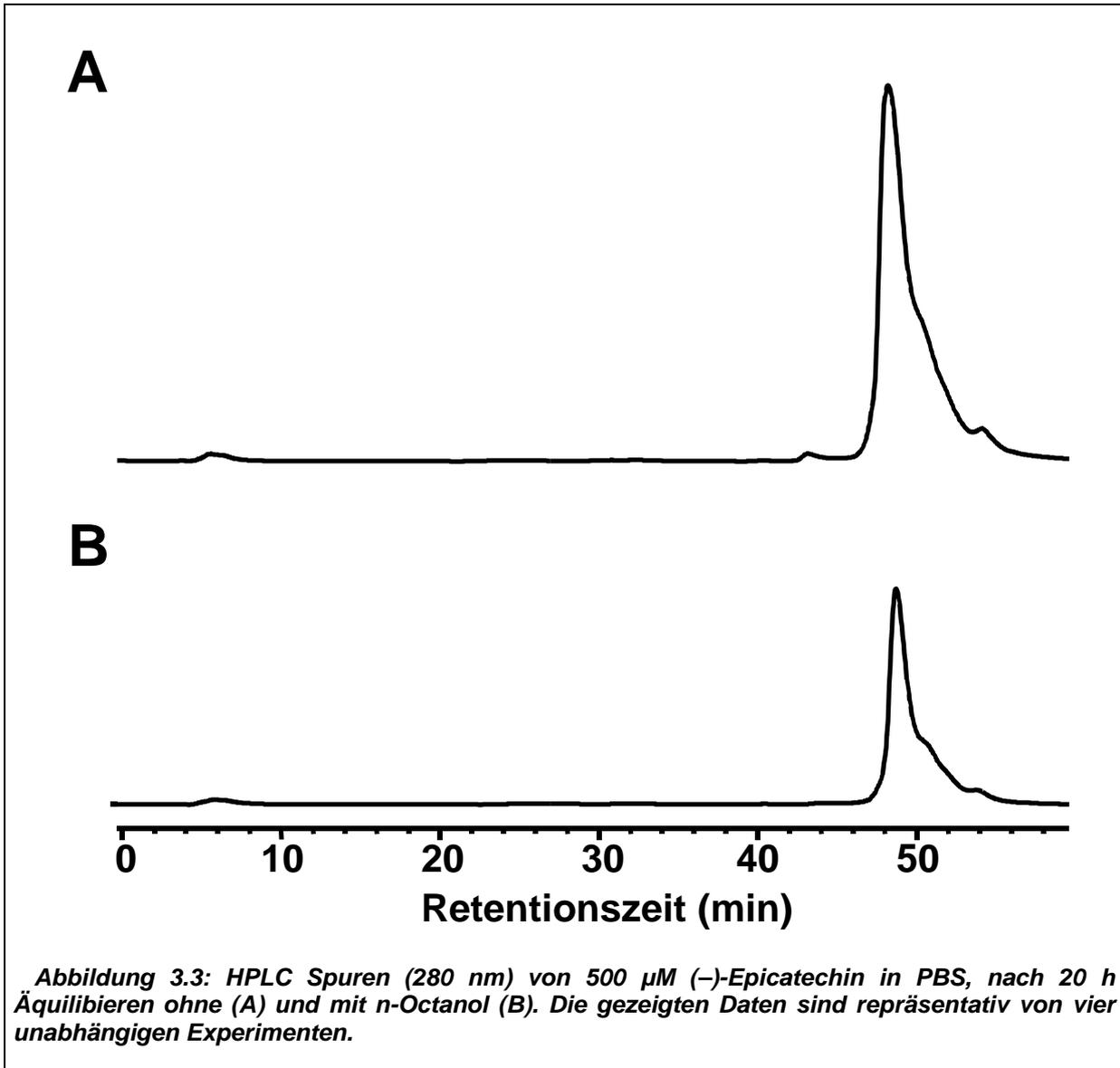


### 3.2 Zelluläre Aufnahme von (-)-Epicatechin

Zum Nachweis einer möglichen Aufnahme von (-)-Epicatechin durch Zellen wurde zunächst der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ermittelt und anschließend untersucht, ob in Gegenwart von Zellen eine verstärkte Abnahme von (-)-Epicatechin im Kulturmedium registriert werden kann. Schließlich wurde ermittelt, ob nach der Inkubation mit (-)-Epicatechin-haltigem Medium das Polyphenol in Zelllysat nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.1 Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von Epicatechin

Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient von (-)-Epicatechin wurde mit PBS als wässriger Phase nach 20 Stunden Äquilibrieren im Dunkeln bei 20°C durch quantitative HPLC gemessen.



Bei Anwesenheit von n-Octanol ergab sich eine stark verringerte Konzentration des Flavonoids (Retentionszeit 49 min) in der wässrigen Phase gegenüber der Kontrolle (Abbildung 3.3). Somit ergab sich aus vier unabhängigen Messungen der Verteilungskoeffizient  $K_p$  von  $1,74 \pm 0,14$  ( $n = 4$ ;  $\log(K_p) = 0,24$ ) nach folgender Gleichung:

$$K_p = \frac{[\text{Epicatechin}]_{\text{Octanol}}}{[\text{Epicatechin}]_{\text{PBS}}} = \frac{[\text{Epicatechin}]_{\text{PBS, inkubiert ohne Octanol}} - [\text{Epicatechin}]_{\text{PBS, inkubiert mit Octanol}}}{[\text{Epicatechin}]_{\text{PBS, inkubiert mit Octanol}}}$$

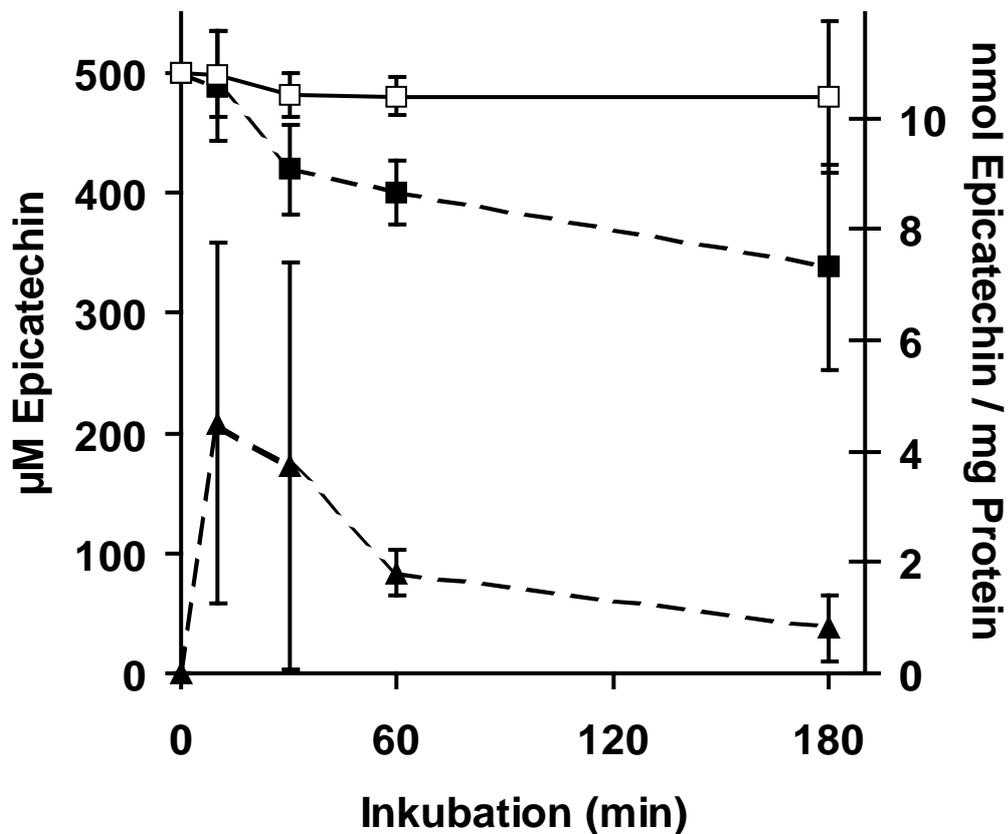
Der Verteilungskoeffizient liegt damit über dem Verteilungskoeffizient für Ethanol ( $K_p = 0,48$ ; (Leo et al., 1971)), für das Membranen bekannterweise permeabel sind, und ist somit in der Lage, in und durch die Plasmamembran zu gelangen.

### 3.2.2 Abnahme der Epicatechinkonzentration im Medium

Die Untersuchung der Epicatechinkonzentration in Zellkulturmedium mit und ohne Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit im Dunkeln bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> durch quantitative HPLC (Abbildung 3.4) zeigt, daß in Anwesenheit von Zellen eine kontinuierliche Verringerung der Epicatechinkonzentration über den Inkubationszeitraum um mehr als 30% der Startkonzentration auf  $338 \pm 85 \mu\text{M}$  Epicatechin ( $n = 3$ ) stattfindet. Dahingegen beträgt die Verringerung der Epicatechinkonzentration während der Inkubation von zellfreiem Medium weniger als 5% mit einer Endkonzentration von  $481 \pm 63 \mu\text{M}$  Epicatechin nach 180 Minuten.

### 3.2.3 Nachweis von Epicatechin in Zellen

Im wässrigen Extrakt muriner Aortaendothelzellen kann mittels quantitativer HPLC nach Inkubation der Zellen mit epicatechinhaltigem Medium (500  $\mu\text{M}$ ) Epicatechin nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). Der Extrakt wurde nach Inkubation der Zellen mit Epicatechin und zweimaligem Waschen mit PBS (siehe 2.3.2) hergestellt. Vor Beginn der Inkubation kann kein Epicatechin im Zelllysate nachgewiesen werden, nach 10-minütiger Inkubation wird der höchste Epicatechingehalt von  $4,5 \pm 3,4 \text{ nmol} / \text{mg}$  Protein erreicht und sinkt im weiteren Verlauf wieder bis auf  $0,8 \pm 0,6 \text{ nmol} / \text{mg}$  Protein ab.



**Abbildung 3.4:** Epicatechinkonzentration in RPMI1640-Medium und in wässrigem Lysat von murinen Aortaendothelzellen. (□): Epicatechinkonzentration (μM) in Medium ohne Zellen (500 μM Startkonzentration). (■): Epicatechinkonzentration in Medium auf konfluenten Zellen (500 μM Startkonzentration). (▲): Epicatechingehalt (nmol/mg Protein) in wässrigem Zellextrakt. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3-4)

### 3.3 (-)-Epicatechin: Schutz vor Peroxynitrit

Zur Abschätzung einer Interaktion von Epicatechin mit Peroxynitrit wurde sowohl der Einfluß von Epicatechin auf die Wirkung von Peroxynitrit in zellfreien Systemen unterschiedlicher Komplexität, als auch die Bedeutung von Epicatechin als schützender Wirkstoff in der Zellkultur untersucht. Eine Zusammenfassung der gemessenen Ergebnisse zum epicatechinvermittelten Schutz vor Peroxynitrit findet sich in Tabelle 3.1.

---

### 3.3.1 Zellfreie Systeme

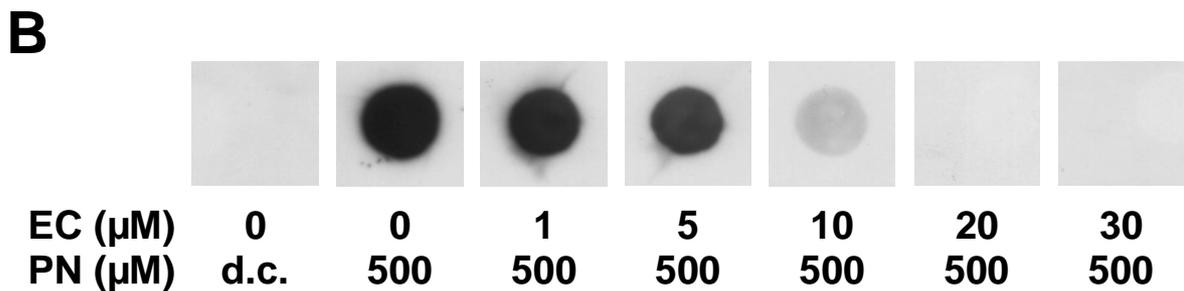
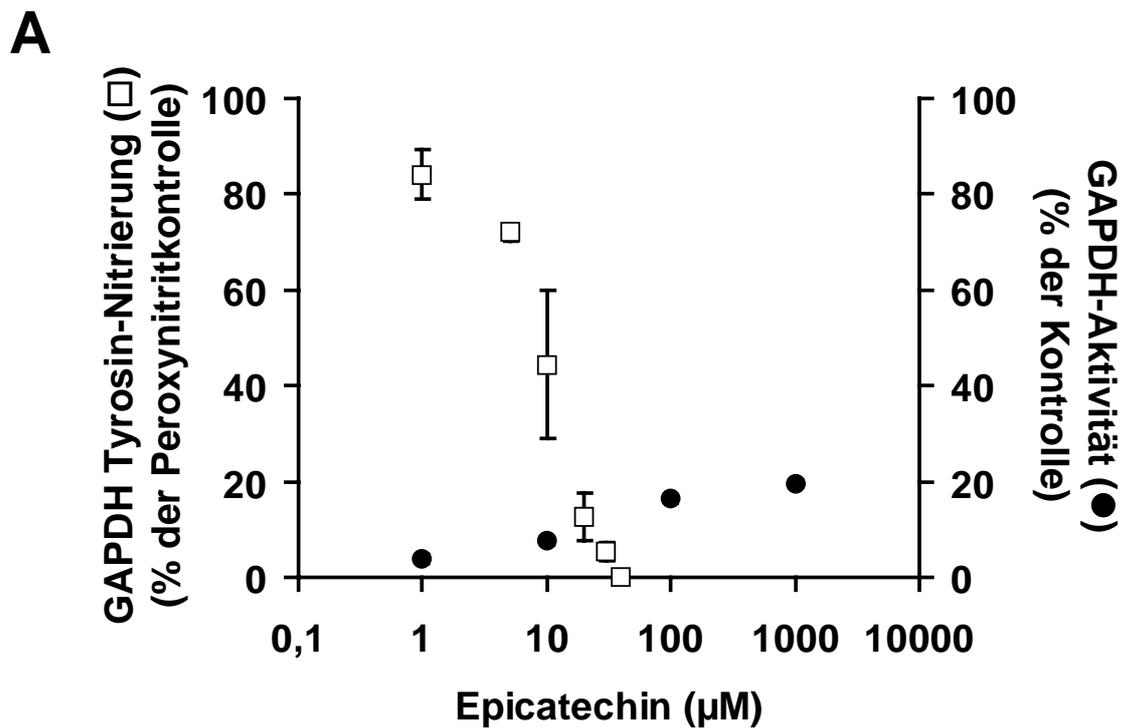
Zur Messung des Schutzeffekts von Epicatechin gegen Peroxynitrit wurden zunächst jeweils ein oxidativer und ein nitrierender Effekt des Peroxynitrit in verschiedenen Meßsystemen gemessen. Als Ziel von Peroxynitrit dienten isolierte Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, isolierte Lipoxygenase und Zelllysate von murinen Aortaendothelzellen.

Weiterhin wurde anhand von freiem Tyrosin in wässriger Umgebung und dem lipophilen Tyrosinderivat BTBE in Liposomenmembranen jeweils die Wirkung von Epicatechin auf die oxidierenden und nitrierenden Effekte von Peroxynitrit in hydrophilem und hydrophobem Milieu verglichen.

#### 3.3.1.1 Schutz von Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase vor oxidativem Funktionsverlust und Nitrierung von proteingebundenen Tyrosinresten

Es ist bekannt, daß die Aktivität der GAPDH wesentlich von der Funktion eines Cysteinrests im aktiven Zentrum abhängt, dessen Oxidation, z.B. durch Peroxynitrit, zu drastischem Aktivitätsverlust führt (Souza und Radi, 1998). Um zu testen, in welchem Maße die Anwesenheit von Epicatechin die Reaktionen von Peroxynitrit mit GAPDH beeinflusst, wurde GAPDH (8,8  $\mu\text{M}$ ) mit zwei unterschiedlichen Boli von Peroxynitrit (50  $\mu\text{M}$  bei Aktivitätsversuchen; 500  $\mu\text{M}$  bei Tyrosinnitrierungsversuchen) behandelt. Hierbei zeigt sich, daß der durch Oxidation hervorgerufene Verlust der enzymatischen Aktivität weniger effektiv verringert wird als die Nitrierung der proteingebundenen Tyrosingruppen (Abbildung 3.5).

Die photometrisch gemäß Souza und Radi (1998) gemessene GAPDH-Aktivität (Abbildung 3.5 A; ausgefüllte Kreise) sank ohne anwesendes Epicatechin nach Bolusgabe von Peroxynitrit (50  $\mu\text{M}$ ) auf 2% der Zerfallskontrolle ab und betrug auch bei Epicatechinkonzentrationen von 1000  $\mu\text{M}$  maximal 20% der Zerfallskontrolle. Im Gegensatz dazu war die durch Peroxynitrit hervorgerufene Tyrosinnitrierung, welche mittels Dot-Blotting und anschließender Densitometrie gemessen wurde (Abbildung 3.5 A; leere Quadrate und B), in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  Epicatechin bereits um mehr als 50% reduziert und mit 50  $\mu\text{M}$  Epicatechin vollständig aufgehoben.

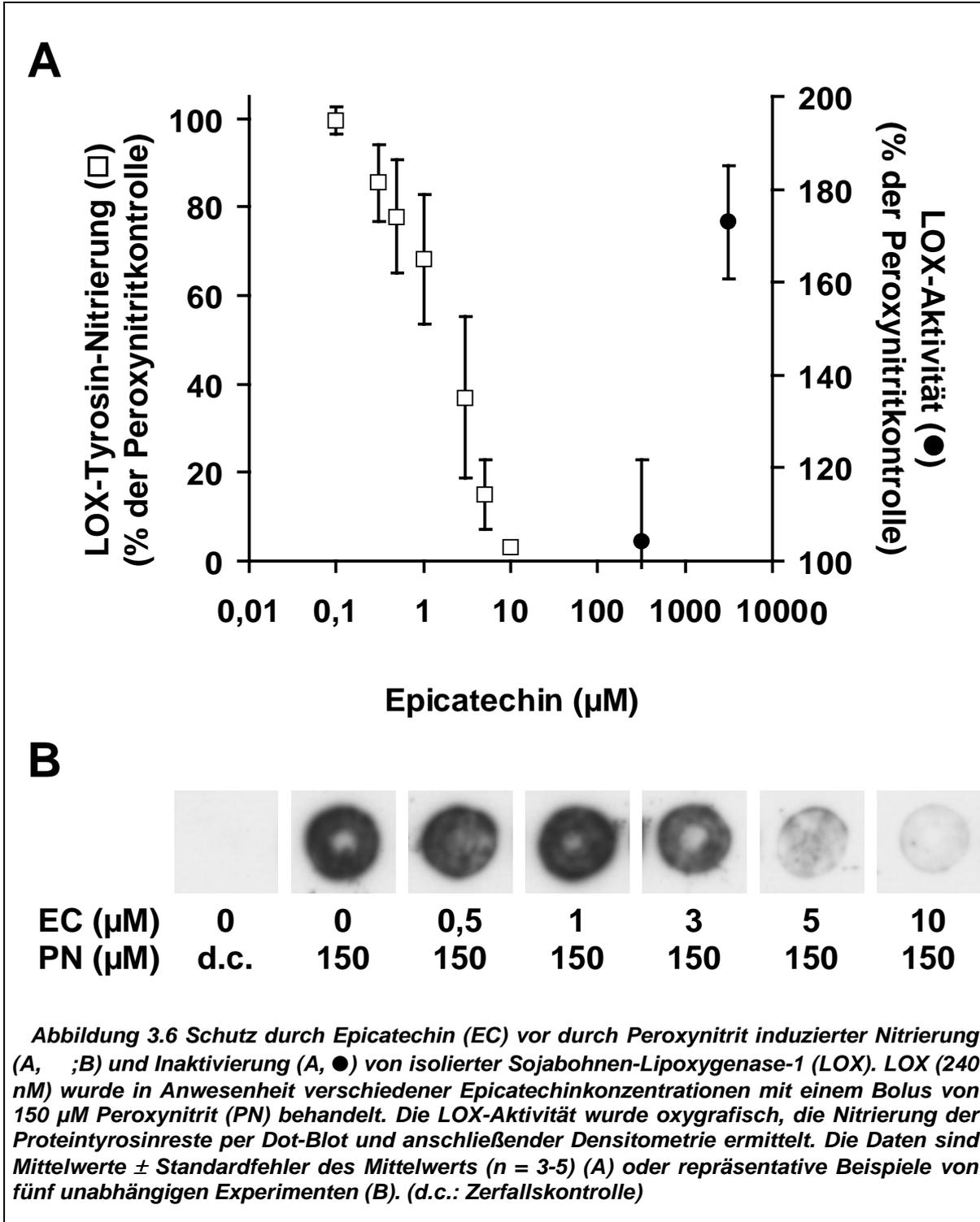


**Abbildung 3.5: Schutz durch Epicatechin (EC) vor durch Peroxynitrit (PN) induzierter Nitrierung und Inaktivierung von isolierter Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). (A) GAPDH (8,8  $\mu\text{M}$ ) wurde für die Messung der Enzymaktivität (●) mit einem 50  $\mu\text{M}$  Bolus Peroxynitrit (PN) und für die Messung der Tyrosinnitrierung (□) mit einem 500  $\mu\text{M}$  Bolus Peroxynitrit in Anwesenheit verschiedener Epicatechinkonzentrationen behandelt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes ( $n=3-7$ ), (B) Dot-Blot zum immunchemischen Nachweis der Tyrosinbehandlung; gezeigt sind repräsentative Beispiele aus vier unabhängigen Experimenten. (d.c.: Zerfallskontrolle)**

### 3.3.1.2 Schutz von Lipoxygenase vor oxidativem Funktionsverlust und Nitrierung von proteingebundenen Tyrosinresten

Als ein weiteres System wurde die Lipoxygenase-1 der Sojabohne untersucht, welche dafür bekannt ist, daß sie durch verschiedene Hydroperoxide inaktivierbar

ist (Kim und Sok, 1991; Kulkarni et al., 1990). Es zeigte sich, daß auch an diesem Enzym konzentrationsabhängige Schutzeffekte von Epicatechin gegen die oxidierende und nitrierende Wirkung von Peroxynitrit beobachtet werden können (Abbildung 3.6).

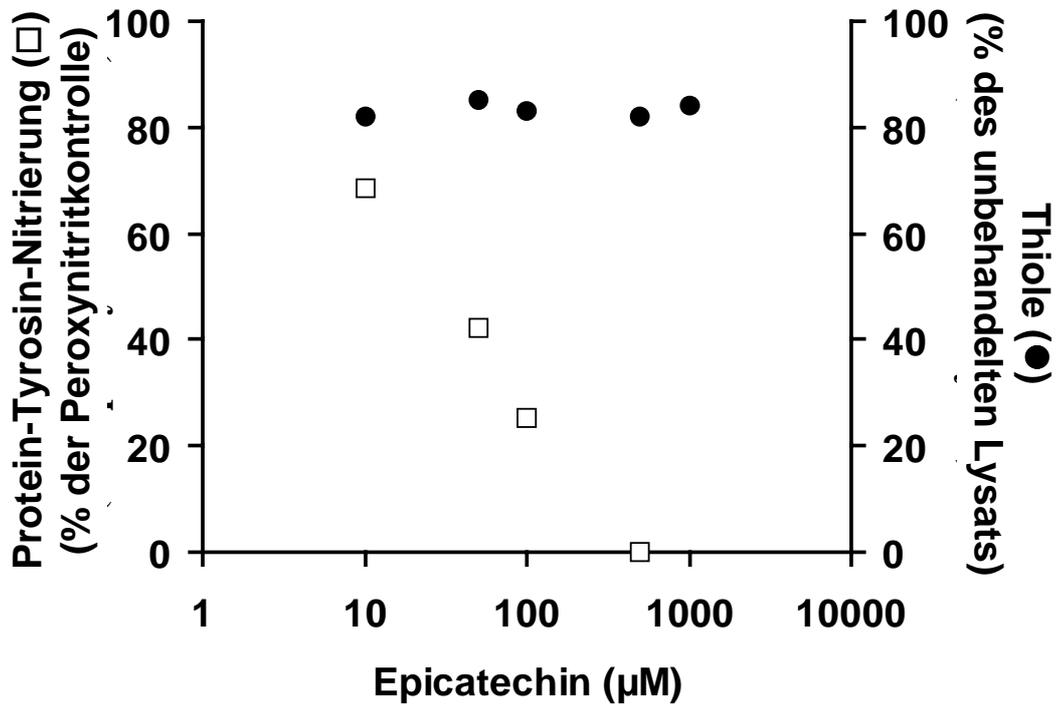
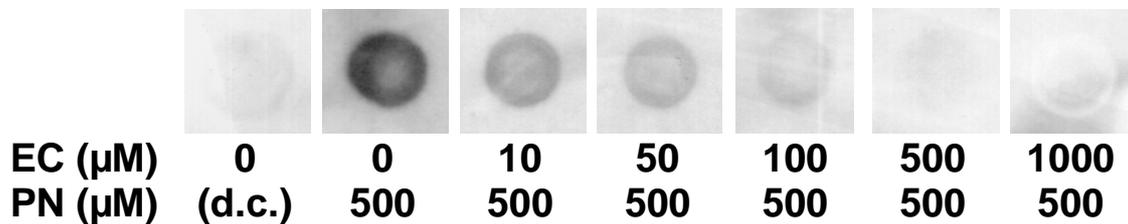


---

Die Anwesenheit von Epicatechin resultierte in einem konzentrationsabhängigen Schutz der Lipoxxygenase-1 (240 nM) vor Aktivitätsverlust und Tyrosinnitrierung bei Boluszugabe von Peroxynitrit (150 nM). Wie bereits bei den Messungen an GAPDH festgestellt, war auch hier der Schutz vor oxidativer Inaktivierung des Enzyms gering (Abbildung 3.6 A; ausgefüllte Kreise), wobei ebenfalls ein guter Schutz gegen Nitrierung der proteingebundenen Tyrosinreste zu registrieren war (Abbildung 3.6 A; offene Quadrate und B); Epicatechinkonzentrationen ab 10  $\mu$ M waren in der Lage die Tyrosinnitrierung vollständig zu unterdrücken, obwohl bei diesen Konzentrationen noch kein Schutz gegen Inaktivierung, d.h. keine im Vergleich zur Peroxynitritkontrolle gesteigerte Enzymaktivität meßbar war.

### 3.3.1.3 Schutz von Zelllysate vor oxidativer Entleerung des Thiolpools und Nitrierung von proteingebundenen Tyrosinresten

Nach Messungen in den relativ simplen Systemen mit isolierten Enzymen folgte nun die Untersuchung eines komplexeren Systems. Wässriges Zelllysate von murinen Aortaendothelzellen (6,4 mg Protein / mL) wurde in Anwesenheit verschiedener Epicatechinkonzentrationen mit einem Peroxynitritbolus von 500  $\mu$ M behandelt. Die anschließende photometrische Messung der Gesamtthiolkonzentration und die immunchemisch/densitometrische Bestimmung der Tyrosinnitrierung zeigten wie auch schon bei den vorangegangenen Experimenten mit isolierten Enzymen starke Unterschiede im Schutz vor der oxidativen Entleerung des Thiolpools und der Nitrierung von Tyrosinresten (Abbildung 3.7). Die Peroxynitritbehandlung resultierte in einer Verringerung der Gesamtthiolkonzentration auf etwa 80% des Wertes der Zerfallskontrolle. Eine Abschwächung dieser Wirkung des Peroxynitrits war bei Epicatechinkonzentrationen zwischen 10  $\mu$ M und 1 mM nicht festzustellen (Abbildung 3.7 A; ausgefüllte Kreise). Analog den Befunden aus den Untersuchungen an isolierten Enzymen zeigte sich jedoch ein Schutzeffekt des Epicatechins gegen die Nitrierung der Tyrosinreste im Zelllysate; bei Anwesenheit von 50  $\mu$ M Epicatechin lag die gemessene Tyrosinnitrierung bereits mehr als die Hälfte unterhalb des Wertes, der in Abwesenheit von Epicatechin gemessen wurde (Abbildung 3.7 A; offene Quadrate und B).

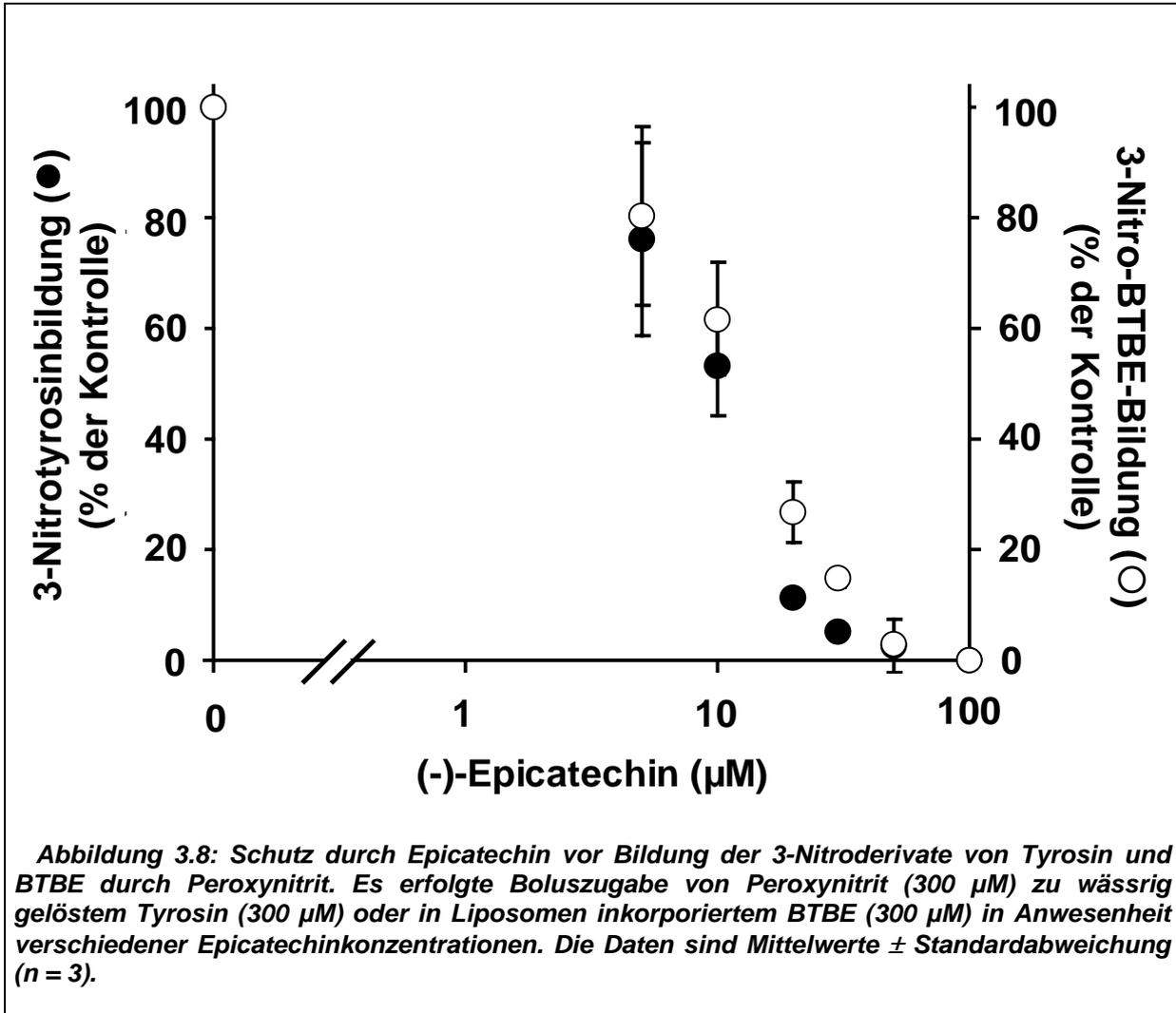
**A****B**

**Abbildung 3.7:** Effekt der Anwesenheit von Epicatechin (EC) auf die durch Peroxynitrit hervorgerufene Entleerung des Thiolpools (A, ●) und Tyrosinnitrierung (A, □; B) in Zelllysate von murinen Aortaendothelzellen. Zelllysate (6,4 mg Protein / mL), welches verschiedene Konzentrationen an Epicatechin enthielt, wurde mit 500 μM Peroxynitrit per Boluszugabe behandelt. Die Daten stellen Mittelwerte (A) oder Repräsentanten (B) zweier unabhängiger Experimente dar. (d.c.: Zerfallskontrolle)

### 3.3.1.4 Vergleich der Wirkung von Epicatechin in hydrophilen und hydrophoben Systemen

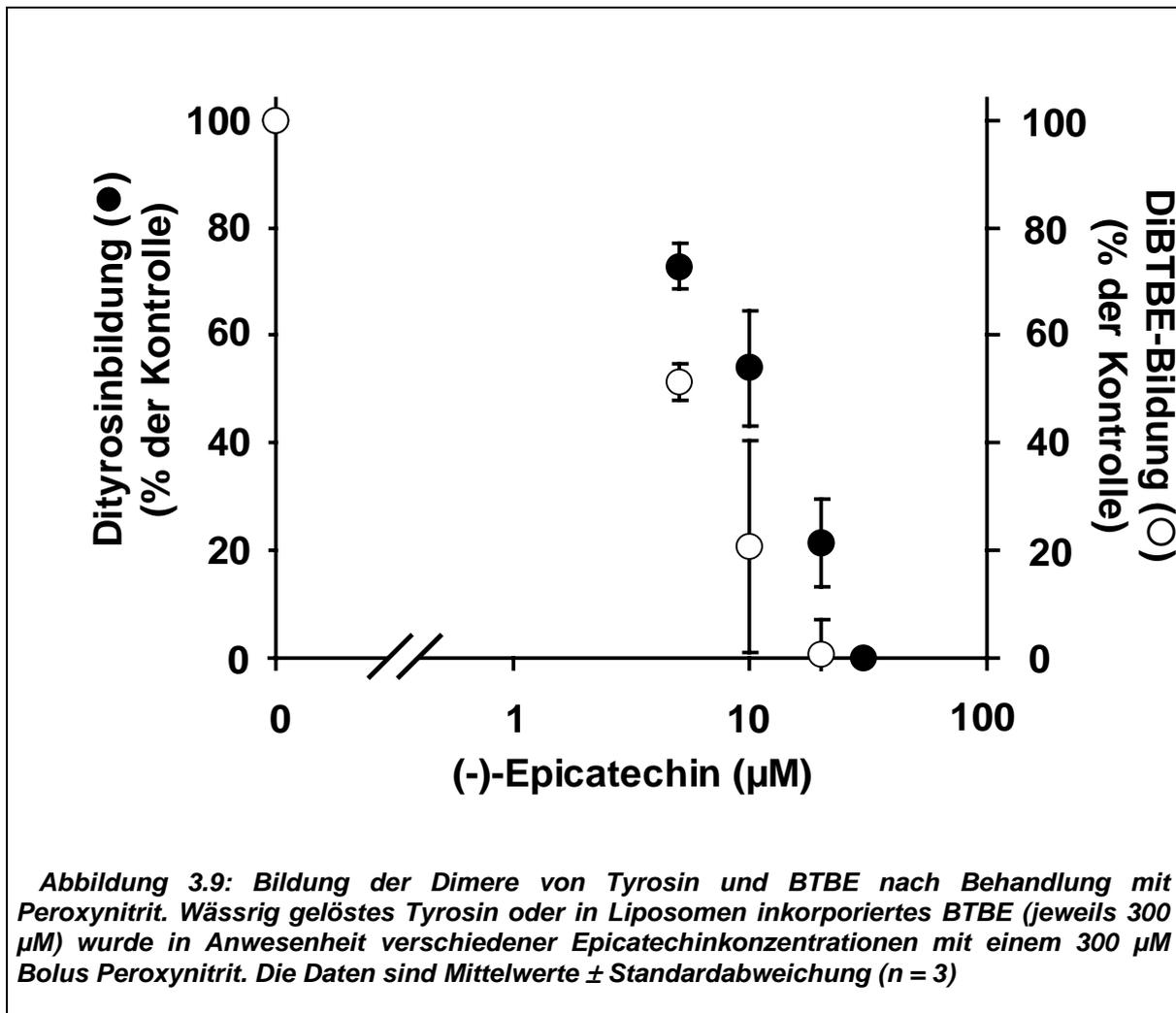
Basierend auf den vorhergehenden Erkenntnissen zum Schutz durch Epicatechin in Systemen verschiedener Komplexität stellt sich die Frage, ob es Unterschiede

der Wirkung von Epicatechin in hydrophilem und hydrophobem Milieu gibt. Hierzu wurde die Wirkung von Epicatechin in einem wässrigen und in einem liposomalen System untersucht, wobei jeweils das gleiche Zielmolekül für Nitrierung und Oxidation verwendet wurde, zum einen Tyrosin (wässrig) und zum anderen BTBE (liposomal).



Die quantitative HPLC-Analyse von mit 300 µM Peroxynitrit per Bolus behandelten Proben von 300 µM Tyrosin oder 300 µM BTBE in Gegenwart verschiedener Epicatechinkonzentrationen zeigte in beiden Fällen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Nitrierung durch Epicatechin (Abbildung 3.8). Ohne Epicatechin führte der Peroxynitritbolus zur Bildung von  $88 \pm 8$  µmol 3-Nitrotyrosin bzw.  $39 \pm 3$  µmol 3-Nitro-BTBE. Die Bildung der 3-Nitroderivate konnte durch 11 µM Epicatechin im wässrigen System bzw. 14 µM im liposomalen System zur Hälfte unterdrückt werden.

Auch konnte in beiden Systemen eine konzentrationsabhängige Verringerung der Dimerbildung festgestellt werden (Abbildung 3.9). In Abwesenheit von Epicatechin wurden  $4,5 \pm 1 \mu\text{mol}$  Dityrosin bzw.  $0,24 \pm 0,02 \mu\text{mol}$  Di-BTBE gebildet, und eine Verminderung dessen um 50% war bei Epicatechinkonzentrationen von  $12 \mu\text{M}$  im wässrigen und  $6 \mu\text{M}$  im liposomalen System zu registrieren.



---

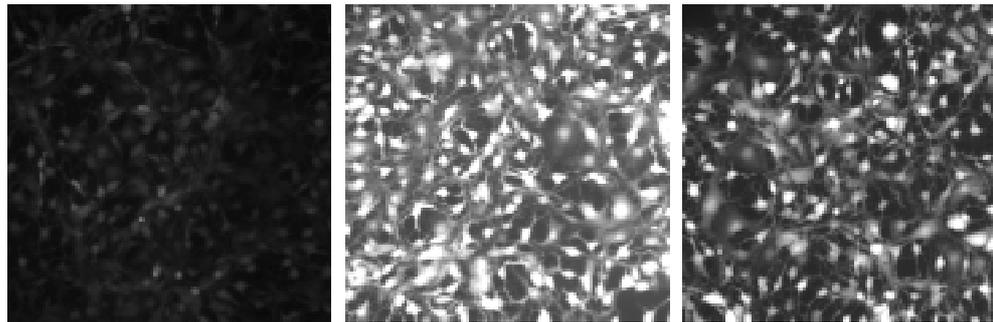
### 3.3.2 Zellkultur

Nach den Erkenntnissen aus den Untersuchungen aus zellfreien Systemen sollte nun die Schutzwirkung von Epicatechin in intakten Zellen untersucht werden. Als Modell wurden Aortaendothelzellen gewählt, da diese *in vivo* sowohl mit Peroxynitrit als auch mit Epicatechin in Berührung kommen können. Hierzu wurden die Zellen in PSG-Puffer mit einem 500 µM Bolus von Peroxynitrit behandelt, wobei verschiedene Konzentrationen von Epicatechin anwesend waren. Desweiteren wurde, basierend auf den Ergebnissen zur zellulären Aufnahme von Epicatechin, untersucht, ob nach Beladung der Zellen mit Epicatechin vor der Peroxynitritbehandlung ein Schutzeffekt nachweisbar ist.

Die oxidative Wirkung von Peroxynitrit wurde durch Oxidation von Dichlor-dihydrofluorescein (DCDHF) zu Dichlorfluorescein (DCF), die Tyrosinnitrierung wurde per Dot-Blot mit anschließender Densitometrie gemessen (siehe Material und Methoden).

#### 3.3.2.1 Anwesenheit von Epicatechin: Schutz vor Oxidation und Nitrierung

Die Behandlung von nahezu konfluenten Aortaendothelzellen der Maus mit einem Bolus von Peroxynitrit führte zur Oxidation von intrazellulärem DCDHF zu DCF, wobei sowohl die interzelluläre als auch die intrazelluläre Verteilung des DCF homogen war. Ein Schutzeffekt von Epicatechin war sichtbar; bei Anwesenheit von 500 µM Epicatechin war eine klare Verringerung der Fluoreszenz gegenüber der Abwesenheit von Epicatechin festzustellen (Abbildung 3.10; A und B).

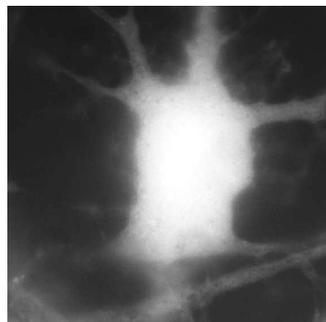
**A**

EC ( $\mu\text{M}$ )  
PN ( $\mu\text{M}$ )

0  
d.c.

0  
500

500  
500

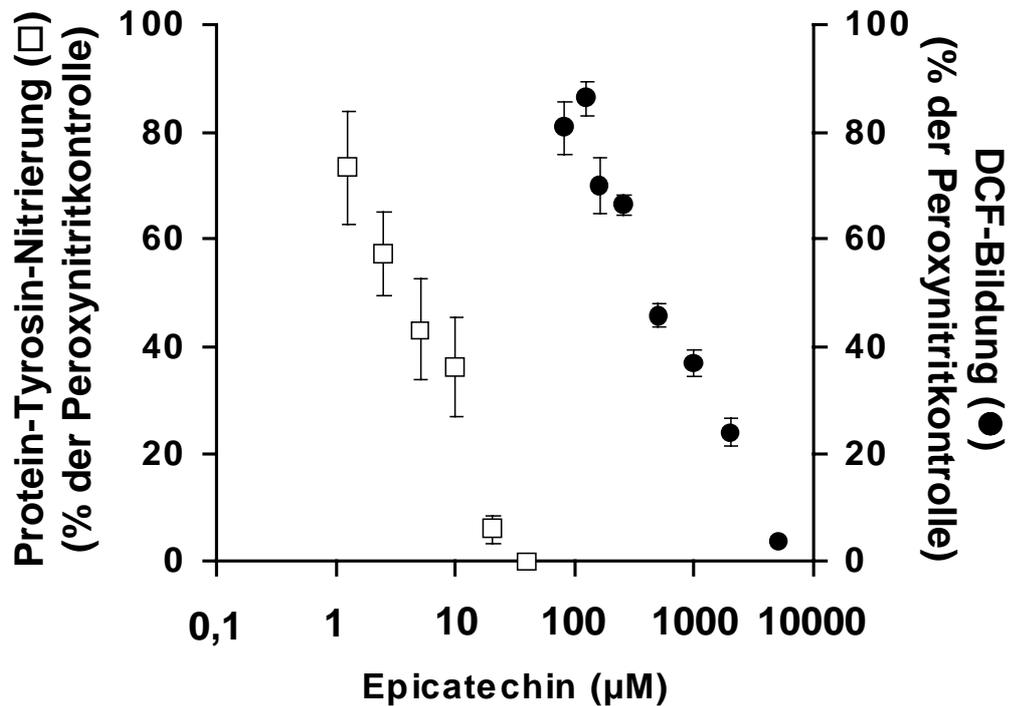
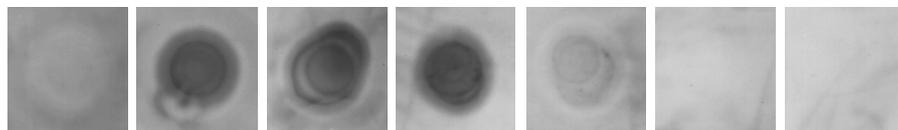
**B**

EC ( $\mu\text{M}$ )  
PN ( $\mu\text{M}$ )

0  
500

**Abbildung 3.10: Bildung von DCF in Aortaendothelzellen aus Maus. (A) Einfluß von Peroxynitrit (PN) und (-)-Epicatechin (EC) auf die Bildung von DCF und gleichmäßige Verteilung des DCF über die behandelte Zellkulturplatte. (B) Gleichmäßige Verteilung von DCF innerhalb einer Zelle. Die gezeigten Aufnahmen sind Repräsentanten dreier unabhängiger Experimente. (d.c.: Zerfallskontrolle)**

In Anwesenheit von Epicatechin war gegen Oxidation von DCDHF und Nitrierung von Tyrosin ein konzentrationsabhängiger Schutzeffekt zu messen (Abbildung 3.11). Die Nitrierung der Tyrosinreste war bei einer Epicatechinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  bereits zu über 50 % verringert, ab 40  $\mu\text{M}$  Epicatechin war keine Tyrosinnitrierung mehr sichtbar. Die Bildung von DCF wurde um ca. zwei Größenordnungen weniger stark gehemmt und erst bei 500  $\mu\text{M}$  Epicatechin auf weniger als 50 % des Werts gesenkt, welcher in Abwesenheit von Epicatechin gemessen wurde.

**A****B**

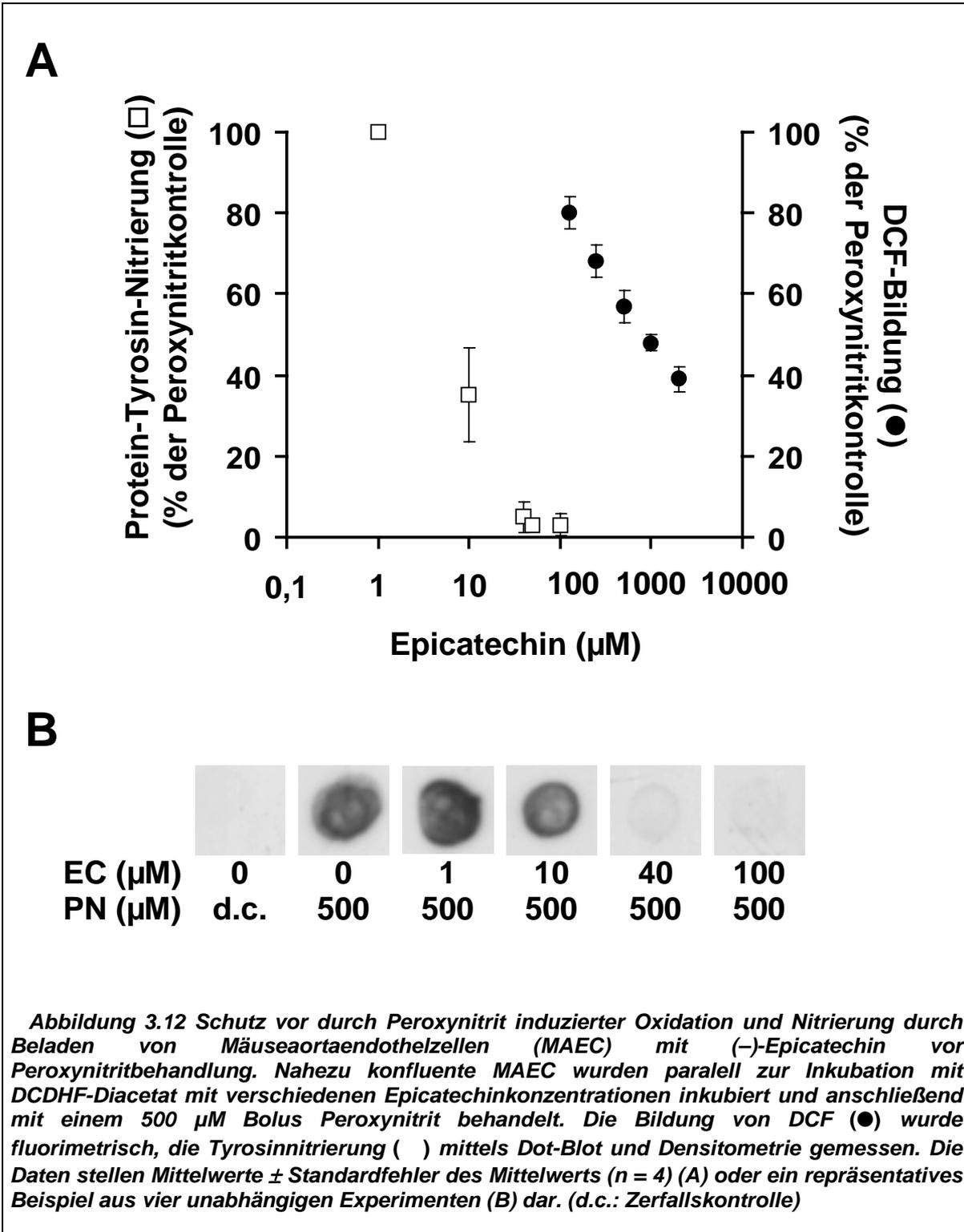
EC (μM)	0	0	2,5	5	10	20	40
PN (μM)	d.c.	500	500	500	500	500	500

**Abbildung 3.11:** Schutz vor durch Peroxynitrit induzierter oxidativer Bildung von DCF und Nitrierung von Tyrosin in murinen Aortaendothelzellen (MAEC). MAEC nahezu konfluenter Zelldichte wurden mit einem 500 μM Bolus Peroxynitrit in Anwesenheit verschiedener Epicatechinkonzentrationen behandelt. Die Bildung von DCF (●) wurde fluorimetrisch, die Tyrosinnitrierung (□) mittels Dot-Blot und Densitometrie gemessen. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts (n = 4-12) (A) oder ein repräsentatives Beispiel für mindestens acht unabhängige Experimente (B) dar. (d.c.: Zerfallskontrolle)

### 3.3.2.2 Präinkubation mit Epicatechin: Schutz vor Oxidation und Nitrierung

Während in den vorhergehenden Versuchen Epicatechin während der Behandlung mit Peroxynitrit zugegen war, sollten nun Zellen mit Epicatechin beladen werden,

um festzustellen, ob das Ausmaß der Epicatechin- Aufnahme zum Etablieren eines zellulären Schutzes vor Peroxynitrit ausreicht.



---

Dazu wurden Aortaendothelzellen aus Maus für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen Epicatechins inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und darauf mit einem 500  $\mu\text{M}$  Bolus von Peroxynitrit in PSG-Puffer behandelt.

Es zeigte sich, daß die vorinkubierten Zellen über einen ähnlich guten Schutz vor Peroxynitrit verfügen (Abbildung 3.12) wie jenen, der bei Anwesenheit von Epicatechin gemessen wurde. Die Nitrierung von Proteinresten konnte bereits bei Präinkubation mit einer Epicatechinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  um mehr als die Hälfte des Wertes verringert werden, der ohne Epicatechin registriert wurde. Auch hier war Epicatechin im Schutz vor der Bildung von DCF weniger effektiv, zwischen 500  $\mu\text{M}$  und 1 mM Epicatechin sind in der Präinkubation erforderlich um die DCF-Bildung um 50% abzuschwächen.

### **3.3.3 Zusammenfassung: Schutz vor Peroxynitrit durch Epicatechin in den verwendeten Testsystemen**

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die zur halbmaximalen Inhibition der Peroxynitritwirkung notwendigen Epicatechinkonzentrationen, normiert auf die im jeweiligen Testansatz verwendeten Peroxynitritkonzentrationen, in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Es zeigt sich im Vergleich, daß in den Testsystemen GAPDH, LOX, Zelllysat und bei den Versuchen mit kultivierten Zellen mindestens zwei Größenordnungen Unterschied zwischen dem Schutz vor Nitrierung und dem Schutz vor Oxidation liegen, wobei Epicatechin deutlich besser gegen Nitrierung schützt. Lediglich in den Testsystemen, in denen Tyrosin oder das Tyrosinderivat BTBE als Zielmolekül sowohl der Nitrierung als auch der Oxidation fungieren, sind die zur halbmaximalen Inhibition benötigten Epicatechinkonzentrationen identisch.

**Tabelle 3.1 Zur halbmaximalen Inhibition von Peroxynitritreaktionen notwendige Epicatechinkonzentration, normiert auf die jeweilige Peroxynitritkonzentration in den verwendeten Testsystemen**

Nitrierungsparameter	IC <sub>50</sub> / [PN]	Oxidationsparameter	IC <sub>50</sub> / [PN]
Nitrierung von Tyrosinresten isolierter GAPDH	0,02	Inaktivierung der GAPDH	> 20
Nitrierung von Tyrosinresten isolierter LOX-1	0,02	Inaktivierung der LOX-1	> 21
Nitrierung von Tyrosinresten in Zelllysat	0,02	Entleeren des Thiolpools lysierter Zellen	> 5
Nitrierung isolierten Tyrosins in wässriger Lösung	0,04	Dimerisierung isolierten Tyrosins in wässriger Lösung	0,04
Nitrierung von BTBE in Liposomenmembranen	0,05	Dimerisierung von BTBE in Liposomenmembranen	0,05
Nitrierung von protein-gebundenen Tyrosinresten in kultivierten Zellen bei Epicatechin-Anwesenheit	0,02	Oxidation von DCDHF in kultivierten Zellen bei Anwesenheit von Epicatechin	1,1
Nitrierung von protein-gebundenen Tyrosinresten in kultivierten Zellen nach Präinkubation mit Epicatechin	0,01	Oxidation von DHDCF in kultivierten Zellen nach Präinkubation mit Epicatechin	1,7

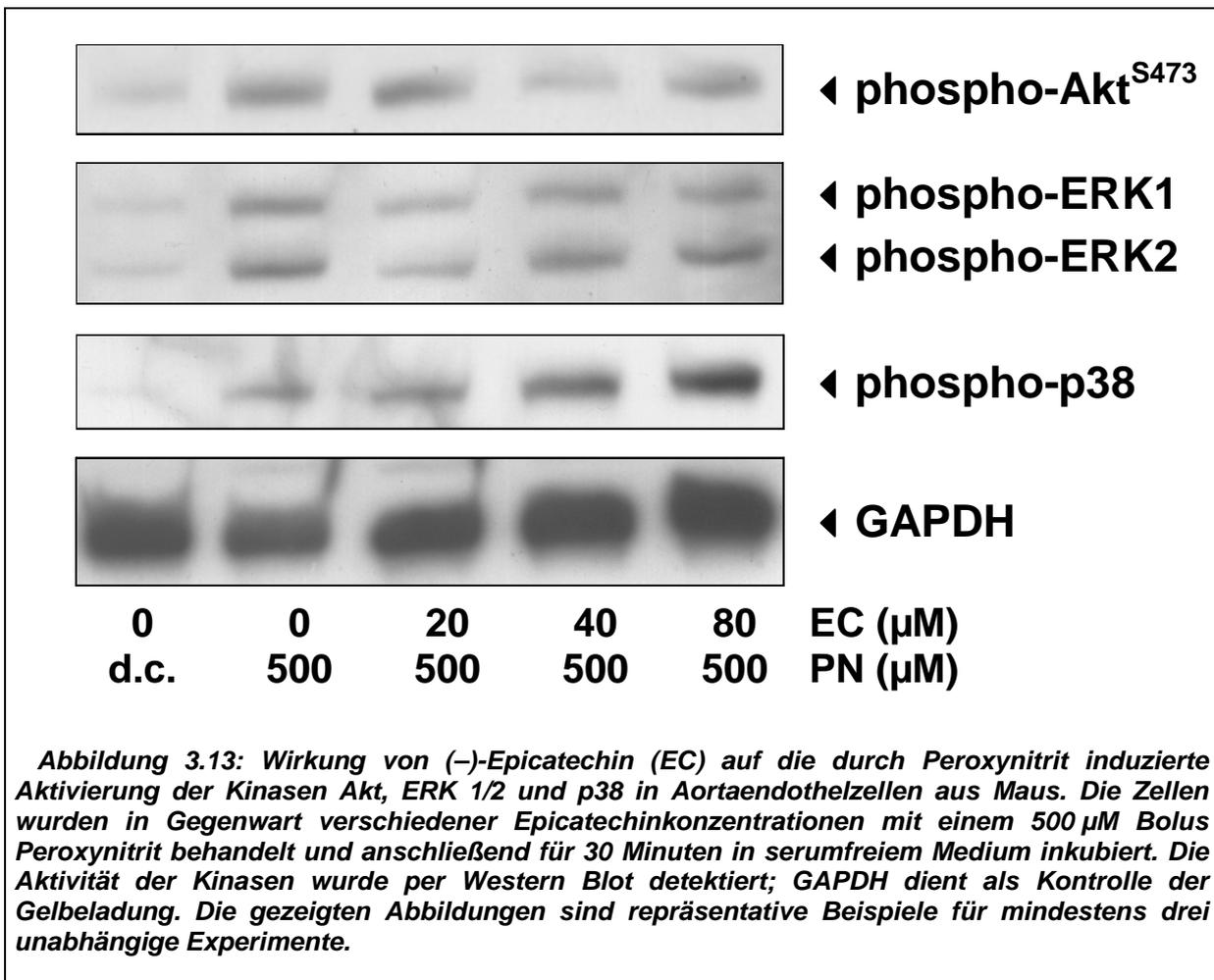
### 3.4 Einfluß von (–)-Epicatechin auf durch Peroxynitrit aktivierbare Signalwege

Da Epicatechin sowohl die Nitrierung als auch die Dimerisierung von Tyrosinresten durch Peroxynitrit sehr viel effektiver zu verhindern mag als oxidative Modifikationen, kann Epicatechin zur Abschätzung der Bedeutung der Tyrosinnitrierung bei der Aktivierung zellulärer Signalwege durch Peroxynitrit herangezogen werden. Als Rolle der Tyrosinnitrierung in der Signaltransduktion wird zum einen diskutiert, daß Nitrierung von Tyrosinresten deren Phosphorylierung, und somit die Regulation von Kinasen verhindert (Kong et al., 1996); und zum anderen, daß die Nitrierung

von Tyrosinresten zur Konformationsänderung von Proteinen führen kann und so eine aktivierende Wirkung hat (Zhang et al., 2000).

Aortaendothelzellen aus Maus wurden in Gegenwart verschiedener Epicatechinkonzentrationen mit einem Peroxynitrit-Bolus (500  $\mu\text{M}$ ) behandelt, anschließend mit serumfreiem Medium für 30 Minuten inkubiert und schließlich per Western Blot auf die Aktivität verschiedener Kinasen (Akt/PKB; ERK1/2; p38) und per Dot-Blot auf die vorhandene Tyrosinnitrierung hin untersucht (Abbildung 3.13).

Es zeigt sich, daß die verwendete Peroxynitritkonzentration ausreicht, um die untersuchten Kinasen zu aktivieren, und dies ebenso der Fall ist, wenn durch Anwesenheit von Epicatechin bereits keine Tyrosinnitrierung mehr meßbar ist. Somit wurde deutlich, daß sowohl Tyrosinnitrierung als auch Tyrosindimerisierung (siehe auch 0) keine Bedeutung bei der Aktivierung der untersuchten Kinasen durch Peroxynitrit haben.



### 3.5 Vergleich der Fähigkeiten des Epicatechinmonomers mit seinen Oligomeren

Die Nahrungsmittel, welche als Quelle für Epicatechin dienen können, enthalten nicht nur das Monomer sondern auch die Oligomere des Epicatechin. Zum Vergleich der Eigenschaften der Oligomere mit denen des Monomers hinsichtlich der Hemmung der Nitrierung und Dimerisierung von Tyrosin und BTBE wurden unterschiedliche Oligomerfraktionen in Konzentrationen, welche 10  $\mu\text{M}$  des Monomers entsprechen, untersucht (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Produktbildung in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}_{\text{val}}$  (-)-Epicatechinmonomer oder seinen Oligomeren.**

	Bildung (% der epicatechinfreien Kontrolle) <sup>1</sup> von			
	3-Nitrotyrosin	Dityrosin	3-Nitro-BTBE	Di-BTBE
Monomer	53.3 $\pm$ 9.0 <sup>2</sup>	64.5 $\pm$ 17.6	61.8 $\pm$ 10.2	20.8 $\pm$ 19.8
Dimer	46.9 $\pm$ 5.9	72.8 $\pm$ 11.5	87.5 $\pm$ 23.2	61.2 $\pm$ 6.9
Trimer	43.9 $\pm$ 1.5	70.9 $\pm$ 2.9	66.4 $\pm$ 19.9	48.6 $\pm$ 25.3
Tetramer	44.4 $\pm$ 0.1	81.3 $\pm$ 0.3	83.8 $\pm$ 29.9	79.0 $\pm$ 21.5
Pentamer	29.8 $\pm$ 0.8	67.2 $\pm$ 1.5	70.8 $\pm$ 21.8	62.3 $\pm$ 28.5
Hexamer	60.8 $\pm$ 12.0	95.1 $\pm$ 23.4	68.4 $\pm$ 18.7	53.8 $\pm$ 11.6
Heptamer	65.6 $\pm$ 12.3	110.4 $\pm$ 24.1	81.4 $\pm$ 17.7	89.0 $\pm$ 25.3
Octamer	118.4 $\pm$ 17.3	129.5 $\pm$ 24.0	84.6 $\pm$ 29.0	87.0 $\pm$ 18.0

<sup>1</sup> Tyrosin und BTBE (jeweils 300  $\mu\text{M}$ ) wurden in Abwesenheit und Gegenwart von Epicatechinmonomer oder -oligomeren mit einem Peroxynitrit-Bolus (300  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte gemäß Kapitel 2 per HPLC. 100%: Produktbildung in Abwesenheit von Epicatechin und Procyanidinen.

<sup>2</sup> Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 3)

Im Schutz von Tyrosin in wässriger Lösung wird deutlich, daß die Oligomere auf molarer Basis in der hydrophilen Umgebung einen besseren Schutz gegen die Bildung von Nitrotyrosin und Dityrosin bieten als das Monomer. Betrachtet man die Ergebnisse auf Basis der für die Oligomere zugrundeliegenden Monomere, so unterscheiden sich Monomer und Oligomere in ihrer Effizienz nur unwesentlich. Der Vergleich von 10  $\mu\text{M}$  Epicatechin gegen 10  $\mu\text{M}_{\text{val}}$  des Oligomers zeigt vom Monomer bis zum Pentamer einen zunehmenden Schutz gegen Nitrierung, wohingegen

---

der Schutz gegen Oxidation leicht abnimmt. Höhere Oligomere zeigen schwächeren Schutz gegen beide Arten von Reaktionen.

Im hydrophoben System schützt keines der Oligomere das lipophile Tyrosinanalogue BTBE so effektiv vor Nitrierung oder Oxidation durch Peroxynitrit wie dies beim Monomer der Fall ist.

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Reaktion von Epicatechin und Peroxynitrit

Die photometrischen Messungen des Gemischs der mit Peroxynitrit behandelten Epicatechinlösungen (Abbildung 3.1) sowie wie die Auftrennung der entstehenden Reaktionsprodukte per HPLC (Abbildung 3.2) zeigen, daß Epicatechin mit Peroxynitrit reagiert. Der Befund, daß eine solche Reaktion stattfindet, deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die partiell strukturanaloga Substanzen, z.B. Kaffeesäure, untersucht haben (Kerry und Rice-Evans, 1998). Der relativ geringe Umsatz von Epicatechin trotz Überschuß von Peroxynitrit (Abbildung 3.2) läßt vor dem Hintergrund kinetischer Untersuchungen (Tibi und Koppenol, 2000) den Schluß zu, daß es sich bei Epicatechin nicht um einen „Scavenger“ des Peroxynitrit im engeren Sinne handelt, sondern die Wirkung des Epicatechin gegen die nitrierende und oxidierende Wirkung des Peroxynitrit auf Reaktionen mit Intermediaten zurückgeht, die bei der Peroxynitritbehandlung entstehen (siehe auch 4.4). Tibi und Koppenol (2000) konnten zeigen, daß der Zerfall von Peroxynitrit nicht durch die Anwesenheit von Flavonoiden beschleunigt werden kann, diese also keine „Scavenger“ des Peroxynitrits sind.

### 4.2 Epicatechin wird von Endothelzellen aufgenommen

Die Ergebnisse zur Verteilung von Epicatechin zwischen hydrophilen und lipophilen Phasen ( $K_P = 1,74$ ) zeigen, daß das Flavonoid in beiden Milieus ähnlich gut löslich ist. Der Verteilungskoeffizient liegt in der selben Größenordnung der von Catechin ( $K_P = 1,26$ ) (Moridani et al., 2000), jedoch zeigt sich eine geringere Bevorzugung der lipophilen Phase als, basierend auf einem mathematischen Modell, zu erwarten gewesen war ( $K_P = 7,24$ ) (Yang et al., 2001).

Die Versuche zur Inkubation von (–)-Epicatechin in Gegenwart von Aortaendothelzellen (Abbildung 3.4) zeigen, daß die Zellen in der Lage sind, Epicatechin aus dem Medium zu entfernen. Gleichzeitig wird deutlich, daß das aus dem Medium

---

verlorene Epicatechin nicht zwingend in den Zellen akkumuliert wird, da die Epicatechinkonzentration in den Zellen in den ersten Minuten der Inkubation mit Epicatechin zwar zu-, dann jedoch wieder abnimmt. Dies legt nahe, daß zumindest ein Teil des Epicatechins von den Zellen metabolisiert wird, wie dies bereits für Epicatechin und andere Flavonoide sowohl an lebenden Tieren (Baba et al., 2001) als auch an Zell- oder Gewebemodellen (Donovan et al., 2001; Kuhnle et al., 2000) gezeigt werden konnte. Auch die Metaboliten des Epicatechin besitzen, wie am Beispiel der O-methylierten Form des Epicatechin gezeigt (Spencer et al., 2001a), einen Schutzeffekt gegen die Auswirkung des oxidativen Stress. Die Aufnahme des Flavonoids in die Zellen kann, basierend auf der Erkenntnis, daß Epicatechin sowohl in hydrophilen wie auch in lipophilen Phasen löslich ist (Kapitel 3.2.1), passiv erfolgen.

Einen weiteren Beleg für die Aufnahme von Epicatechin liefert die Tatsache, daß im zellulären Modell nach Beladen mit Epicatechin ein Schutz gegen Peroxynitrit erworben worden ist (Abbildung 3.12). Der Umstand, daß der kleinere Teil ( $\approx 30 - 35\%$ ) des angebotenen Epicatechins nach der Inkubation aus dem Medium verschwunden ist und trotzdem ein Schutz erreicht werden kann, welcher einer deutlich höheren Konzentration anwesenden Epicatechins entspricht, legt nahe, daß Epicatechin nicht gleichmäßig verteilt in der Zelle vorliegt, sondern mit einer Art „Barrierefunktion“ in oder an der Membran angereichert ist.

### **4.3 Epicatechin schützt besser gegen Tyrosinnitrierung als gegen die Oxidation anderer Zielmoleküle durch Peroxynitritbehandlung**

In allen untersuchten Systemen, in welchen Nitrierung und Oxidationen an unterschiedlichen Zielmolekülen gemessen wurde, zeigt sich, unabhängig ob es sich um zellfreie oder zelluläre System handelt, daß Epicatechin deutlich effektiver gegen Nitrierung schützt als es dies gegen Oxidationen tut (Abbildung 3.5; Abbildung 3.6; Abbildung 3.7; Abbildung 3.11; Abbildung 3.12; Tabelle 3.1): Die entsprechenden  $IC_{50}$ -Werte liegen um mindestens zwei Größenordnungen auseinander. Dies läßt auf eine bemerkenswerte Selektivität des Flavonoids im Schutz gegen die unterschiedlichen Wirkungen des proinflammatorischen Metaboliten Peroxynitrit schlie-

---

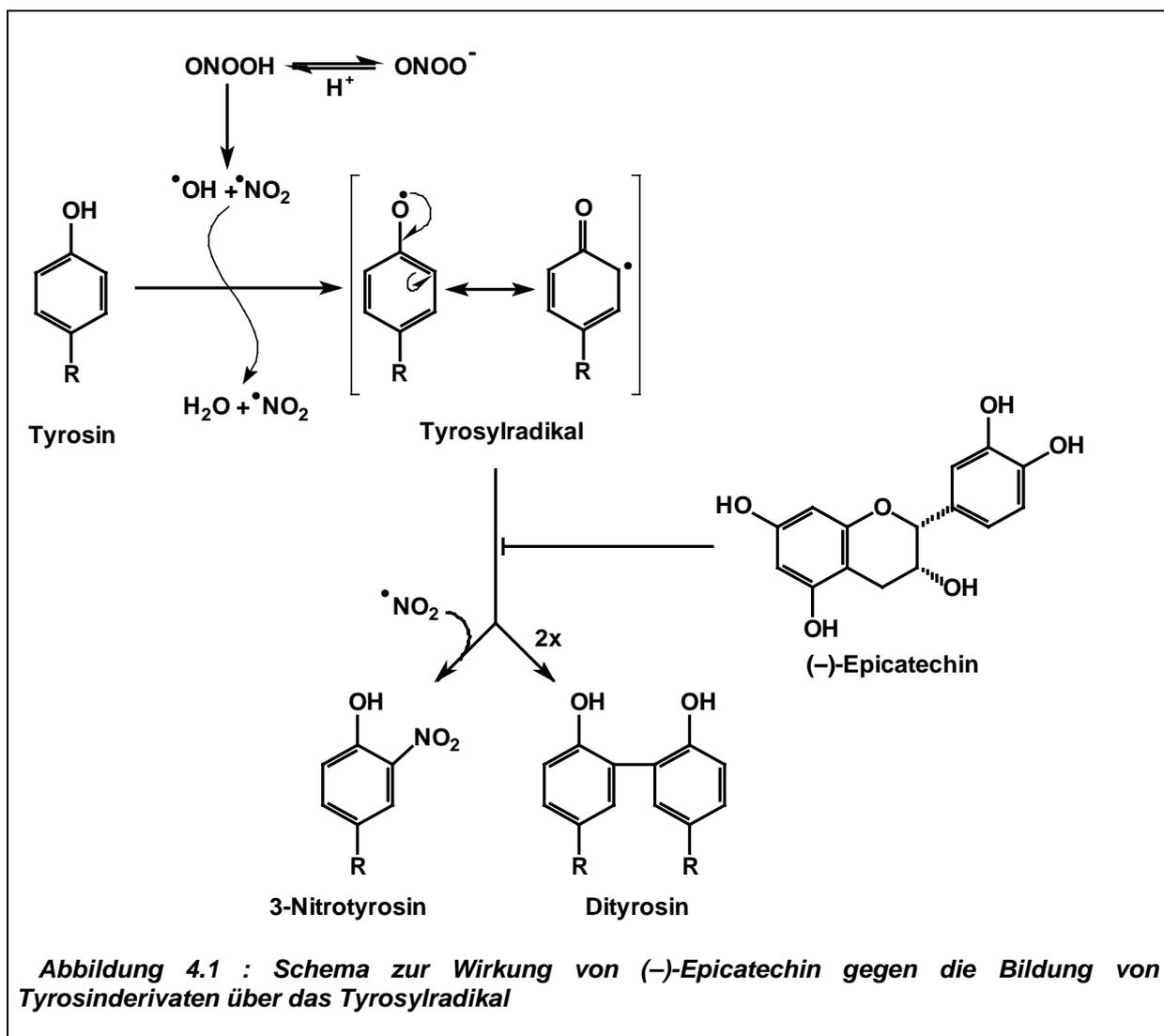
ßen. Diese Erkenntnis deckt sich mit vorhergehenden Ergebnissen, welche *in vitro* gemessen wurden (Arteel und Sies, 1999).

Auf den ersten Blick mag diese Selektivität des Epicatechin seinen Werte als Schutzsubstanz gegen den peroxynitritinduzierten Stress einschränken, aber nichtsdestotrotz kann Epicatechin in Kombination mit anderen antioxidativen Bestandteilen der Nahrung signifikant zur Verteidigung gegen Oxidantien beitragen. Da Oxidation und Nitrierung in biologischen Systemen nicht immer eindeutig voneinander zu trennen sind, ist es schwierig vorauszusagen, welcher Effekt die größere Rolle bei physiologischen Prozessen, die von Peroxynitrit ausgelöst werden, spielt.

Hier aber kann Epicatechin, unabhängig von seiner biologischen Bedeutung, aufgrund seiner hohen Selektivität bezüglich der nitrierenden und oxidierenden Wirkungen des Peroxynitrits als experimentelles Werkzeug benutzt werden, um das Zusammenspiel der unterschiedlichen Effekte von Peroxynitrit zu untersuchen (siehe 4.6).

#### **4.4 Epicatechin schützt gleichermaßen gut gegen Tyrosinmodifikationen in hydrophilen und hydrophoben Umgebungen**

Es konnte gezeigt werden, daß das Flavanol (–)-Epicatechin durch Peroxynitrit hervorgerufene Tyrosinmodifikationen in hydrophilen Umgebung effektiv unterbindet, sowohl Nitrierung als auch Dimerisierung. Ähnlich guten Schutz zeigt (–)-Epicatechin in hydrophobem Milieu mit dem Tyrosinanalogen BTBE als Zielmolekül für Peroxynitrit (Abbildung 3.8; Abbildung 3.9). Da für die Bildung beider Produkte – 3-Nitroderivate und Dimere – eine Beteiligung des Tyrosylradikals diskutiert wird (Radi et al., 2001; Zhang et al., 2001), ist es sehr wahrscheinlich, daß die Wirksamkeit von Epicatechin in seiner hohen Abfangleistung gegen das Tyrosylradikal begründet ist. Diese potentielle Wirkung von Epicatechin ist in Abbildung 4.1 zusammengefasst.



#### 4.5 Oligomere des Epicatechins besitzen eine dem Monomer vergleichbare Schutzwirkung

Die Procyanidinoligomere sind in der hydrophilen Phase – betrachtet auf Monomerbasis – ähnlich effektiv hinsichtlich des Schutzes gegen Peroxynitrit wie das Monomer, was sich mit früheren Ergebnissen (Arteel und Sies, 1999) deckt. In der hydrophoben Phase können die Oligomere ebenfalls ähnlich gut schützen wie das Monomer, wenn auch in keinem Fall ebenso gut oder besser. Die Verschlechterung des Schutzes vor Peroxynitrit mit der steigenden Kettenlänge der Oligomere läßt vermuten, daß eine verminderte Beweglichkeit der Oligomere in der Membran hierfür verantwortlich ist. Zusammenfassend ist festzuhalten, daß nicht nur das Epicatechinmonomer, sondern auch die Oligomere als Quelle für den Schutz ge-

---

gen Peroxynitrit dienen können, obwohl das Ausmaß ihrer Bioverfügbarkeit noch nicht endgültig geklärt ist (Spencer et al., 2000; 2001a; 2001b).

#### **4.6 Bei der Aktivierung von Stresskinasen durch Peroxynitrit spielt die Nitrierung von Tyrosin keine Hauptrolle**

In lebenden Zellen werden zwei Bedeutungen der Nitrierung von Tyrosinresten diskutiert: Zum einen das Verhindern der Tyrosinphosphorylierung und zum anderen Konformationsänderungen in Proteinen, welche z.B. zur Aktivierung von Kinasen führen können. Hier werden sowohl Kinasen untersucht, deren Aktivierung auf Rezeptortyrosinkinasen (Akt und ERK1/2) zurückgeht und für die somit die Phosphorylierung von Tyrosinresten essentiell ist, als auch die klassische Stresskinase p38. Durch den Einsatz niedriger Epicatechinkonzentrationen als experimentelles Werkzeug kann jedoch gezeigt werden, daß die Aktivierung der Stresskinasen Akt/PKB, ERK1/2 und p38 bei Epicatechinkonzentrationen stattfindet, welche im zellulären System die peroxynitritinduzierte Tyrosinnitrierung bereits vollständig unterdrücken aber keinen Effekt auf die Oxidation durch Peroxynitrit haben (Abbildung 3.11; Abbildung 3.13). Eine entscheidende Rolle der Nitrierung von Tyrosinen durch Peroxynitrit in der Signaltransduktion kann für die untersuchten Kinasen demnach ausgeschlossen werden. Desweiteren kann diese Aussage aufgrund der Ergebnisse zum Schutz vor Dimerisierung von Tyrosinen durch Epicatechin auch auf die Bedeutung der Tyrosindimerisierung in der Zelle ausgeweitet werden.

#### **4.7 Die biologische Bedeutung des Epicatechin – Einordnung dieser Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Epicatechin auf mehreren Ebenen Schutz gegen Peroxynitrit bietet. Es zeigt sich ein effektiver Schutz gegen die Nitrierung und Dimerisierung der Aminosäure Tyrosin, wohingegen der Schutz gegen die Oxidation anderer Zielmoleküle zwar signifikant ist, jedoch um mindestens zwei Größenordnungen niedriger liegt. Es konnte ferner ge-

---

zeigt werden, daß Epicatechin und seine Oligomere sowohl in hydrophilen als auch in hydrophoben Umgebungen wirksam sind.

Es konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß Zellen mit Epicatechin beladen werden können und dies zu einem Schutz der Zellen gegen eine spätere Peroxynitritbehandlung führt.

Schließlich kann Epicatechin ein effektives Werkzeug zur Unterscheidung der Peroxynitrit-vermittelten Effekte sein und so, wie am Beispiel mehrerer Kinasen aufgezeigt, zum besseren Verständnis der Aktivierung zellulärer Signalkaskaden durch Peroxynitrit beitragen.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Entzündungsmediator Peroxynitrit wird im Organismus aus Stickstoffmonoxid und Superoxidradikalanionen gebildet und dient der Abwehr eindringender Mikroorganismen, basierend auf seiner stark oxidierenden und nitrierenden Wirkung, die z.B. zur Modifikation von Proteinen und Nukleinsäuren führt. Doch auch körpereigene Zellen im entzündeten Gewebe können davon betroffen werden, so daß ein Schutz vor Peroxynitrit notwendig ist. In der vorliegenden Arbeit wurde das Flavanol Epicatechin, das etwa über Schokoladen und grünen Tee mit der Nahrung verfügbar ist, hinsichtlich einer solchen Schutzfunktion untersucht.

Dabei zeigte sich, daß Epicatechin auf mehreren Ebenen vor den Wirkungen des Peroxynitrit schützt: (i) Isolierte Enzyme, wie Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase oder Lipoygenase-1, werden durch Peroxynitrit inaktiviert und an Tyrosinresten nitriert. (ii) Die Thiolkonzentration in Zelllysaten aus Endothelzellen nimmt nach Behandlung mit Peroxynitrit ab; gleichzeitig ist Tyrosinnitrierung in den so behandelten Lysaten feststellbar. (iii) Behandlung kultivierter Aortaendothelzellen mit Peroxynitrit führt zur Oxidation intrazellulären Dichlordihydrofluoresceins und wiederum zur Nitrierung von Tyrosinen. In all diesen Fällen vermag Epicatechin die jeweiligen Effekte zu unterdrücken, wobei die zum halbmaximalen Schutz vor peroxynitritinduzierter Tyrosinnitrierung notwendigen Epicatechinkonzentrationen mindestens zwei Größenordnungen geringer sind als die zum Verhindern der jeweiligen Oxidationen nötigen. In diesem Zusammenhang wurde in Aufnahmestudien zudem gezeigt, daß Zellen Epicatechin inkorporieren und so einen Schutz vor Peroxynitrit erwerben. Die Aktivierung der Proteinkinasen p38, ERK1/2 und Akt (Proteinkinase B), die durch Peroxynitrit hervorgerufen wurde, erwies sich durch Einsatz von Epicatechin als unabhängig von der Nitrierung proteingebundener Tyrosinreste.

Es zeigte sich weiterhin, daß Epicatechin nicht nur die durch Peroxynitrit hervorgerufene Nitrierung, sondern auch die Dimerisierung sowohl des Tyrosins als auch des in Liposomen inkorporierten lipophilen Tyrosinderivats BTBE gleichermaßen effizient verhindert. Nicht nur das Epicatechinmonomer, sondern auch die Procyanidine des Epicatechins bieten einen solchen Schutz gegen die Wirkungen von Peroxynitrit.

---

## 6 LITERATUR

- 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., und Schmitz, H. H. (1999). HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Ag. Food Chem.* *47*, 4184-4188.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., und Radi, R. (1996). Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.* *9*, 390-396.
- Arteel, G. E., Briviba, K., und Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett.* *445*, 226-230.
- Arteel, G. E., Schroeder, P., und Sies, H. (2000). Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J. Nutr.* *130*, 2100S-2104S.
- Arteel, G. E., und Sies, H. (1999). Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett.* *462*, 167-170.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Muto, Y., Takizawa, T., und Terao, J. (2001). In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J. Nutr.* *131*, 2885-2891.
- Bartlett, D., Church, D. F., Bounds, P. L., und Koppenol, W. H. (1995). The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* *18*, 85-92.
- Beckman, J. S. (1996). The physiological and pathophysiological chemistry of nitric oxide. In: *Nitric oxide: principles and actions*, J. Lancaster, ed. (San Diego, CA: Academic Press), pp. 1-82.

- 
- Beckman, J. S., Ye, Y. Z., Anderson, P. G., Chen, J., Accavitti, M. A., Tarpey, M. M., and White, C. R. (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375, 81-88.
- Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1998). Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem. Res Toxicol.* 11, 1398-1401.
- Carbonaro, M., Grant, G., and Pusztai, A. (2001). Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur. J. Nutr.* 40, 84-90.
- Crow, J. P., Ye, Y. Z., Strong, M., Kirk, M., Barnes, S., and Beckman, J. S. (1997). Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. *J. Neurochem.* 69, 1945-1953.
- da Silva, E. L., and Abdalla, D. S. P. (1998). Increased metabolism of peroxynitrite-modified [<sup>125</sup>I] b-VLDL by monocytes from hypercholesterolemic rabbits. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 343-353.
- De Groot, H., and Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12, 249-255.
- Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996). Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49-58.
- Donovan, J. L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., and Remesy, C. (2001). Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J. Nutr.* 131, 1753-1757.
- Douki, T., and Cadet, J. (1996). Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radic. Res* 24, 369-380.

- 
- Eiserich, J. P., Cross, C. E., Jones, A. D., Halliwell, B., und van der Vliet, A. (1996). Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. *J. Biol. Chem.* *271*, 19199-19208.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* *82*, 70-77.
- Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Briviba, K., und Sies, H. (1996). DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* *24*, 4105-4110.
- Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., und Wever, R. (1993). Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.* *215*, 767-775.
- Formica, J. V., und Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* *33*, 1061-1080.
- Goldstein, S., und Czapski, G. (1995). The reaction of NO. with O<sub>2</sub><sup>-</sup> and HO<sub>2</sub>·: a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.* *19*, 505-510.
- Goss, S. P., Singh, R. J., Hogg, N., und Kalyanaraman, B. (1999). Reactions of \*NO, \*NO<sub>2</sub> and peroxynitrite in membranes: physiological implications. *Free Radic. Res.* *31*, 597-606.
- Graham, A., Hogg, N., Kalyanaraman, B., O'Leary, V., Darley-Usmar, V., und Moncada, S. (1993). Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* *330*, 181-185.
- Greenacre, S. A. B., und Ischiropoulos, H. (2001). Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Rad. Res.* *34*, 541-581.

- 
- Grune, T., Klotz, L., Gieche, J., Rudeck, M., and Sies, H. (2001). Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* *30*, 1243-1253.
- 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. Ag. Food Chem.* *47*, 490-496.
- Hooper, D. C., Bagasra, O., Marini, J. C., Zborek, A., Ohnishi, S. T., Kean, R., Champion, J. M., Sarker, A. B., Bobroski, L., Farber, J. L., Akaike, T., Maeda, H., and Koprowski, H. (1997). Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 2528-2533.
- Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993). The reaction of no with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* *18*, 195-199.
- Inoue, S., and Kawanishi, S. (1987). Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res.* *47*, 6522-6527.
- Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* *356*, 1-11.
- Ischiropoulos, H., and Al-Mehdi, A. B. (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* *364*, 279-282.
- Kerry, N., and Rice-Evans, C. (1998). Peroxynitrite oxidises catechols to o-quinones. *FEBS Lett.* *437*, 167-171.

- 
- Khairutdinov, R. F., Coddington, J. W., und Hurst, J. K. (2000). Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* 39, 14238-14249.
- Kilinc, K., Kilinc, A., Wolf, R. E., und Grisham, M. B. (2001). Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 273-276.
- Kim, M. R., und Sok, D. E. (1991). Irreversible inhibition of soybean lipoxygenase-1 by hydroperoxy acids as substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 270-275.
- Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., und Koppenol, W. H. (1997). Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1285-1292.
- Klotz, L.-O. (2002). Oxidant-induced Signaling: Effects of Peroxynitrit and Singlet Oxygen. *Biol. Chem.* 383, xxx-xxx.
- Klotz, L. O., Schieke, S. M., Sies, H., und Holbrook, N. J. (2000). Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. *Biochem. J.* 352, 219-225.
- Kong, S. K., Yim, M. B., Stadtman, E. R., und Chock, P. B. (1996). Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH<sub>2</sub> peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3377-3382.
- Koppenol, W. H. (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 385-391.
- Koppenol, W. H., Kissner, R., und Beckman, J. S. (1996). Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? *Methods Enzymol.* 269, 296-302.

- 
- Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite: a cloaked oxidant from superoxide and nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.* *5*, 834-842.
- Kuhnle, G., Spencer, J. P., Schroeter, H., Shenoy, B., Debnam, E. S., Srail, 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.
- Kulkarni, A. P., Mitra, A., Chaudhuri, J., Byczkowski, J. Z., and Richards, I. (1990). Hydrogen peroxide: a potent activator of dioxygenase activity of soybean lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *166*, 417-423.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* *227*, 680-685.
- Layfield, R., Alban, A., Mayer, R. J., and Lowe, J. (2001). The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *27*, 171-179.
- Leo, A., Hansch, C., and Elkins, D. (1971). Partition Coefficients and Their Uses. *Chemical Reviews* *71*, 525-616.
- Macfadyen, A. J., Reiter, C., Zhuang, Y., and Beckman, J. S. (1999). A novel superoxide dismutase-based trap for peroxynitrite used to detect entry of peroxynitrite into erythrocyte ghosts. *Chem. Res. Toxicol.* *12*, 223-229.
- MacMillan-Crow, L. A., and Thompson, J. A. (1999). Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* *366*, 82-88.
- Malencik, D. A., Sprouse, J. F., Swanson, C. A., and Anderson, S. R. (1996). Dityrosine: preparation, isolation, and analysis. *Anal. Biochem.* *242*, 202-213.

- 
- Marla, S. S., Lee, J., and Groves, J. T. (1997). Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 14243-14248.
- Masumoto, H., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1996). Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. *FEBS Lett.* 398, 179-182.
- Matheis, G., Sherman, M. P., Buckberg, G. D., Haybron, D. M., Young, H. H., and Ignarro, L. J. (1992). Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am. J. Physiol.* 262, H616-H620.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function of erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- 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.
- Moridani, M. Y., Sobie, H., Salehi, P., and O'Brien, P. J. (2000). Catechin metabolism: Glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome P450. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 841-848
- Panasenko, O. M., Briviba, K., Klotz, L.-O., and Sies, H. (1997). Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 343, 254-259.
- Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B. I., Norris, E. H., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Ischiropoulos, H. (2001). Induction of alpha-synuclein aggregation by intracellular nitrative insult. *J. Neurosci.* 21, 8053-8061.
- Pfeiffer, S., Lass, A., Schmidt, K., and Mayer, B. (2001). Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 276, 34051-34058.

- 
- Pryor, W. A., und Squadrito, G. L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide [see comments]. *Am. J. Physiol* 268, L699-L722.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., und Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481-487.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M., und Cayota, A. (2001). Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 463-488.
- Renaud, S. und de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339 (8808), 1523-1526
- Rein, D., Lotito, S., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H., und 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., Pagliaroni, T. G., Pearson, D. A., Wun, T., Schmitz, H. H., Gosselin, R., und Keen, C. L. (2000b). Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J. Nutr.* 130, 2120S-2126S.
- Robak, J., und Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37, 837-841.
- Salgo, M. G., Stone, K., Squadrito, G. L., Battista, J. R., und Pryor, W. A. (1995). Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 1025-1030.
- Scalbert, A., und Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S.

---

Schewe, T., Sadik, C., Klotz, L. O., Yoshimoto, T., Kuhn, H., und Sies, H. (2001). Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol. Chem.* 382, 1687-1696.

Schewe, T. ... (2002). Titel, in press

Schieke, S. M., Briviba, K., Klotz, L. O., und Sies, H. (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* 448, 301-303.

Sies, H., Sharov, V. S., Klotz, L.-O., und Briviba, K. (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 27812-27817.

Skinner, K. A., White, C. R., Patel, R., Tan, S., Barnes, S., Kirk, M., Darley-Usmar, V., und Parks, D. A. (1998). Nitrosation of uric acid by peroxynitrite: formation of a vasoactive nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.* 273, 24491-24497.

Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S., und Ischiropoulos, H. (1999). Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* 371, 169-178.

Souza, J. M., und Radi, R. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 360, 187-194.

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

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

- 
- Spencer, J. P., Schroeter, H., Shenoy, B., Srai, S. K., Debnam, E. S., and Rice-Evans, C. (2001b). Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *285*, 588-593.
- Tibi, S. und Koppenol, W. H. (2000). Reactions of Peroxynitrite with Phenolic and Carnoyl Compounds: Flavonoids are not Scavengers of Peroxynitrit. *Helvetica Chimica Acta* *83*, 2412-2424
- Towbin, H., Stsehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 4303-4308.
- van Acker, S. A. B. E., Tromp, M. N. J. L., Haenen, G. R. M. M., van der Vijgh, W. J. F., und Bast, A. (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *214*, 755-759.
- Wang, J. F., Schramm, D. D., Holt, R. R., Ensunsa, J. L., Fraga, C. G., Schmitz, H. H., und Keen, C. L. (2000). A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J. Nutr.* *130*, 2115S-2119S.
- Whitaker, J. R., und Granum, P. E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* *109*, 156-159.
- White, C. R., Brock, T. A., Chang, L. Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W. A., Gianturco, S. H., Gore, J., und Freeman, B. A. (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 1044-1048.
- White, C. R., Darley-Usmar, V., Berrington, W. R., McAdams, M., Gore, J. Z., Thompson, J. A., Parks, D. A., Tarpey, M. M., und Freeman, B. A. (1996).

---

Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8745-8749.

Yang, B., Kotani, A., Arai, K., und Kusu, F. (2001). Relationship of electrochemical oxidation of catechin on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 747-751

Zhang, H., Joseph, J., Feix, J., Hogg, N., und Kalyanaraman, B. (2001). Nitration and oxidation of a hydrophobic tyrosine probe by peroxynitrite in membranes: comparison with nitration and oxidation of tyrosine by peroxynitrite in aqueous solution. *Biochemistry* 40, 7675-7686.

Zhang, P., Wang, Y. Z., Kagan, E., und Bonner, J. C. (2000). Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J. Biol. Chem.* 275, 22479-22486.

Zou, M., Martin, C., und Ullrich, V. (1997). Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.* 378, 707-713.

---

## 7 ANHANG

### **Anhang 1: Lebenslauf Peter Schröder**

- 05.02.1969            Geburt als Kind von Ingeborg Maria Wilhelmine Schröder, geb. Plum (Dipl.-Ing.) und Friedhelm Josef Schröder (Großhandelskaufmann) in Duisdorf, jetzt Bonn-Duisdorf
- 07/1975 – 06/1979    Katholische Grundschule Nordstraße, Mönchengladbach-Rheydt
- 07/1979 - 06/1988    Gymnasium an der Gartenstraße, Mönchengladbach-Rheydt  
Abitur: 13. Juni 1988
- 10/1988 – 03/1989    Studium der Informatik, EWH Koblenz
- 04/1989 – 09/1989    Studium der Chemie, Universität Köln
- 10/1989 – 03/2000    Studium der Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 10/1992                Beginn des Studiums der Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 09/1998 – 10/1998    Diplomprüfungen
- 01/1999 – 10/1999    Diplomarbeit am Institut für Tierphysiologie (Prof. Bridges; Prof. Grieshaber) zum Thema „Steroidhormonverteilung bei pelagischen Fischen“  
Diplom: 13. Oktober 1999
- 01/2000                Beginn der Doktorarbeit im Institut für Physiologische Chemie I (Prof. Sies) zum Thema „Die biologische Bedeutung des Flavonoids Epicatechin im Schutz vor Peroxynitrit“

---

## **Anhang 2: Schriftenverzeichnis**

### **Originalarbeiten:**

Cristopher R. Bridges, Peter Schroeder, Vito Susca, A. Corriero, M. Deflorio and Gregorio De Metrio (2000). *A New Muscle Biopsy Technique for SEX and Sexual Maturity Determination in Large Pelagic Fishes*. ICCAT Scientific Report SCRS/2000/19

Peter Schroeder, Lars-Oliver Klotz, Darius P. Buchczyk, Christian P. Sadik, Tankred Schewe, and Helmut Sies (2001). *Epicatechin Selectively Prevents Nitration but Not Oxidation Reactions of Peroxynitrite*; BBRC 285, 782-787

Peter Schroeder, Hao Zhang, Lars-Oliver Klotz, Balaraman Kalyanaraman, and Helmut Sies. (2001). *(-)-Epicatechin Inhibits Nitration and Dimerization of Tyrosine in Hydrophilic as Well as Hydrophobic Environments*; BBRC 289, 1334-1338

### **Übersichtsartikel:**

Gavin E. Arteel, Peter Schroeder, and Helmut Sies. (2000). *Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers*. J. Nutr. 130, 2100S-2104S.

Lars-Oliver Klotz, Peter Schroeder, and Helmut Sies. (2002). *Peroxynitrite Signaling: Receptor Tyrosine Kinase and Activation of Stress-Responsive Pathways*. FRBM, im Druck

### **Tagungsbeiträge:**

Gavin E. Arteel, Peter Schroeder, and Helmut Sies: *Peroxynitrite protection by cocoa polyphenol oligomers*. Oxygen Club of California 2000 World Congress, March 1-4, 2000; Santa Barbara, California, USA

Helmut Sies, Gavin E. Arteel, Peter Schroeder, and Lars-Oliver Klotz: *Cocoa Polyphenols and Peroxynitrite: where do we go from here?* XX<sup>th</sup> Conference on Polyphenols, September 11-15, 2000; Freising-Weihenstephan, Germany

Helmut Sies, Niloofar Ale-Agha, and Peter Schroeder: *Peroxynitrite and Gap Junctional Communication: Polyphenols and Selenium*. Oxygen Club of California 2001 World Congress, March 7-10, 2001; Santa Barbara, California, USA

Tankred Schewe, Christian D. Sadik, Peter Schroeder, Lars-Oliver Klotz, and Helmut Sies: *Cocoa Polyphenols Inhibit Mammalian Lipoxygenase-1*. Oxygen Club of California 2001 World Congress, March 7-10, 2001; Santa Barbara, California, USA

Peter Schroeder, Lars-Oliver Klotz, Darius P. Buchczyk, Christian D. Sadik, Tankred Schewe, and Helmut Sies. *Epicatechin Efficiently Prevents Nitration but not Oxidation Reactions of Peroxynitrite*. Herbsttagung der GBM, September 9-12, 2001, Bochum, Germany

Lars-Oliver Klotz, Peter Schroeder, Nikki J. Holbrook, and Helmut Sies. *Peroxynitrite and Cellular Signaling: Oxidation vs. Nitration*. 5<sup>th</sup> Jointed Signal Transduction Society Meeting, November 8-10, 2001; Weimar, Germany

---

### **Anhang 3: Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Sies für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die umfassende Betreuung und Unterstützung.

Herrn Professor Krause danke ich dafür, daß er als Korreferent zur Verfügung steht und die fakultätsübergreifende Betreuung ermöglicht.

Ich danke Herrn Privatdozent Klotz für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten, die Einführung in die Signaltransduktion und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Den Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie I der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die vielen Hilfestellungen in fachlichen und anderen Fragen. Es würde an dieser Stelle zu weit führen einzelne Personen hervorzuheben, obwohl manche dies sicherlich verdient haben.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter, für das Vertrauen in mich und für ihre vielfältige Unterstützung auf unzähligen Gebieten. Auch möchte ich meinen Großeltern danken für deren Unterstützung mir in vielerlei Gestalt zuteil wurde.

Herzlichen Dank an meine Kommilitonen und Freunde, für ihre Unterstützung und vor allem dafür, daß sie mich in schwierigen Zeiten ertragen haben.

Danke an Chaplin Schröder für seine enorm scharfsinnigen Kommentare sowie die aufbauende Bestätigung zur rechten Zeit.

Schließlich möchte ich meiner Partnerin Verena Reimann danken, die auch diesen Teil meiner akademischen Ausbildung durch ihre Hilfsbereitschaft, Verständnis und Vertrauen ermöglicht hat.

---

**Anhang 4: Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

(Peter Schröder)

Düsseldorf, den 29. April 2002