Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies

Zur Wirkung von Flavonoiden des Kakaos auf Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung von menschlichem LDL

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Tilo Krämer

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.:

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

Referent: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies, Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda, Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen 1

1. Einleitung 3

1.1 Atherosklerose 3
1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose 3
1.2 Kurze Einführung in den Lipidstoffwechsel 8
1.2.1 LDL – Lipoprotein niedriger Dichte 9
1.3 Myeloperoxidase 10
1.3.1 Reaktionen der MPO 11
1.3.2 Die MPO und der NO-Stoffwechsel 13
1.3.3 Die MPO – Freund oder Feind? 13
1.4 Kakao – Die Speise der Götter 14
1.4.1 Kakao-Flavonoide 15
1.5 Ziel der Arbeit 19
1.5.1 *In-vitro*-Modell für die oxidative Modifizierung von LDL 19
1.5.2 Hemmung der Lipidperoxidation mit Kakao-Flavonoiden 19
1.5.3 Vergleich der Wirkungen von MPO und Peroxynitrit 20
1.5.4 Hemmung der Protein-Tyrosinnitrierung mit Kakao-Flavonoiden .. 20

2. Material und Methoden 21

2.1 Materialien 21
2.1.1 Enzyme, Chemikalien und Lösungsmittel 21
2.1.2 Lösungen 22
2.1.3 Antikörper 23
2.1.4 Peroxynitrit – Synthese 24
2.1.5 Herstellung der Flavonoid-Stammlösungen 24
2.2 Methoden 25
2.2.1 LDL-Präparation 25
2.2.1.1 Blutentnahme und Serumgewinnung 25
2.2.1.2 LDL-Isolierung über eine Einstufen-Kurzzeit-Ultrazentrifugation 25

2.2.1.3 Entsalzung des LDL 26
2.2.1.4. Aufbewahrung des LDL 26
2.2.1.5 Bestimmung der Cholesterolkonzentration 26
2.2.2 Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen 27
2.2.3 Lipidperoxidation des LDL durch MPO 29
2.2.3.1 Herstellung der Enzym-Stammlösungen 29
2.2.3.2 Verdünnung der Enzym-Stammlösungen für die Reaktionsansätze 29
2.2.3.3 Versuchsdurchführung 30
2.2.4 Lipidextraktion 31
2.2.6 Dot–Blot 32

3. Ergebnisse 33

3.1 Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen 33
3.1.1 Hemmung durch (–)-Epicatechin 33
3.1.2 Hemmung durch (+)-Catechin 34
3.1.3 Hemmung durch Quercetin 36
3.2 Lipidperoxidation des LDL durch MPO 37
3.2.1 Etablierung der Methode 37
3.2.2 Das H_2O_2-Bolus-System 37
3.2.3 Das MPO/GOD-System 41
3.2.3.1 Optimierung der Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz mit Nitrit plus Chlorid 42
3.2.3.2 Optimierung der Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz mit Nitrit allein 43
3.2.3.3 Die Substrate der MPO 45
3.2.4 Hemmung der Lipidperoxidation des LDL im MPO/GOD-System durch (–)-Epicatechin und seine Metaboliten 3'-O-Methylepicatechin und 3'-O-Methylepicatechin-Glucuronid 46
3.2.5 Hemmung der basalen Lipidperoxidation des LDL durch MPO mit (–)-Epicatechin 51
3.3 Protein-Tyrosinnitrierung des LDL durch MPO 53

3.3.1 Etablierung der Methode 53
3.3.2 Vergleich von MPO und Peroxynitrit hinsichtlich Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung des LDL 53
3.3.3 Der Einfluss von CO_2 auf die Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung des LDL 55
3.3.4 Hemmung der Protein-Tyrosinnitrierung des LDL durch (–)-Epicatechin 57
3.3.5 Wirkung der MPO auf nitriertes LDL 59

4. Diskussion 60

4.1 Handhabung und Anwendungsmöglichkeiten des MPO/GOD-Systems 60
4.2 Hemmung verschiedener Arten der Lipidperoxidation von LDL durch Flavonoide 63
4.3 Universalität der Schutzwirkung von Flavonoiden gegenüber atherogenen Modifizierungsreaktionen des LDL 65
4.4 Vergleich der Wirkungen von MPO und Peroxynitrit auf Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung von LDL 66

5. Zusammenfassung 68

6. Literaturverzeichnis 69

7. Anhang 80

7.1 Publikationen 80
7.1.1 Zeitschriftenbeiträge 80
7.1.2 Abstracts 80
7.1.3 Poster 80
7.2 Selbständigkeitserklärung 82
7.3 Curriculum vitae 83
7.4 Danksagung 84

Abkürzungen

τ_{lag}	Länge der Lag-Phase
Apo B-100	Apolipoprotein B-100
BSA	Rinder-Serumalbumin
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EC	(–)-Epicatechin
ED_{200}	Zur Verdopplung von τ_{lag} benötigte Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GOD	Glukoseoxidase
HB-EGF	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IC_{50}	Konzentration, bei der die Aktivität eines Enzyms um die Hälfte abnimmt
IDL	Lipoprotein mittlerer Dichte
IgG	Immunglobulin G
IL-1 beta	Interleukin-1 beta
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
LOX	Lipoxygenase
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1
MCSF	Monozyten-koloniestimulierender Faktor
MM-LDL	Minimal modifiziertes LDL
MPO	Myeloperoxidase
OxLDL	Oxidativ modifiziertes LDL
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor

TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TNF alpha	Tumornekrosefaktor alpha
VLDL	Lipoproteine sehr niedriger Dichte
X-LAM	Monozyten-bindende Adhäsionsmoleküle

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

Jedes Jahr versterben allein in Deutschland ca. 400.000 Menschen an Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen. Damit stellt sie mit ca. 30 % die häufigste Todesursache in Deutschland und anderen Industrienationen. Die häufigsten Folgeerkrankungen sind koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Myokard- und Hirninfarkt, die mit einer hohen Mortalität bzw. einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität einhergehen.

In den letzten Jahrzehnten wurden in epidemiologischen Untersuchungen wie der MRFIT- (Multiple Risk Factor Intervention Trial) oder der PROCAM- (Prospective Cardiovascular Münster) Studie zahlreiche Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose aufgedeckt. Zum einen gibt es nicht veränderbare Risikofaktoren wie Lebensalter, Geschlecht und familiäre Prädisposition. Zum anderen gibt es beeinflussbare Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperurikämie, Hypercholesterolämie, Hypertriacylglyerolämie, hohe Serumspiegel von LDL, Fibrinogen und Homocystein, niedrige HDL-Serumspiegel sowie Nikotinabusus, Bewegungsmangel, Adipositas und Stress. (KANNEL *et al*., 1986; ASSMANN *et al*., 1998).

1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Allgemein werden atherosklerotische Läsionen als eine Antwort der Gefäßwand auf eine bestehende Schädigung angesehen. Am Anfang steht eine lokale Schädigung des Endothels, die funktionelle oder toxische Ursachen haben kann (HOLVOET, 1999). Eine Hypercholesterolämie kann zu einer funktionell erhöhten Endothelpermeabilität führen. Oxidativ modifiziertes LDL oder Nikotin können das Endothel direkt toxisch schädigen.

Die endotheliale Dysfunktion zieht verschiedene Konsequenzen nach sich. Zum einen ist die Barrierefunktion der Intima beeinträchtigt, zum anderen kommt es zu einer Synthesestörung von Faktoren, welche eine Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel verhindern bzw. eine Relaxation der glatten Muskulatur bewirken können.

Oxidativ modifiziertes LDL ist ebenfalls an der Expression von Adhäsionsmembranproteinen für zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten maßgeblich beteiligt.

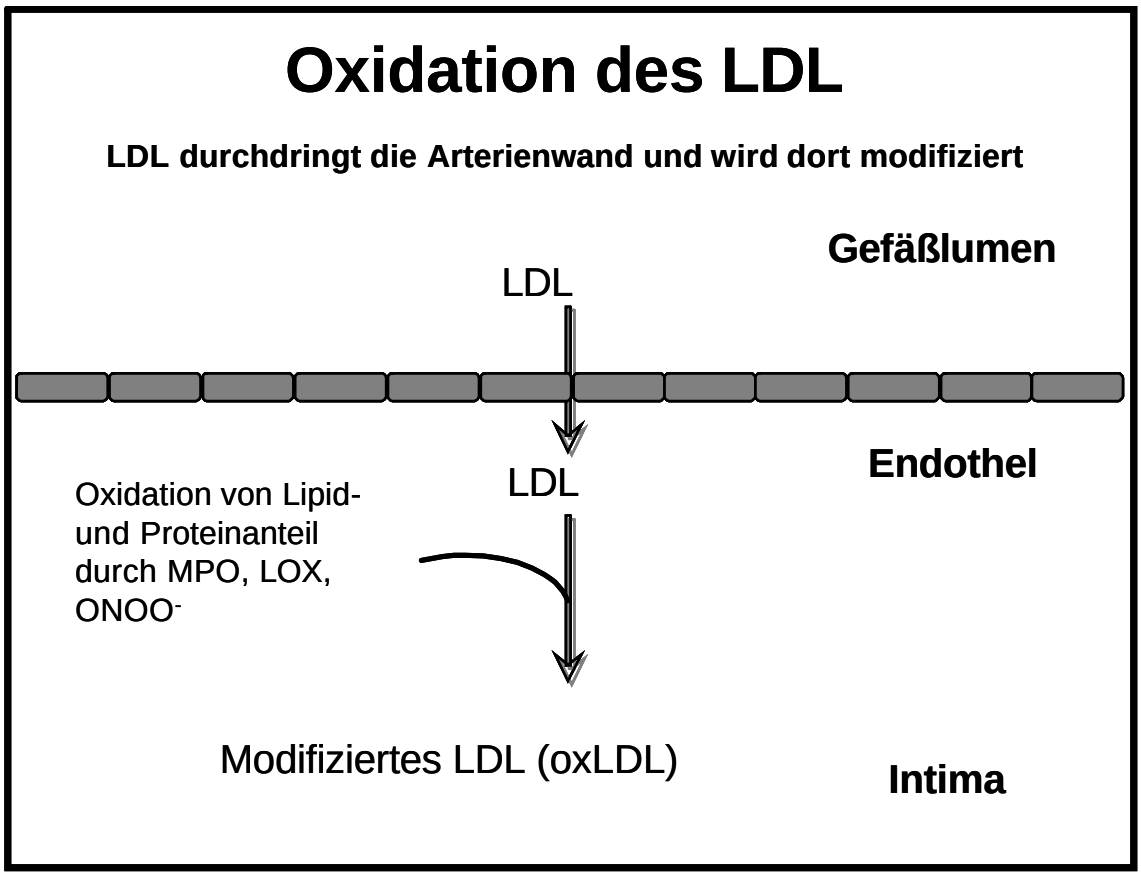


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Entstehung von oxLDL

Durch den Endothelschaden dringt das LDL in die Arterienintima ein und akkumuliert dort. In der Arterienintima ist das LDL einem anderen Milieu als im Plasma ausgesetzt. Als Agenzien, die hier für den oxidativen Stress verantwortlich sind, werden unter anderem freie und proteingebundene Metallionen (STEINBRECHER *et al*., 1984), Thiole (SPARROW und OLSZEWSKI, 1993), reaktive Sauerstoffspezies (JESSUP *et al*., 1993), die Lipoxygenasen (KÜHN *et al*., 1994; SCHEWE *et al*., 2001), die Myeloperoxidase (PODREZ *et al*., 2000) und Peroxynitrit diskutiert (BERLINER und HEINECKE, 1996; COX und COHEN, 1996) (Abb. 1.1).

Das LDL wird zunächst zu MM-LDL oxidiert und induziert in dieser Form die Synthese von Monozytenadhäsionsmolekülen, wie X-LAM, MCP-1 und MCSF. Diese Faktoren bewirken eine Monozytenadhäsion mit Einwanderung in die Gefäßwand und Differenzierung zu Makrophagen. Dies führt zu einer weiteren Oxidation des LDL zu verschiedenen Formen des oxLDL, welche proinflammatorische Eigenschaften aufweisen (STEINBERG, 1997). Wie Studien zeigen, spielt diese durch oxLDL hervorgerufene Entzündungsreaktion eine Schlüsselrolle bei der Atherogenese (CHISOLM und STEINBERG, 2000).

Die Makrophagen nehmen die oxLDL über Scavenger-Rezeptoren auf und degenerieren zu so genannten Schaumzellen („foam cells“). In diesem Stadium ist der Gefäßschaden histologisch als „fatty streak“ nachweisbar und noch reversibel.

Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aktivierung von medialen glatten Gefäßmuskelzellen mit Migration und Proliferation in die Intima, hervorgerufen durch Substanzen wie PDGF, FGF, IL-1, TNF alpha und HB-EGF. Sowohl oxLDL insgesamt, als auch einzelne Komponenten der LDL-Oxidation stimulieren die Synthese dieser Faktoren.

Die Muskelzellen beginnen daraufhin, extrazelluläre Matrix zu bilden, vor allem Kollagen I und III, Elastin und Proteoglykane. Durch diesen Prozess kommt es zu einer starken Zunahme der Intima mit Lumeneinengung des Gefäßes.

Als nächstes kommt es zu einem Absterben der Schaumzellen im Zentrum der Plaques, histologisch sichtbar als „necrotic core“. Es wird diskutiert, ob die Zellen durch Apoptose absterben, oder ob auch hier oxLDL eine Rolle spielen. Oxidierte LDL sind zellgiftig, und *in vitro* wurde ihre letale Wirkung auf Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen nachgewiesen.

In der Nähe des „necrotic core“ kommt es dann zu Kalzifizierungen durch Ablagerungen von Kalziumsalzen. *In vitro* wurde gezeigt, dass dies ein aktiver Prozess ist, vergleichbar mit der Ossifikation durch Osteoblasten.

Eine hämodynamische Relevanz solcher Gefäßwandveränderungen entsteht aber häufig erst dann, wenn aus diesen irreversiblen fibroatheromatösen Plaques über Plaqueeinriss, sekundäre Thrombusformation und Einblutung eine so genannte „complicated lesion“ entstanden ist. Häufig macht sich der atherosklerotische Prozess beim Patienten erst in diesem Stadium mit dem Auftreten einer entsprechenden klinischen Symptomatik bemerkbar (Abb. 1.2).

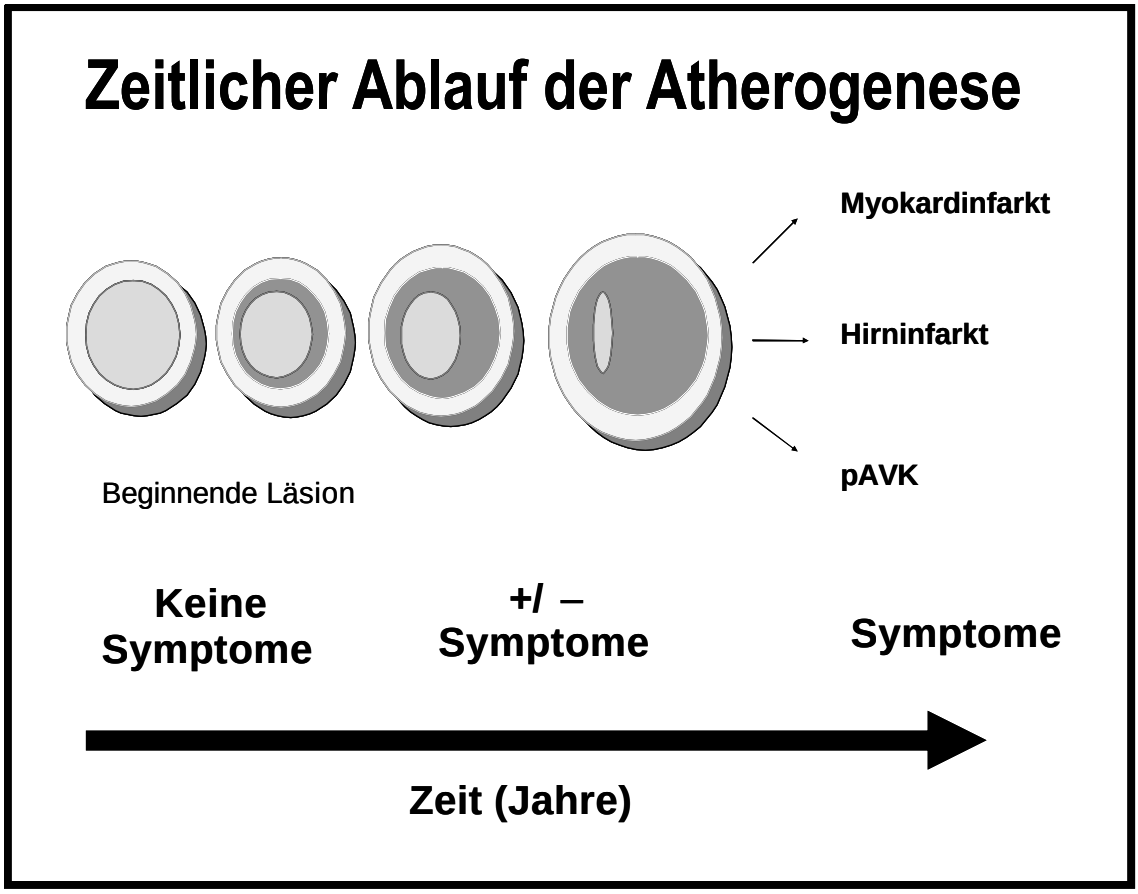


Abb. 1.2: Zeitlicher Ablauf der Atherogenese

Bei Männern muss bereits ab einem Serumcholesterolspiegel von 180 mg/dl bzw. ab einem LDL-Serumspiegel von 133 mg/dl mit einer exponentiellen Zunahme der KHK-Mortalität gerechnet werden (DOLECEK *et al*., 1986; STAMLER *et al*., 1986; ASSMANN *et al*., 1998).

1.2 Kurze Einführung in den Lipidstoffwechsel

Lipide sind eine heterogene Gruppe von Verbindungen mit wichtigen zellulären Funktionen. Fettsäuren, Cholesterol und die Vitamine E, D, K und A gehören zu den Lipiden ohne Esterbindung. Aus den mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen extrazelluläre Signalstoffe wie Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. Cholesterol dient als Membranbestandteil und ist Ausgangspunkt für die Biosynthese von Steroidhormonen und Gallensäuren.

Zu den Esterbindungen-enthaltenden Lipiden zählen die Glycerol- und Sphingosinlipide, sowie die Cholesterolester. Zu den Glycerollipiden zählen die Triacylglycerole, die den größten Energiespeicher des Organismus darstellen, und die Glycerophospholipide, die am Membranaufbau beteiligt sind.

Ein Problem des Lipidstoffwechsels ist der Transport der hydrophoben Lipide im wässrigen Medium Blut. Um sie transportfähig zu machen, werden die Lipide an spezifische Proteine, die Apolipoproteine gebunden. Diese Komplexe aus Lipiden und Proteinen nennt man Lipoproteine, die aufgrund ihrer Dichte in 5 Gruppen eingeteilt werden. Nach abnehmender Größe und zunehmender Dichte sind dies die Chylomikronen und Chylomikronen-Reste, VLDL, IDL, LDL und HDL.

Die Chylomikronen werden von der Darmmukosa gebildet und besorgen den Transport der Nahrungslipide vom Darm zur Leber. Nach Verlust der Triacylglycerole werden sie Chylomikronen-Reste genannt und von der Leber aufgenommen.

Die VLDL werden von der Leber synthetisiert und transportieren Triacylglycerole, Cholesterol und Phospholipide von der Leber zu den Geweben. Durch Abgabe von Fettsäuren gehen sie in IDL und LDL über. Das LDL versorgt die Gewebe mit Cholesterol.

Die HDL-Isoformen hingegen führen das in den Geweben gebildete, überschüssige Cholesterol wieder in die Leber zurück.

1.2.1 LDL – Lipoprotein niedriger Dichte

Das LDL hat eine Dichte von 1,019 - 1,063 g/ml und einen Durchmesser von 18 - 25 nm. Es besteht zu 6% aus Triacylglycerolen, zu 50% aus Cholesterol und Cholesterolestern, zu 22% aus Phospholipiden und zu 22% aus Apolipoproteinen, vor allem Apolipoprotein B-100 (Abb. 1.3).

Das LDL wird von den extrahepatischen Zellen nach Bindung des Apolipoproteins an zellmembranständige Rezeptoren mittels Endozytose aufgenommen. Die Aufnahme findet in so genannten „coated pits“ statt. Dies sind grubenförmige Bereiche der Membran, die mit dem Protein Clathrin vernetzt sind. Intrazellulär fusioniert das LDL mit Lysosomen. Das freigesetzte Cholesterol wird in Form von Cholesterolestern gespeichert. Um eine Cholesterolüberladung der Zelle zu verhindern, führt das freigesetzte Cholesterol zu einer Repression der endogenen zellulären Cholesterolsynthese.

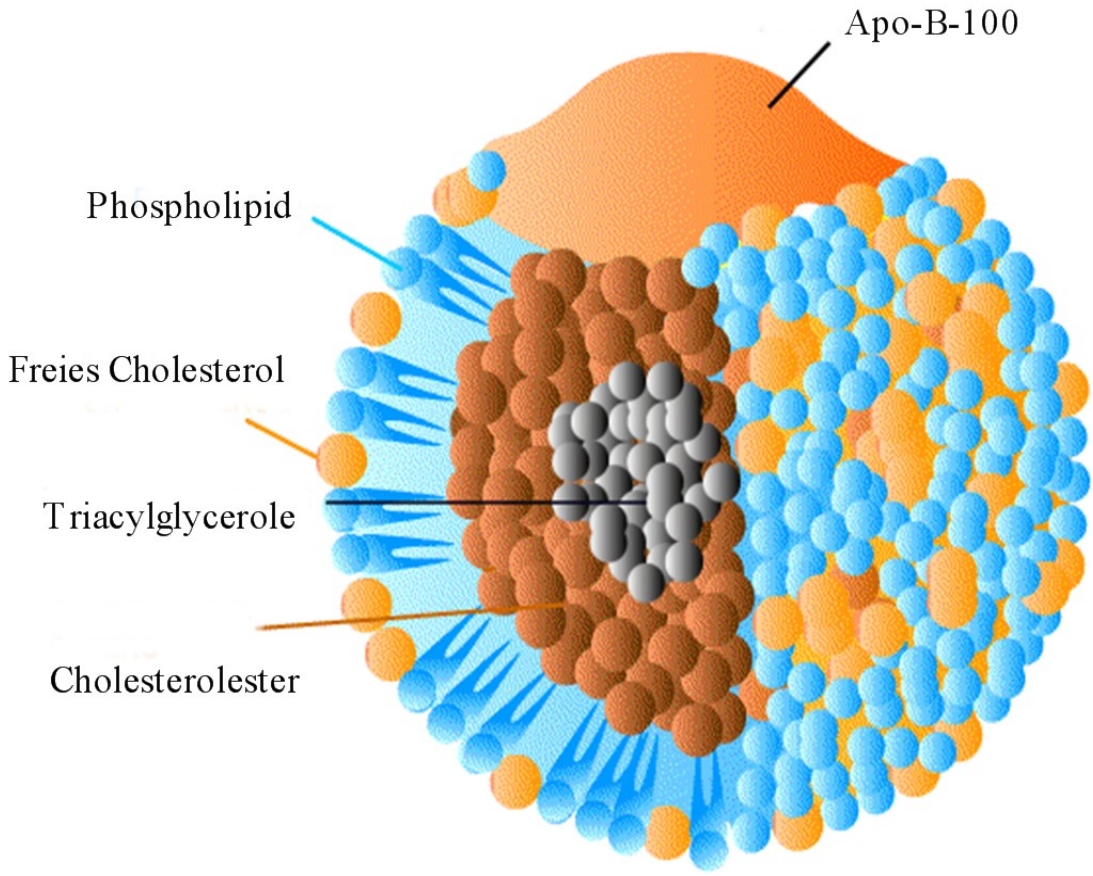


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des LDL (www.med.unibs.it)

1.3 Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase (MPO) ist eine Häm-Peroxidase, wie die Eosinophilenperoxidase, die Laktoperoxidase, die Schilddrüsenperoxidase und die Cyclooxygenasen. Sie besteht aus einem glykosylierten Homodimer mit einer Molekulargröße von 150 kDa, verbunden durch eine einzige Disulfidbrücke (Abb. 1.4).

Das Enzym findet man in neutrophilen Granulozyten und anderen Phagozyten, von denen es bei Aktivierung und Degranulation freigesetzt wird (PODREZ *et al*., 2000). Die biologische Rolle der MPO besteht in der Abtötung von Bakterien und Pilzen (ARATANI *et al*., 2004). Daneben ist sie auch beteiligt an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie Atherosklerose, multipler Sklerose (NAGRA *et al*., 1997) und Morbus Alzheimer (REYNOLDS *et al*., 1999; GREEN *et al*., 2004).

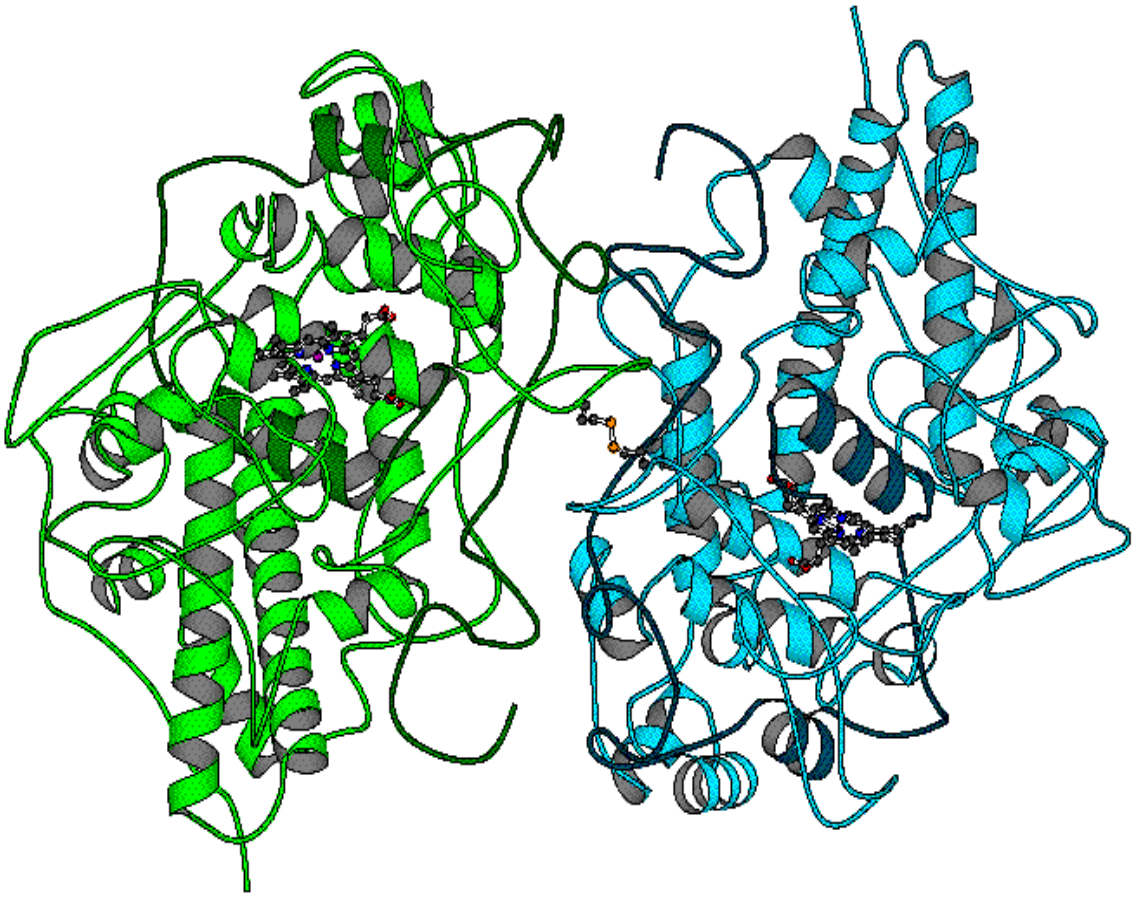


Abb. 1.4: Strukturmodell der Myeloperoxidase (FENNA *et al*., 1995)

Die MPO und ihre Reaktionsprodukte wurden in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen (DAUGHERTY *et al*., 1994), aber nicht in intakter Arterienintima (MALLE *et al*., 2000). MPO bindet an LDL und kann es zu oxLDL modifizieren, wie *in vitro* gezeigt wurde (CARR *et al*., 2000a).

Der Plasmaspiegel von MPO ist erhöht bei Patienten, die kurz vor einem Myokardinfarkt stehen, auch wenn andere Parameter wie Troponin T oder Kreatinkinase MB noch nicht nachgewiesen werden können. MPO ist hier ein hochsensitiver Marker, der auch klinisch benutzt werden kann, um Hochrisikopatienten zu identifizieren (BRENNAN *et al*., 2003).

1.3.1 Reaktionen der MPO

Die MPO ist ein Enzym mit verschiedenen Substraten, die in einem katalytischen Zyklus miteinander in Interaktion treten. Das wichtigste und essentielle Substrat ist Wasserstoffperoxid, das für alle Reaktionen benötigt wird. Zwei andere wichtige Substrate sind Chlorid und Nitrit.

1. $H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$

A) $NO_2^- + HOCl \rightarrow NO_2Cl + OH^-$

B) $R\text{-}NH_2 + 2\ HOCl \rightarrow R\text{-}NCl_2 + 2\ H_2O$

Die hypochlorige Säure (HOCl, veraltet: unterchlorige Säure) ist eine nur schwach dissoziierte Säure, die bakterizid wirkt und ein starkes Oxidationsmittel darstellt. Die Produkte dieser Reaktionen, NO_2Cl und $R\text{-}NCl_2$ bewirken eine Oxidation und Chlorierung von Proteinen (HAZELL und STOCKER, 1993; HAZELL *et al*., 1994).

2. $H_2O_2 + 2\ NO_2^- + 2\ H^+ \rightarrow 2\ NO_2^{\cdot} + 2\ H_2O$

Das hochreaktive NO_2-Radikal bewirkt die Peroxidation von Lipiden und die Tyrosinnitrierung von Proteinen (VAN DER VLIET *et al*., 1997; PFEIFFER *et al*., 2001).

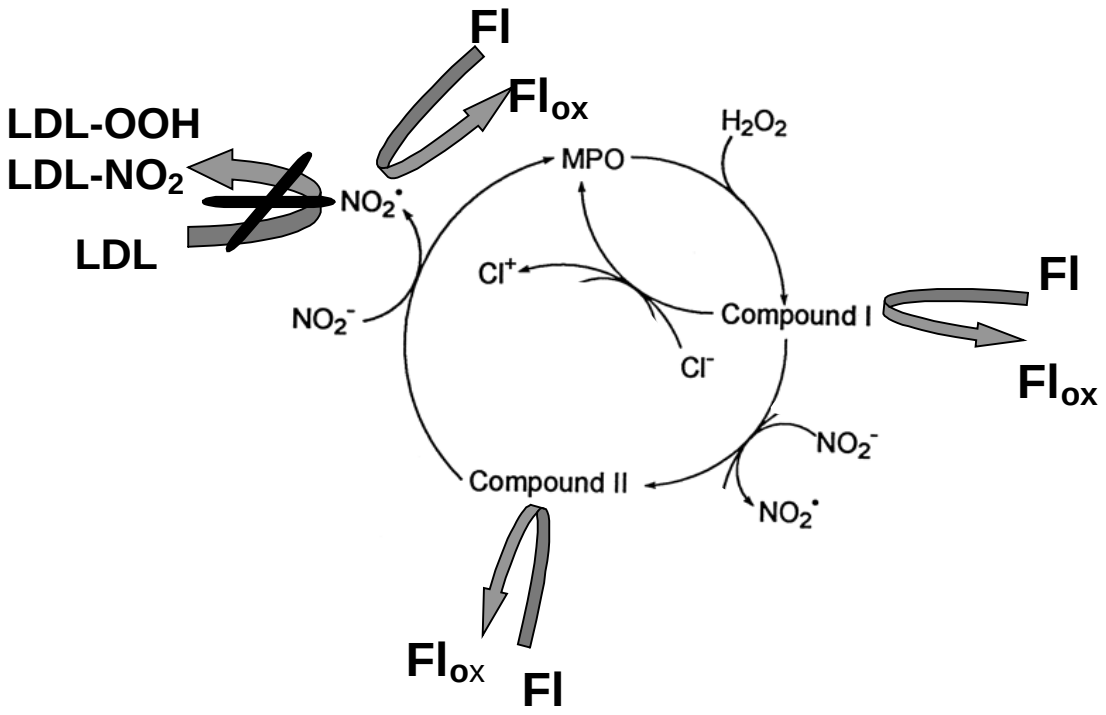


Abb. 1.5: Der katalytische Zyklus der MPO und die hypothetischen Angriffspunkte der Flavonoide (SIES *et al*., 2004)

Die Reaktionen der MPO laufen in einem katalytischen Zyklus mit mehreren aktiven Zwischenstufen ab (BURNER *et al*., 2000a, b; FURTMÜLLER *et al*., 2000) (Abb. 1.5). Die Gesamtheit der Reaktionen dieses Enzyms mit all seinen Substraten, Co-Substraten und Liganden ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Im ersten Schritt bildet H_2O_2 mit der MPO die Redox-Zwischenstufe Compound I. Diese oxidiert im zweiten Schritt Chlorid zur hypochlorigen Säure (HOCl). Compound I kann jedoch auch Nitrit zum Stickstoffdioxid-Radikal ($NO_2^{\bullet}$) oxidieren. Dabei entsteht Compound II, ebenfalls eine Redox-Zwischenstufe, die auch Nitrit zum Stickstoffdioxid-Radikal ($NO_2^{\bullet}$) oxidieren kann. Das Stickstoffdioxid-Radikal ($NO_2^{\bullet}$) ist hauptverantwortlich für die Lipidperoxidation und Proteinnitrierung des LDL (SCHMITT *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass Nitrit die MPO-vermittelte Lipidperoxidation von menschlichem LDL steigern kann (BUYN *et al.*, 1999; KOSTYUK *et al*., 2003).

Die hypothetischen Angriffspunkte der Flavonoide in diesem Zyklus sind Compound I, Compound II und das Stickstoffdioxid-Radikal ($NO_2^{\cdot}$), wobei die Flavonoide hier auch als Substrate der MPO dienen (KOSTYUK *et al*., 2003).

1.3.2 Die MPO und der NO-Stoffwechsel

Die MPO spielt eine bedeutende Rolle im NO-Stoffwechsel. Auf der einen Seite oxidiert sie NO aufgrund ihrer NO-Oxidase-Aktivität (EISERICH *et al*., 2002) und hebt somit dessen Wirkung auf den Organismus auf. Die MPO scheint auch direkt an der Regulation der induzierbaren NO-Synthase beteiligt zu sein (GALIJASEVIC *et al*., 2003).

Auf der anderen Seite wirkt NO_2^-, ein Oxidationsprodukt des NO, welches im Arteriengewebe in einer Konzentration von ca. 10 µM vorhanden ist (RODRIGUEZ *et al*., 2003), als Substrat der MPO (VAN DER VLIET *et al*., 1997; VAN DALEN *et al*., 2000). NO_2^- interagiert sowohl mit Compound I, als auch mit Compound II (BURNER *et al*., 2000a) unter Bildung des hochreaktiven Oxidations- und Nitrierungsagenz $NO_2^{\cdot}$ (BRENNAN *et al*., 2002). Dieses $NO_2^{\cdot}$ ist vermutlich auch *in vivo* an Lipidperoxidation (ZHANG *et al*., 2002) und Protein-Tyrosinnitrierung (BALDUS *et al*., 2001; BRENNAN *et al*., 2002) beteiligt.

1.3.3 Die MPO – Freund oder Feind?

Die Frage, ob die MPO dem menschlichen Organismus nun schadet oder nützt, lässt sich nicht einfach beantworten.

Zum einen ist sie eine wichtige Komponente des Abwehrsystems und für die Abtötung von Bakterien, Viren und Tumorzellen verantwortlich. Zum anderen wurde sie in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen und wirkt hier über die Oxidation von LDL zu oxLDL atherogen.

Es gibt jedoch auch Anhaltspunkte, dass die MPO anti-atherogenes Potenzial haben könnte. So wurde in Experimenten mit Knockout-Mäusen, die MPO nicht exprimieren können, nachgewiesen, dass bei diesen Tieren die Atherosklerose rascher voranschreitet, als bei Wildtyptieren. Auch Studien mit Patienten, die weniger MPO exprimieren als die Normalbevölkerung, erhärten dieses Beobachtung (ICHIMORI *et al*., 2003).

Ab einer NO_2^--Konzentration von 5 µM wurde ein signifikanter Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit der MPO beobachtet (PRAKOSAY, 2003). Diese Konzentration liegt innerhalb des Konzentrationsbereiches, der im Arteriengewebe gefunden wird (FEELISCH *et al*., 2002). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen kann die NO_2^--Konzentration deutlich ansteigen, z. B. auf bis zu 36 µM bei Patienten mit einer HIV-Infektion (TORRE *et al*., 1996). Aufgrund der daraus resultierenden schnelleren Reaktionsgeschwindigkeit der MPO wird zum einen die Immunantwort unterstützt, zum anderen kommt es jedoch auch zu unerwünschten Prozessen, wie der Entstehung von Atherosklerose.

1.4 Kakao – Die Speise der Götter

Kakao wird aus den gerösteten und gemahlenen Früchten des Kakaobaumes (Theobroma cacao, Abb. 1.6) gewonnen, der zu den Sterkuliengewächsen zählt und ursprünglich in Mittel- und Südamerika beheimatet war.

Abb. 1.6: Theobroma cacao (www.theobroma-cacao.de)

Schon die Olmeken, die um 1500 v. Chr. an der mexikanischen Golfküste siedelten, kultivierten den Kakaobaum und stellten aus den Kakaobohnen ein Getränk her. Sie überlieferten ihr Wissen an die Maya und Azteken, die dem Kakao göttlichen Ursprung nachsagten. Der Genuss des Kakaogetränks war ursprünglich nur Mitgliedern des Königshauses sowie hohen Offizieren

vorbehalten. Die Kakaobohnen dienten auch als Zahlungsmittel, und um die besten Anbaugebiete wurden sogar Kriege geführt.

Mit der Eroberung des Aztekenreiches durch die Spanier im Jahre 1521 gelangten die Europäer zum ersten Mal in Kontakt mit dem Kakao. Das bittere Getränk wirkte auf sie zunächst abschreckend. Als mit Zucker vermischter Kakao jedoch 1544 dem spanischen Königshof vorgestellt wurde, begann sein Siegeszug durch Europa.

Doch der Kakao diente nicht nur als Genussmittel. Schon die Azteken und Maya wussten um den medizinischen Gebrauch der an Kupfer, Eisen und Magnesium reichen Kakaobohnen. Auch in Europa wurde der Kakao zu medizinischen Zwecken eingesetzt. Die über 100 überlieferten Indikationen lassen sich auf drei Haupteinsatzgebiete reduzieren: Kakao diente zum einen der Gewichtszunahme von kachektischen, unterernährten Patienten. Dann sollte er das Nervensystem von apathischen und fiebernden Patienten stimulieren, und er wurde eingesetzt, um die Nieren- und Blasenfunktion zu verbessern. Neben diesen Einsatzgebieten wurde Kakao auch anderen Medikamenten zugesetzt, um deren Geschmack zu verbessern. (DILLINGER *et al.*, 2000)

1.4.1 Kakao-Flavonoide

Die Flavonoide sind natürliche Farbstoffe der Pflanzen, die zur Gruppe der Polyphenole gehören. ’Flavus’ ist die aus dem lateinischen abgeleitete Bezeichnung für gelbe Verbindungen. Von den Flavonoiden sind über 4.000 verschiedene Verbindungen bekannt, die in praktisch allen bunten Obst- und Gemüsearten vorkommen. Jedes Obst oder Gemüse enthält nur wenige Dutzend und immer eine etwas andere Kombination aus diesen 4.000 Verbindungen. Besonders reich an Flavonoiden sind Zwiebeln, Äpfel, Blaubeeren, Preiselbeeren, Weintrauben, Rotwein, grüner Tee und Kakaobohnen.

Die Pflanze bildet Flavonoide durch Kondensation von Kohlenstoff zu einer C6-C3-C6-Verbindung, dem Chalcon (2-Hydroxyphenyl-styrylketon, Abb. 1.7) von dem sich die Chalcone ableiten.

Reagiert die phenolische OH-Gruppe mit der Arylkette unter Ringschluss zu einem Fünferring erhält man die Grundstruktur der Aurone. Der Ringschluss zu einem Sechserring führt zur Grundstruktur der Flavane (2-Phenylchroman), die je nach Oxidationsgrad des sauerstoffhaltigen Rings weitere Grundverbindungen ergeben. So werden Stoffe mit der Struktur Flavan-3-ol als Catechine (Abb. 1.8), Flavan-3,4-diol als Leukoanthocyanidine, Flavyliumsalze als Anthocyanidin bezeichnet. Weitere wichtige Gruppen sind die Flavanone, Flavanonole, Flavone (Flaven-4-on) und Flavonole (3-Hydroxy-flaven-4-on, Abb. 1.9). Isoflavanoide besitzen ein 3-Phenychroman-Grundgerüst (Isoflavan).

Flavonoide kommen meist als lösliche Glykoside im Zellsaft der Pflanze vor und wurden mit Namen bezeichnet, die sich vom Namen der Pflanze ableiten, in der die Verbindung zuerst gefunden wurde.

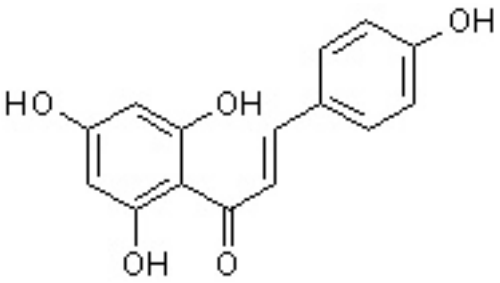


Abb. 1.7: Chalcon

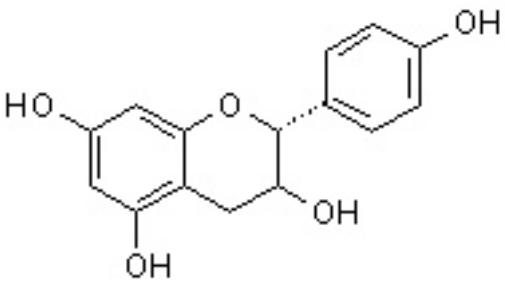


Abb. 1.8: Flavanol

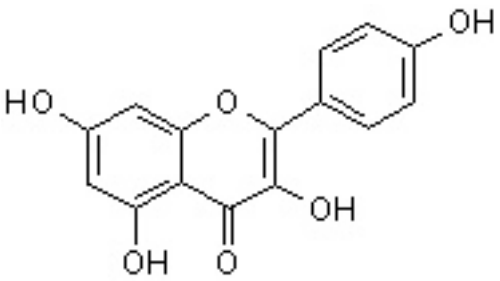


Abb. 1.9: Flavonol

Kakaobohnen enthalten hohe Konzentrationen an (–)-Epicatechin (Abb. 1.10) und Procyanidinen (ARTS *et al*., 1999; LAZARUS *et al*., 1999; MITCHELL *et al*., 1999; HAMMERSTONE *et al*., 2000), höhere als in Tee oder Rotwein (LEE *et al*., 2003). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der regelmäßige Konsum von Tee, Rotwein und anderen flavonoidhaltigen Lebensmitteln das Risiko, an einer KHK zu erkranken, senkt (MIDDLETON JR. *et al*., 2000; SCALBERT und WILLIAMSON, 2000; SANO *et al*., 2004).

Auch für Kakao und Schokolade wurden diese Effekte belegt. Es wurde nachgewiesen, dass Kakao-Flavonoide *in vitro* die Oxidation des LDL hemmen und vor Oxidations- und Nitrierungsreaktionen durch Peroxynitrit schützen (ARTEEL und SIES, 1999; ARTEEL *et al*., 2000). Sie erhöhen die Plasmaspiegel der vasodilatatorischen Prostazykline und senken die Plasmaspiegel der Leukotriene (SCHRAMM *et al*., 2001).

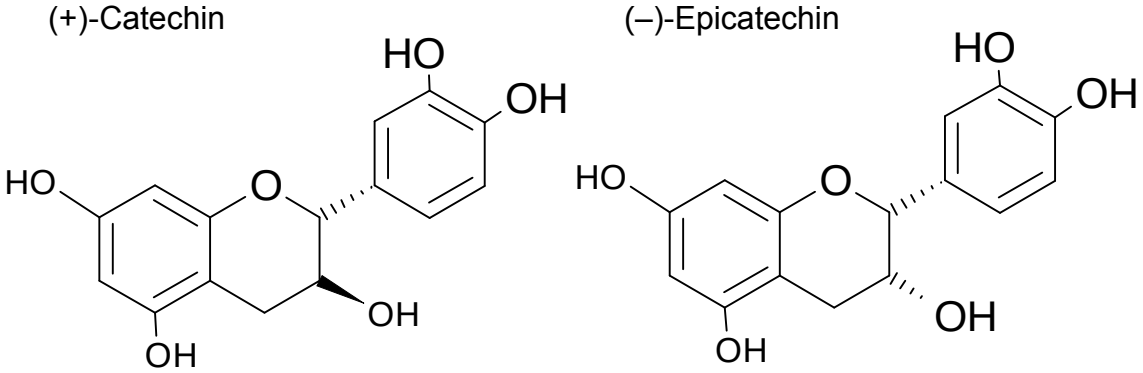


Abb. 1.10: Gegenüberstellung von (+)-Catechin und (–)-Epicatechin

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Konsum von dunkler flavonoidreicher Schokolade sowohl den systolischen Blutdruck senkt (BUIJSSE *et al*., 2006), als auch einer diabetogenen Stoffwechsellage durch Verbesserung der Insulinsensitivität entgegenwirkt (TAUBERT *et al*., 2003; GRASSI *et al*., 2005). In anderen Studien wurde beschrieben, dass der Konsum eines flavonoidreichen Kakaoproduktes zur NO-abhängigen Dilatation von Arterien führt, den Plasmaspiegel von Nitrosoverbindungen senkt (HEISS *et al*., 2003; SIES *et al*., 2005) und die Thrombozytenaktivierung unterdrückt (REIN *et al*., 2000a). WISWEDEL *et al*. (2004) zeigten, dass der Konsum eines flavonoidreichen Kakaogetränkes den Plasmaspiegel von F_2-Isoprostanen senkt, der ein Maß für die Lipidperoxidation *in vivo* darstellt. RAMLJAK *et al*. (2005) beobachteten einen hemmenden Einfluss von Kakao-Procyanidinen auf das Wachstum von Brustkrebszellen *in vitro*.

Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide aus Kakao und Schokolade ist abhängig von ihrer Resorption, Verteilung im Körper und Metabolisierung. Nach dem Verzehr von Schokolade wurde ein Anstieg des Epicatechinspiegels im Plasma nachgewiesen, und von einigen Autoren wurde auch damit einhergehend eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas beobachtet (REIN *et al*., 2000b; WANG *et al*., 2000a, b; WAN *et al*., 2000; KEEN *et al*., 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, herauszufinden, ob Kakao-Flavonoide die Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung des LDL *in vitro* hemmen oder verhindern können. Dies sollte anhand verschiedener Modelle getestet werden.

1.5.1 *In-vitro*- Modell für die oxidative Modifizierung von LDL

Als erstes sollte ein möglichst einfacher und schonender Weg gefunden werden, LDL aus menschlichem Serum zu präparieren. Die in der Literatur beschriebenen Präparationen dauern sehr lange und bergen damit das Risiko einer Autoxidation des LDL in sich.

Als Parameter der Lipidperoxidation des LDL sollte die Bildung konjugierter Diene spektrophotometrisch im Gesamtansatz und im Lipidextrakt gemessen werden.

Die Lipidperoxidation sollte mit Hilfe verschiedener *In-vitro*-Modelle untersucht werden. Zum einen sollte das vielfach verwendete Modell der Cu^{2+}-katalysierten Lipidperoxidation eingesetzt werden. Zum anderen sollte ein biologisch relevanteres Modell entwickelt werden, mit dem die Lipidperoxidation des LDL durch das Enzym MPO und ein geeignetes Ko-Substrat näher untersucht werden konnte. Dieses System sollte möglichst einfach zu handhaben sein, um es auch für Screeningzwecke einsetzen zu können.

1.5.2 Hemmung der Lipidperoxidation mit Kakao-Flavonoiden

Nachdem ein entsprechendes Testsystem entwickelt worden ist, sollten die Wirkungen der Kakao-Flavonoide auf die Lipidperoxidation des LDL genauer untersucht werden.

1.5.3 Vergleich der Wirkungen von MPO und Peroxynitrit

Sowohl MPO als auch die Bildung von Peroxynitrit können in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden und sind über zentrale Reaktionen des NO-Stoffwechsels maßgeblich an der Atherogenese beteiligt. Es sollten Informationen erhalten werden, welches System hauptsächlich für die Lipidperoxidation bzw. die Protein-Tyrosinnitrierung verantwortlich sein könnte. Die Wechselwirkungen von MPO und Peroxynitrit und ihrer Beteiligung an der Atherosklerose sind Gegenstand von Kontroversen in der Literatur.

1.5.4 Hemmung der Protein-Tyrosinnitrierung mit Kakao-Flavonoiden

Schließlich sollten die Wirkungen der Kakao-Flavonoide auf die Protein-Tyrosinnitrierung des LDL durch MPO und Peroxynitrit untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Enzyme, Chemikalien und Lösungsmittel

Glukoseoxidase	Roche Diagnostics (Basel, CH)
Myeloperoxidase	Calbiochem (Darmstadt, D)
(+)-Catechin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
(–)-Epicatechin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Quercetin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DTPA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDTA, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glukose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
H_2O_2	Merck (Darmstadt, D)
HCl	Merck (Darmstadt, D)
$K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$	Merck (Darmstadt, D)
KBr	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
KCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
KH_2PO_4	Merck (Darmstadt, D)
MnO_2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	Merck (Darmstadt, D)
$NaBH_4$	Merck (Darmstadt, D)
NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
$NaNO_2$	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NaOH	Merck (Darmstadt, D)
Stickstoff (gasförmig)	Linde (Wiesbaden, D)
Tris	Merck (Darmstadt, D)

Tween-20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Milchpulver, fettfrei	Biorad (Hercules, CA, USA)
$CHCl_3$	Merck (Darmstadt, D)
2-Methoxyethanol (99,3%)	Merck (Darmstadt, D)
n-Heptan (für die Flüssigkeitschromatographie)	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol (96%)	Merck (Darmstadt, D)
Methanol (für die Flüssigkeitschromatographie)	Merck (Darmstadt, D)
Propan-2-ol (für die Spektroskopie)	Merck (Darmstadt, D)

2.1.2 Lösungen

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4)

2,68 mM KCl

1,47 mM KH_2PO_4

137 mM NaCl

10,14 mM Na_2HPO_4

* $2H_2O$

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4

0,1 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4

0,1 mM DTPA

TBST (Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween, pH 7,4)

20 mM Tris

137 mM NaCl

0,1 % (v/v) Tween-20

„Heavy Solution“

2,62 M NaCl
2,97 M KBr
0,27 µM EDTA

Cholesterolreagenz Standardlösung	Roche Diagnostics (Basel, CH)
Cholesterol	Roche Diagnostics (Basel, CH)
Chemiluminescent Substrate	Perbio Science (Bonn, D)

2.1.3 Antikörper

Anti-Nitrotyrosin–Antikörper	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)
Monoklonaler Antikörper (Ziege gegen Maus-IgG, HRP-konjugiert)	ICN (Costa Mesa, CA, USA)

2.1.4 Peroxynitrit – Synthese

Die Synthese von Peroxynitrit erfolgte in einem „quenched-flow-reactor“ (KOPPENOL *et al*., 1996). Dazu wurden 125 ml Natriumnitrit ($NaNO_2$ 0,6 M) und saure Wasserstoffperoxidlösung (1,2 M H_2O_2, 1,4 M HCl) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Fluss: 34 ml/min) unter schnellem Rühren in 250 ml NaOH-Lösung (1 M) mit Braunstein (MnO_2) infundiert. Kurz vor dem Einlauf in die NaOH-Lösung wurden die beiden anderen Komponenten in einer Y-förmigen Schlauchkupplung vereinigt. Anschließend wurde der Ansatz mindestens 30 min bei 4°C gerührt, um überschüssiges H_2O_2 zu entfernen. Das verbliebene MnO_2 wurde dann mit einem Faltenfilter abgetrennt. Die Bestimmung der Konzentration der resultierenden Peroxynitritlösung erfolgte photometrisch (ε_{302} = 1670 M^{-1} cm^{-1}). Erwartungsgemäß lagen die Konzentrationen zwischen 20 mM und 100 mM. Anschließend wurde das Peroxynitrit aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

Um eine Lösung höherer Konzentration zu erreichen, wurde das Peroxynitrit ausgefroren; um eine niedrigere Konzentration zu erhalten, wurde mit 0,1% frisch angesetzter CO_2-freier Kaliumhydroxidlösung verdünnt.

2.1.5 Herstellung der Flavonoid-Stammlösungen

Für die Herstellung von 0,1 M Stammlösungen wurden die Flavonoide in 2-Methoxyethanol gelöst. Die Stammlösung wurde maximal 14 Tage bei –20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Die für die Reaktionsansätze benötigten Flavonoide wurden jeweils direkt vor Versuchsbeginn mit Methylglykol auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

2.2 Methoden

2.2.1 LDL-Präparation

Die LDL-Präparation erfolgte nach der Methode von KLEINVELD *et al*. (1992) mit einigen Modifikationen.

2.2.1.1 Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme wurde an gesunden, nüchternen Probanden durch Punktion der Kubitalvene durchgeführt. Das Blut wurde mit dem Vacutainer-Blutentnahme-Set (Beckton & Dickinson) in Serumröhrchen (2 * 7,5 ml) aufgefangen und direkt nach Entnahme bei Raumtemperatur ca. 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Serumröhrchen bei 5000 U/min und 15°C für 10 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 580 4R), um das Serum vom Plasma zu trennen.

2.2.1.2 LDL-Isolierung über eine Einstufen-Kurzzeit-Ultrazentrifugation

Je 0,9 ml des Serums wurden in 6 Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann) pipettiert und mit je 1,93 ml „Heavy Solution“ unterschichtet. Danach wurden die Röhrchen entweder mit PBS (chloridhaltiges System) oder mit Kaliumphosphatpuffer (chloridfreies System) bis 1 cm unter dem Rand vorsichtig aufgefüllt. Um dabei den Dichtegradienten aufrecht zu erhalten, wurde mit einer Spritze und einer im Winkel von 90° abgebogenen Kanüle gearbeitet.

Anschließend wurden die Ultrazentrifugenröhrchen bei 28000 U/min und 15°C für 130 Minuten zentrifugiert (SW 41 Rotor, Beckmann: L8-60M).

Nach Beendigung der Ultrazentrifugation zeigte sich die LDL-Fraktion als orangefarbene Bande in der Mitte der Röhrchen. Die darüber liegenden Schichten wurden mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und verworfen. Mit einer neuen Pasteur-Pipette konnte nun das LDL vorsichtig entnommen werden.

2.2.1.3 Entsalzung des LDL

Die Entsalzung des LDL erfolgte mit der Gelfiltrationssäule PD-10 (Amersham Biosciences). Die Gelfiltrationssäule musste vor Gebrauch entweder mit 20 ml PBS oder mit 20 ml Kaliumphosphatpuffer äquilibriert werden. Anschließend wurde 1 ml LDL aufgetragen und nach Durchlauf mit 2 ml PBS bzw. Kaliumphosphatpuffer nachgewaschen. Bis zu diesem Punkt wurde das Eluat verworfen. Erst in den folgenden erneuten 2 ml PBS bzw. Kaliumphosphatpuffer befand sich das entsalzte LDL. Eine Präparation ergab ca. 7,5 ml entsalzte LDL-Lösung.

2.2.1.4. Aufbewahrung des LDL

In einem abgedunkelten Röhrchen unter Stickstoff wurde das LDL bei 4-8°C im Kühlschrank maximal 7 Tage aufbewahrt. Zur Verwendung im MPO/Nitrit-System wurde das LDL mit 0,1 M EDTA versetzt (Endkonzentration 4 mM EDTA). Zur Verwendung im Cu^{2+}-katalysierten System wurde dem LDL während der Aufbewahrung kein EDTA zugesetzt.

2.2.1.5 Bestimmung der Cholesterolkonzentration

Die Cholesterolkonzentration des LDL wurde mit Hilfe eines enzymatischen Farbtests nach der CHOD-PAP-Methode ermittelt. Dazu wurden 990 µl des Cholesterolreagenz mit 10 µl LDL photometrisch bei 500 nm gegen einen Kontrollwert aus 990 µl Cholesterolreagenz und 10 µl PBS gemessen. Mit der Extinktionsänderung, dem Molekulargewicht des LDL von 2,5 MDa und dem mittleren Cholesterolgehalt von 31,6 % je LDL konnte die LDL-Konzentration in µM rechnerisch bestimmt werden.

2.2.2 Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen

Alle Reaktionsansätze enthielten PBS, 0,1 µM LDL, 10 µl Methylglykol pro ml, 1 µM EDTA und 5 µM $CuSO_4$ sofern nicht anders angegeben (Tab. 2.1). Blindwerte enthielten kein $CuSO_4$. Durch die Zugabe von $CuSO_4$ wurde die Reaktion gestartet.

	PBS	EDTA [100 µM] µl	2-Methoxy-ethanol µl	Flavonoid [versch. Konz.] µl	$CuSO_4$ [5 mM] µl
Kontrolle 1	ad 1000 µl	10	10	0	10
Kontrolle 2	ad 1000 µl	10	10	0	10
Blindwert	ad 1000 µl	10	10	0	0
(–)-Epicatechin	ad 1000 µl	10	0	10	10
(+)-Catechin	ad 1000 µl	10	0	10	10
Quercetin	ad 1000 µl	10	0	10	10

Tab. 2.1: Pipettierschema für die Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen
Das zugesetzte Volumen des LDL wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 0,1 µM erreicht wurde.

Die Reaktionskinetik wurde an einem Spektralphotometer (Perkin Elmer Lambda 2) mit Sechsfach-Küvettenwechsler bei 234 nm und 37°C verfolgt. Die Reaktionsdauer variierte zwischen 180 und 600 Minuten. Die Bestimmung der Lag-Phase erfolgte nach CADENAS und SIES (1998), wie in Abb. 2.1 dargestellt.

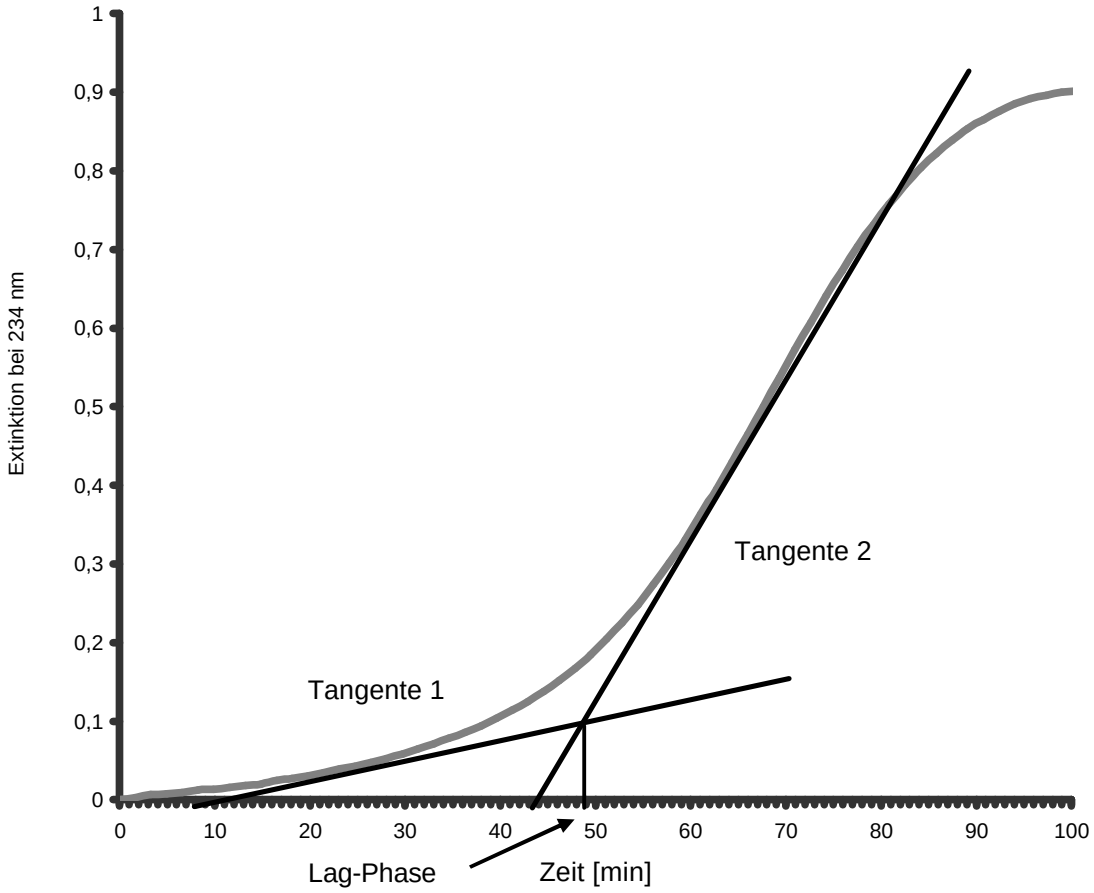


Abb. 2.1: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen. Verdeutlichung der graphischen Bestimmung der Lag-Phase τ_{lag} (CADENAS und SIES, 1998).

2.2.3 Lipidperoxidation des LDL durch MPO

2.2.3.1 Herstellung der Enzym-Stammlösungen

Die lyophilisierten Enzyme sowie die Stammlösungen wurden bei –80°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden die Lösungen in einem 37°C warmen Wasserbad unter Schütteln aufgetaut.

Für die Herstellung einer MPO-Stammlösung wurden 100 µg des lyophilisierten salzhaltigen Enzyms in 200 µl Reinstwasser (aus der Millipore-Anlage) gelöst. Diese Stammlösung wurde aliquotiert (4 * 50 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

Für die Herstellung einer GOD-Stammlösung wurde 1 mg der lyophilisierten salzhaltigen GOD in 1 ml Reinstwasser gelöst. Auch diese Stammlösung wurde aliquotiert (20 * 50 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Verdünnung der Enzym-Stammlösungen für die Reaktionsansätze

Vor Versuchsbeginn wurden so viele MPO-Aliquots wie benötigt im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in einem Eis-Wasser-Gemisch gelagert. Jedes Aliquot wurde mit 450 µl Kaliumphosphatpuffer versetzt. Für jeden Reaktionsansatz von 800 µl wurden 80 µl der verdünnten MPO-Lösung eingesetzt. Die Endkonzentration der MPO betrug 53 nM.

Die GOD-Aliquots wurden in gleicher Weise wie die MPO-Stammlösungen aufgetaut und gelagert. Je 10 µl der Stammlösung wurden mit 990 µl Kaliumphosphatpuffer versetzt. Von dieser verdünnten Stammlösung wurden für jeden Reaktionsansatz 25 µl eingesetzt. Die Endkonzentration der GOD belief sich auf 310 ng/ ml.

2.2.3.3 Versuchsdurchführung

Der Standardreaktionsansatz enthielt Kaliumphosphatpuffer, 0,1 µM LDL, 50 µM NO_2^-, 56 mM Glukose, 53 nM MPO und 310 ng/ ml GOD (Tab. 2.2). Durch Zugabe der GOD wurde die Reaktion gestartet. Blindwerte enthielten keine MPO.

Die Reaktionskinetik wurde am Spektralphotometer (Perkin Elmer Lambda 2) mit Sechsfach-Küvettenwechsler bei 234 nm und 37°C verfolgt. Die Daten wurden mit der Software UV Kinlab (Perkin Elmer) gespeichert. Nach 80 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl $NaBH_4$ (kalt gesättigte Lösung in Ethanol) gestoppt und eine Lipidextraktion gemäß 2.2.4 durchgeführt.

Die Bestimmung der Länge der Lag-Phase erfolgte wie in Abb. 2.1 dargestellt. Die Bestimmung des Anstiegs der Propagationsphase erfolgte mit der Software Microsoft Excel.

	PBS µl	KPO_4^- Puffer µl	Glukose [5,6 M] µl	NO_2^- [5 mM] µl	MPO [530 nM] µl	GOD [9,92 µg/ml] µl
Nitrit & Chlorid	ad 800		8	8	80	25
Nitrit		ad 800	8	8	80	25
Chlorid	ad 800		8	0	80	25
Basal		ad 800	8	0	80	25

Tab. 2.2: Pipettierschema für die Lipidperoxidation durch MPO mit verschiedenen Substraten. Das zugesetzte Volumen des LDL wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 0,1 M erreicht wurde.

2.2.4 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion erfolgte nach der Methode von BLIGH und DYER (1959). Hierzu wurden 800 µl der Reaktionsansätze mit jeweils 2 ml Methanol und 1 ml Chloroform versetzt und gut vermischt. Anschließend wurde noch einmal 1 ml Chloroform hinzugefügt. Nach Durchmischung wurden die Ansätze mit 1 ml Reinstwasser (aus der Millipore-Anlage) versetzt.

Es bildete sich ein biphasisches System, dessen obere hydrophile Phase aus vorwiegend Methanol und Wasser, und dessen untere lipophile Phase vorwiegend aus Methanol und Chloroform bestand. Um die Phasen aufzutrennen, wurden die Proben bei 3000 U/min und 15°C für 1 Minute zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 580 4R).

Die untere lipophile Phase, in der die Lipide enthalten waren, wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in ein Reagenzglas überführt. Die Unterphasen wurden bei 37°C im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft.

Anschließend wurden die Lipide in 800 µl n-Heptan/Propan-2-ol (1:1) gelöst und ein UV-Differenzspektrum im Bereich zwischen 200 und 400 nm gegen den Lipidextrakt von unbehandeltem LDL aufgenommen.

Aus der Extinktionsdifferenz zum jeweiligen Kontrollwert und dem Extinktionskoeffizienten der konjugierten Diene (ε_{234} = 25 mM^{-1} cm^{-1}) wurde die Menge der konjugierten Diene berechnet.

2.2.6 Dot–Blot

Die Proben wurden ca. 5 Minuten auf 96°C erhitzt. Dann wurde mit einer Mikropipette je 1, 3 und 5 µl der Proben vorsichtig auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Nach Antrocknung der Proben wurde die Membran ca. 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer 5%igen Lösung von fettfreiem Milchpulver in TBST abgesättigt. Jede Inkubation der Membran erfolgte auf einem Schüttler.

Danach wurde die Milchpulver-Dispersion abgegossen und die Membran mit einem Anti-Nitrotyrosin-Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Antikörper wurde vorher ebenfalls in einer 5%igen Milchpulver-Dispersion gelöst.

Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper (Ziege gegen Maus-IgG, HRP-konjugiert, Verdünnung 1:4000 mit TBST) für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Danach wurde die Membran wieder dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen und für 10 Minuten in „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ inkubiert. Dabei wurde Meerrettich-Peroxidase an den sekundären Antikörper gekoppelt, wobei Chemilumineszenz erzeugt wird. Anschließend wurde die Membran unter die Diana III – Kamera gelegt, um die so markierten nitrierten Tyrosine sichtbar zu machen.

Als Positivkontrolle wurde eine LDL-Probe vorher mit 500 µM Peroxynitrit behandelt.

3. Ergebnisse

3.1 Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen

3.1.1 Hemmung durch (–)-Epicatechin

(–)-Epicatechin verlängert die Lag-Phase der Cu^{2+}-induzierten Oxidation von LDL bei 20°C (SADIK, 2005). Dieser Effekt des (–)-Epicatechins sollte reproduziert werden, jedoch in Hinblick auf die späteren Versuche mit MPO bei einer Reaktionstemperatur von 37°C. Um Störeffekte durch Schwermetallspuren von Staub etc. zu minimieren und die Autoxidation von LDL zu verhindern, wurde den Versuchsansätzen 1 µM EDTA zugesetzt (Abb. 3.1).

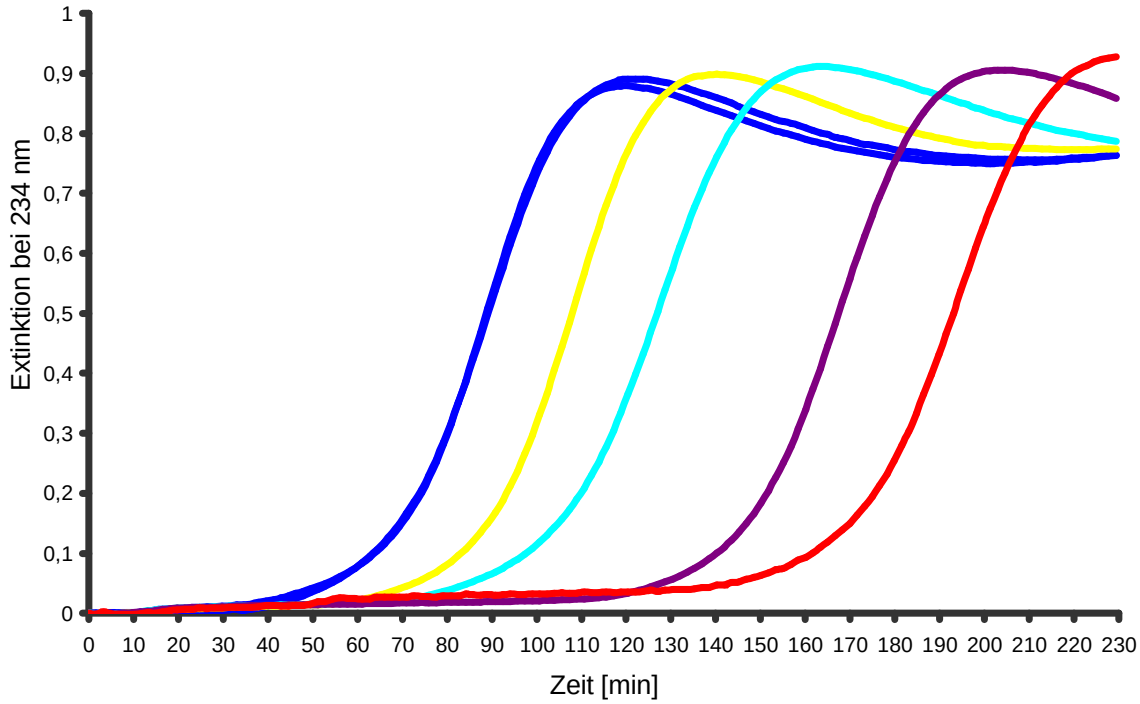


Abb. 3.1: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen, Hemmung durch (–)-Epicatechin in den Konzentrationen 0,1 µM (—), 0,2 µM (—), 0,4 µM (—) und 0,8 µM (—). Kontrollwerte ohne Zugabe von (–)-Epicatechin (—). Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

Als Parameter der antioxidativen Wirkung des (–)-Epicatechins wurde die auf die Kontrolle normierte Länge der Lag-Phase (τ_{lag}) herangezogen. Die Daten ergaben eine lineare Abhängigkeit zwischen der (–)-Epicatechin-Dosis (zwischen 0,1 µM und 4 µM) und τ_{lag} (Abb. 3.3).

Die Dosis von (–)-Epicatechin, die eingesetzt werden musste, um die Lag-Phase des Kontrollansatzes zu verdoppeln (ED_{200}), lag bei 0,75 µM, wie durch Extrapolation aus Abb. 3.3 ermittelt wurde.

3.1.2 Hemmung durch (+)-Catechin

In analoger Weise wurde die Dosis-Wirkungs-Kurve für (+)-Catechin erstellt (Abb. 3.4). Die ED_{200} von (+)-Catechin betrug, ebenso wie die von (–)-Epicatechin, 0,75 µM. Daraus folgt, dass die sterische Konfiguration der OH-Gruppe am C-3 des Flavanols die Wirkung auf die Cu^{2+} vermittelte Lipidperoxidation des LDL nicht beeinflusst (Abb. 3.2).

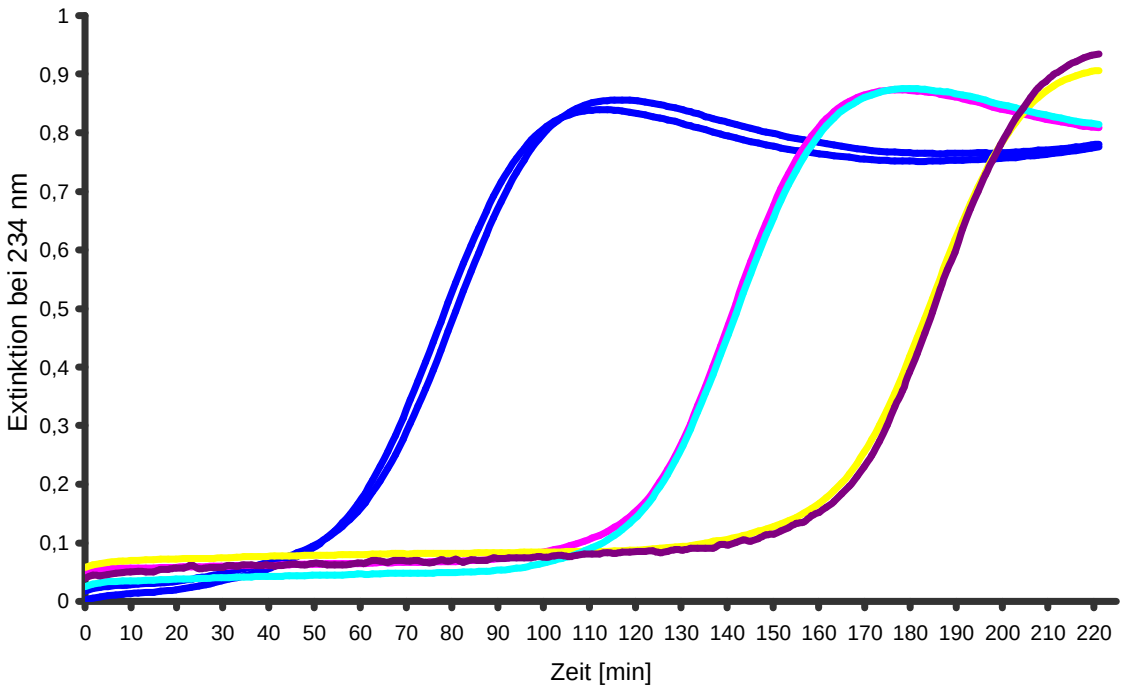


Abb. 3.2: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen, Hemmung durch (+)-Catechin in den Konzentrationen 0,5 µM (—) und 0,8 µM (—) und (–)-Epicatechin in den Konzentrationen 0,5 µM (—) und 0,8 µM (—). Kontrollwerte ohne Flavonoidzusatz (—). Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

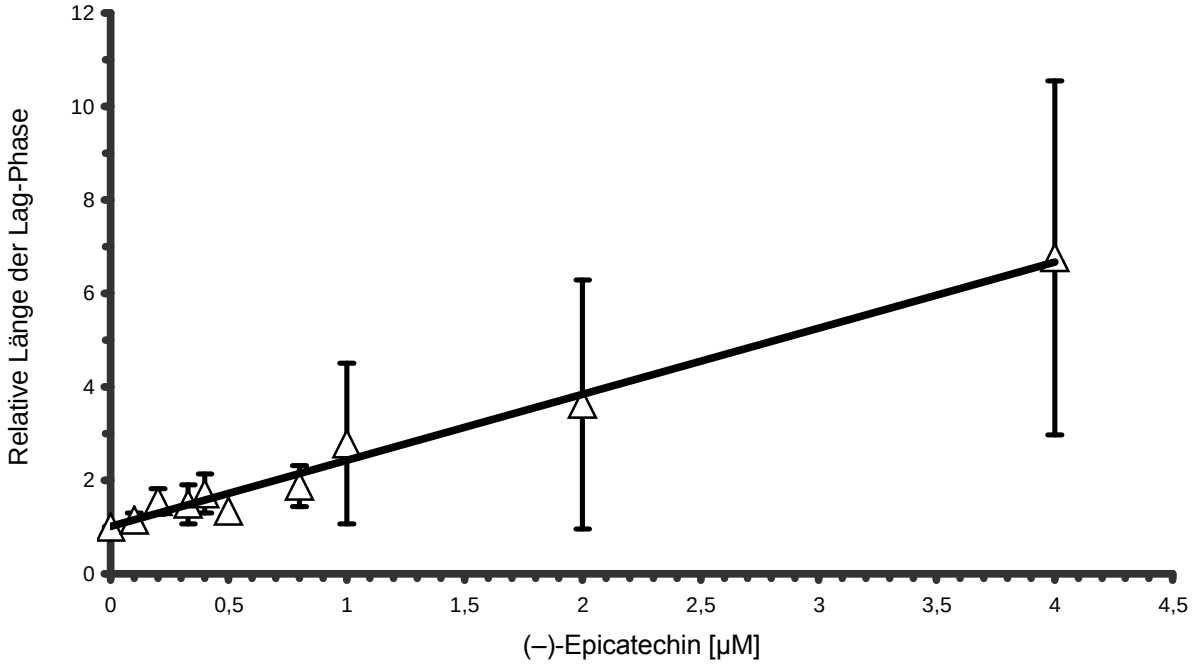


Abb. 3.3: Dosis-Wirkungs-Kurve von (–)-Epicatechin im Cu^{2+}-katalysierten System. Relative Länge der Lag-Phase (τ_{lag}) aufgetragen gegen die (–)-Epicatechin-Konzentration in µM.

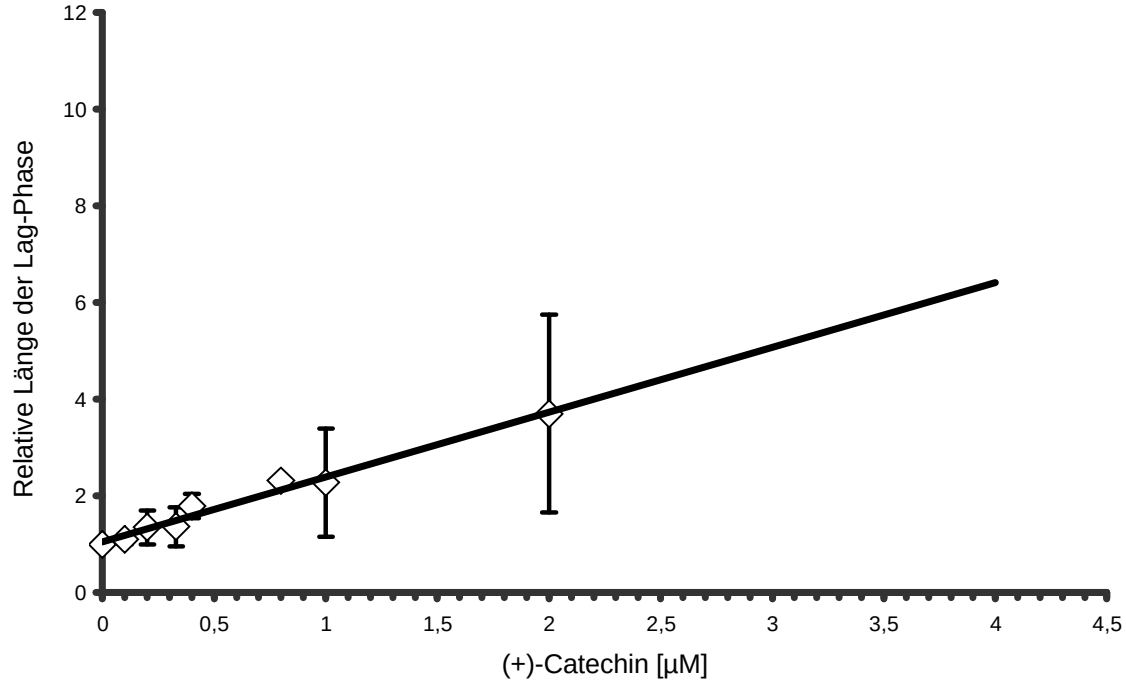


Abb. 3.4: Dosis-Wirkungs-Kurve von (+)-Catechin im Cu^{2+}-katalysierten System. Relative Länge der Lag-Phase (τ_{lag}) aufgetragen gegen die (+)-Catechin-Konzentration in µM.

3.1.3 Hemmung durch Quercetin

Abb. 3.5 zeigt die für Quercetin erstellte Dosis-Wirkungskurve.

Die ED_{200} dieses Flavonols lag bei 0,6 µM und unterschied sich somit nicht signifikant von den entsprechenden Werten für die beiden Flavanole ($p = 0.09$).

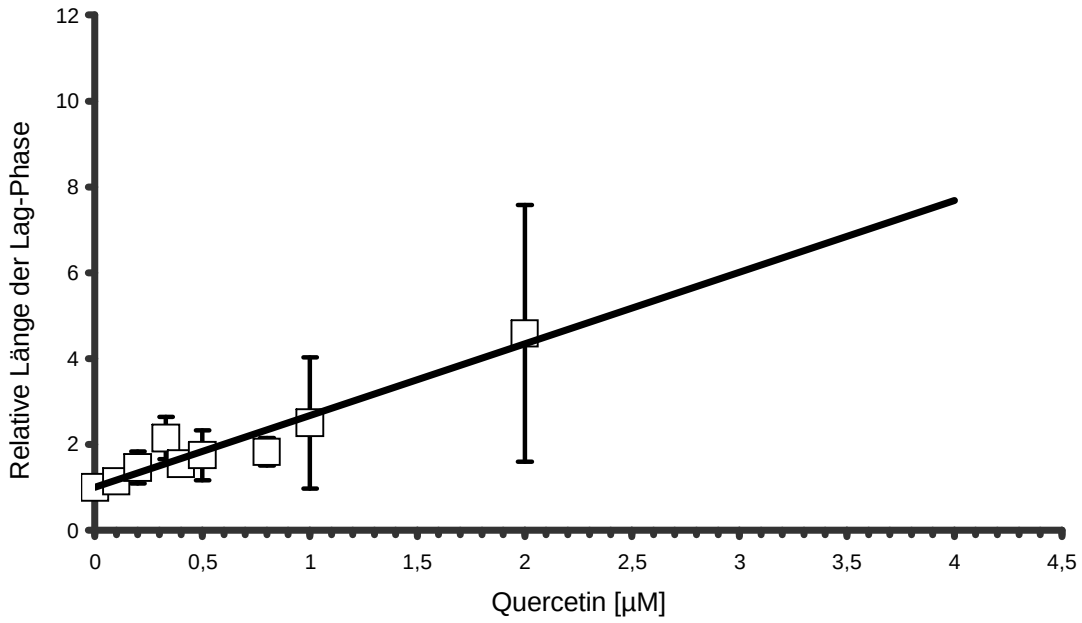


Abb. 3.5: Dosis-Wirkungs-Kurve von Quercetin im Cu^{2+}-katalysierten System. Relative Länge der Lag-Phase (τ_{lag}) aufgetragen gegen die Quercetin-Konzentration in µM.

3.2 Lipidperoxidation des LDL durch MPO

3.2.1 Etablierung der Methode

Um die experimentellen Bedingungen den Verhältnissen *in vivo* anzunähern, wurde anstelle von Cu^{2+} als Katalysator das Enzym Myeloperoxidase (MPO) eingesetzt. Der entsprechende Reaktionsansatz musste zunächst etabliert werden.

In der Literatur wurde bereits auf die Bedeutung der MPO bei der Entstehung von Atherosklerose, speziell durch die oxidative Modifizierung von LDL hingewiesen (BERLINER und HEINECKE, 1997).

3.2.2 Das H_2O_2-Bolus-System

Zu Beginn der Untersuchungen wurde mit einem modifizierten Reaktionsansatz gearbeitet. Dabei wurde dem Reaktionsansatz wiederholt H_2O_2 im Abstand von 90 s als Bolus zugefügt. (BYUN *et al*., 2001; YANG *et al*., 2001)

Als Substrate der MPO wurden Chlorid und Nitrit zugesetzt. Der Anstieg der Extinktion nach Zugabe von Wasserstoffperoxid ließ auf eine Lipidperoxidation des LDL schließen. Jedoch wurden mit einer Absorptionsänderung von 0,2 nicht die entsprechenden Werte des Cu^{2+}-Systems mit einer durchschnittlichen Absorptionszunahme von 1,0 erreicht. Da die Kurven wellenförmig verliefen und somit das Ablesen der Lag-Phase nicht möglich war, wurden lediglich die Steigung zwischen 10 und 40 min und die maximale Extinktionszunahme nach 80 min ermittelt. Nach etwa 80 min stagnierte der Anstieg der Kurve. Der wellenförmige Verlauf der Kurven wurde durch Überlagerungen mit der Eigenextinktion der Wasserstoffperoxidboli hervorgerufen (Abb. 3.6).

Um nachzuweisen, dass die beobachtete Extinktionszunahme durch die Enzymaktivität verursacht worden war, wurden Blindansätze ohne MPO und ohne LDL untersucht, bei denen es nur zu sehr geringen Extinktionsänderungen, vermutlich hervorgerufen durch die Absorption des Wasserstoffperoxids, kam.

Um die Enzymaktivität nachweisbar hemmen zu können, musste die Abhängigkeit des Effekts von der Enzymmenge nachgewiesen werden. Wie Abb. 3.6 zeigt, verdoppelten sich sowohl der Anstieg, als auch die Extinktionszunahme nach 50 Minuten mit der Verdopplung der Enzymkonzentration im Reaktionsansatz.

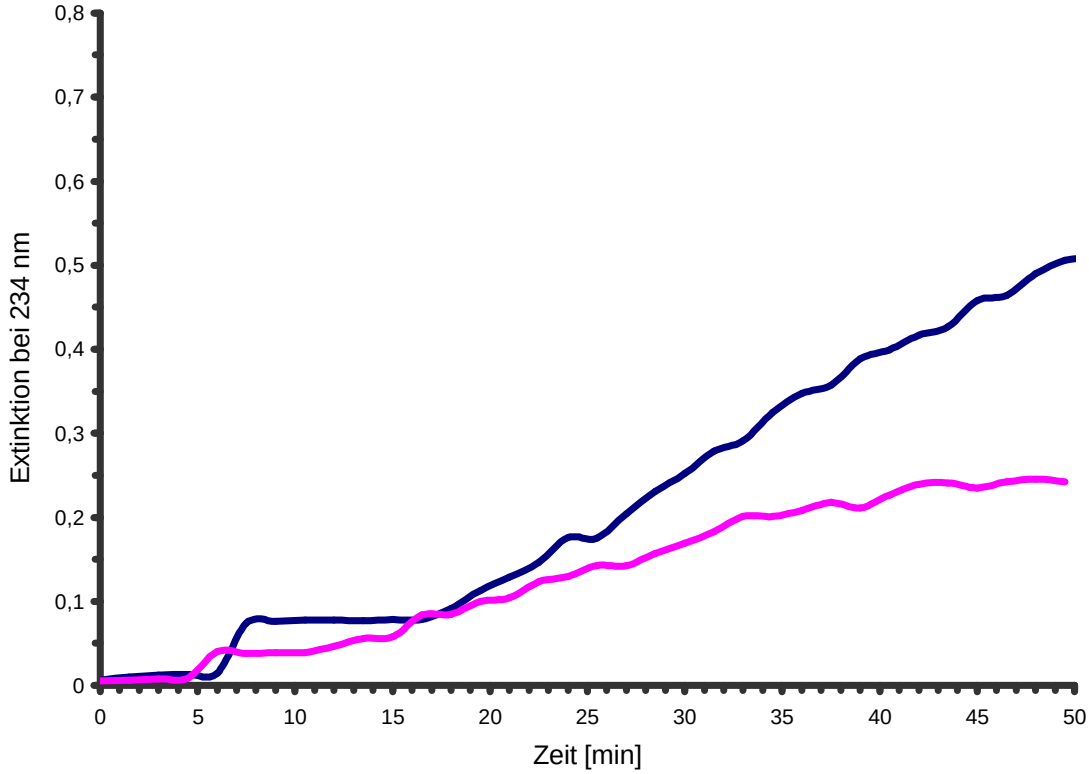


Abb. 3.6: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch MPO in zwei verschiedenen Konzentrationen, 20 nM (—) und 40 nM (—). Nach 4 bzw. 6 min Zugabe von MPO, nach 15 min Zugabe des ersten H_2O_2-Bolus. Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

Anschließend wurden die Substrate der MPO variiert. Es wurden Versuche mit Nitrit plus Chlorid, mit Chlorid allein, mit Nitrit allein, sowie ohne Substrate durchgeführt und miteinander verglichen (Abb. 3.7).

Der größte Effekt wurde mit den Reaktionsansätzen erzielt, die entweder beide Substrate enthielten, oder Nitrit allein. Chlorid als alleiniges Substrat erzielte hingegen nur einen geringen Effekt und ohne Substrate war fast kein Effekt zu beobachten.

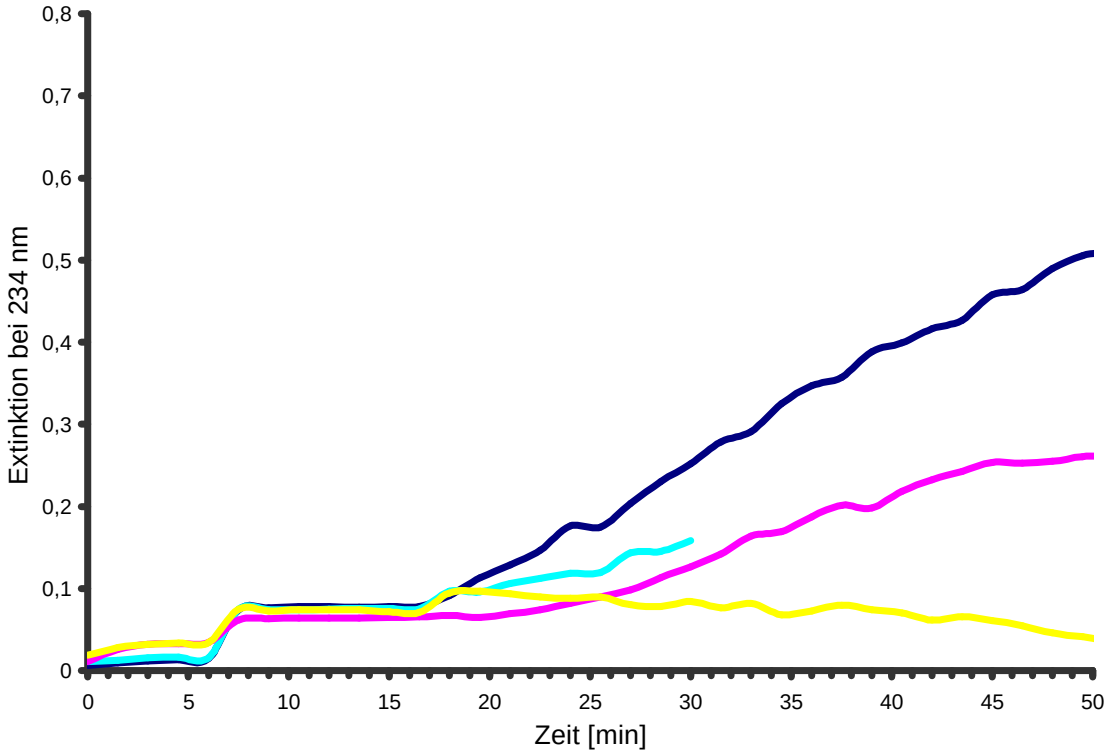


Abb. 3.7: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch MPO. Vergleich der verschiedenen Substrate der MPO: Chlorid und Nitrit (—), Chlorid allein (—), Nitrit allein (—) und ohne Zusatz (—). Nach 6 min Zugabe der MPO, nach 15 min Zugabe des ersten H_2O_2-Bolus. Aufgrund eines technischen Fehlers des Messinstrumentes konnte die Kurve mit Chlorid (—) nicht weiter aufgezeichnet werden. Dennoch ist ihr vermuteter Verlauf flacher, als der Verlauf der Kurve mit Nitrit (—).Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

Als Nächstes wurde der Einfluss von Flavonoiden auf dieses System untersucht Aufgrund seines hohen Gehaltes im Kakao wurde (–)-Epicatechin eingesetzt. Außerdem wurden Versuche mit zwei Metaboliten des (–)-Epicatechins unternommen, die mittels HPLC als 3'-O-Methylepicatechin und 3'-O-Methylepicatechin-Glucuronid identifiziert wurden (schriftliche Mitteilung von R. Hansen an T. Schewe, 2002). Bei letzterem Metaboliten handelte es sich vermutlich um 3'-O-Methylepicatechin-7-Glucuronid (NATSUME *et al.*, 2003). Es wurden sowohl die Reaktionsansätze mit beiden Substraten, als auch die mit Chlorid bzw. Nitrit allein untersucht. Die Kurven wurden hinsichtlich ihres Maximums und ihrer Steigung mit denen der Kontrollkurven ohne Flavonoid verglichen. Es zeigte sich zwar eine Hemmung der Enzymaktivität, jedoch führte der wellenförmige Verlauf der Kurven zu einer erschwerten Auswertbarkeit der Ergebnisse.

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Extinktionszunahme auf die Bildung konjugierter Diene in den LDL-Lipiden zurückzuführen war, wurden die Reaktionsansätze nach Ablauf der Reaktionszeit einer Lipidextraktion unterzogen (BLIGH und DYER, 1959). Im anschließenden UV-Differenzspektrum gegen den MPO-freien Blindwert zeigte sich ein Peak bei 234 nm, dem Absorptionsmaximum der konjugierten Diene. Damit ist bewiesen worden, dass die in der Verlaufskinetik beobachtete Extinktionsänderung bei 234 nm auf die Lipidperoxidation zurückzuführen war.

(–)-Epicatechin bewirkte in einer Konzentration von 10,0 µM eine vollständige Hemmung der Bildung konjugierter Diene. Bei 1,0 µM (–)-Epicatechin war eine partielle Hemmung erkennbar.

Die beiden Metaboliten 3'-O-Methylepicatechin und 3'-O-Methylepicatechin-7-Glucuronid waren weniger wirksam als (–)-Epicatechin. In einer Konzentration von 10,0 µM wurde eine partielle Hemmung beobachtet, bei 1,0 µM war nur noch 3'-O-Methylepicatechin-Glucuronid wirksam. Diese Beobachtung korreliert mit den Daten von NATSUME *et al*. (2004), wonach die 7-Glucuronide des Epicatechins die LDL-Oxidation durch Cu^{2+} hemmen, jedoch mit geringerer Wirksamkeit als (–)-Epicatechin.

3.2.3 Das MPO/GOD-System

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik hinsichtlich der erschwerten Auswertbarkeit der Verlaufskurven, sowie der aufwendigen Boluszugaben von Wasserstoffperoxid, wurde dieses System aufgegeben.

Der Zusatz von Glukoseoxidase (GOD) zum Reaktionsansatz bot eine elegante Lösung des Problems an, da das Enzym Wasserstoffperoxid in folgender Reaktion erzeugt:

Glukose + O_2 → H_2O_2 + Gluconolacton.

Folglich konnte dem Reaktionsansatz einmalig GOD und Glukose zugefügt werden, um der MPO das benötigte H_2O_2 kontinuierlich bereitzustellen.
Wie schon im H_2O_2-Bolus-System wurde auch hier mit verschiedenen Reaktionsansätzen gearbeitet, in denen die Substrate der MPO, Chlorid und Nitrit in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten waren (Tab. 3.1).

Substrate	Chloridkonzentration	Nitritkonzentration
Nitrit und Chlorid	140 mM	50 µM
Chlorid	140 mM	---
Nitrit	30 mM	50 µM
Blindwert	30 mM	---

Tab. 3.1: Die Reaktionsansätze des MPO/GOD-Systems

Das in den Reaktionsansätzen ohne zusätzliches Chlorid enthaltene Chlorid stammte aus der LDL-Präparation und der MPO-Lösung. Die Reaktionsansätze, denen kein Chlorid zugesetzt worden war, enthielten nur 20% der Chloridkonzentration der Ansätze mit Chloridzusatz.

In den folgenden Versuchen wurde die Dosisabhängigkeit von GOD und MPO untersucht, um festzustellen, bei welchen Konzentrationen beide Enzyme am effektivsten arbeiteten.

3.2.3.1 Optimierung der Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz mit Nitrit plus Chlorid

Die Effektivität der GOD wurde anhand der Bildung konjugierter Diene im Lipidextrakt bewertet. Das Wirkungsmaximum lag bei einer GOD-Konzentration von 310 ng/ml, daher wurde diese Konzentration bei allen weiteren Versuchen eingesetzt (Abb. 3.8). Ansätze ohne GOD zeigten erwartungsgemäß keine Reaktion und unterschieden sich nicht von den Blindwerten ohne MPO.

Auch für die MPO wurde die optimale Konzentration ermittelt. Gemessen wurde die Effektivität ebenfalls an der Bildung konjugierter Diene. Als Wirkoptimum erwies sich eine Konzentration von 53 nM. Es konnte gezeigt werden, dass geringere Konzentrationen auch geringere Effekte ausübten. Mit dieser Dosisabhängigkeit war die Möglichkeit gegeben, die Hemmung des Enzyms durch Flavonoide nachzuweisen.

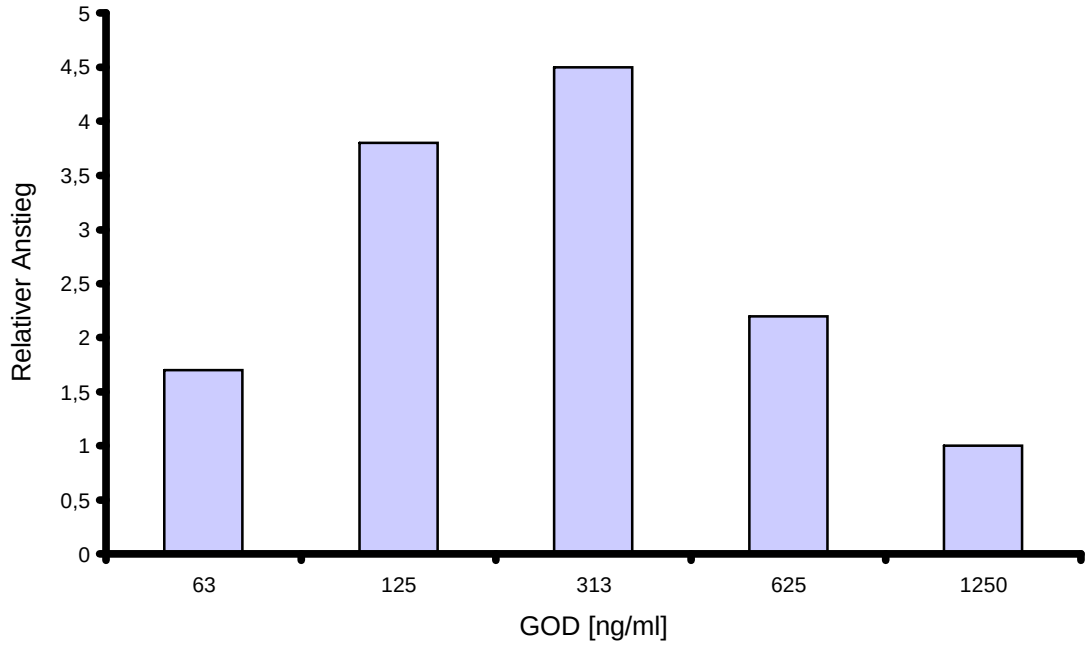


Abb. 3.8: Ergebnisse der Optimierungsexperimente mit verschiedenen GOD-Konzentrationen. Die GOD-Konzentration wurde gegen den relativen Anstieg des zeitlichen Verlaufs bei 234 nm während der Propagationsphase aufgetragen.

3.2.3.2 Optimierung der Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz mit Nitrit allein

In diesem Reaktionsansatz lag das Wirkmaximum der GOD ebenfalls bei 310 ng/ml (Abb. 3.9).

Hinsichtlich der MPO waren die Ergebnisse im Reaktionsansatz mit Nitrit ebenso vergleichbar mit denen des Reaktionsansatzes mit Nitrit plus Chlorid. Auch hier hat sich 53 nM MPO als geeignet erwiesen, da sich diese Konzentration in einem Bereich linearer Abhängigkeit befand (Abb. 3.10 und 3.11).

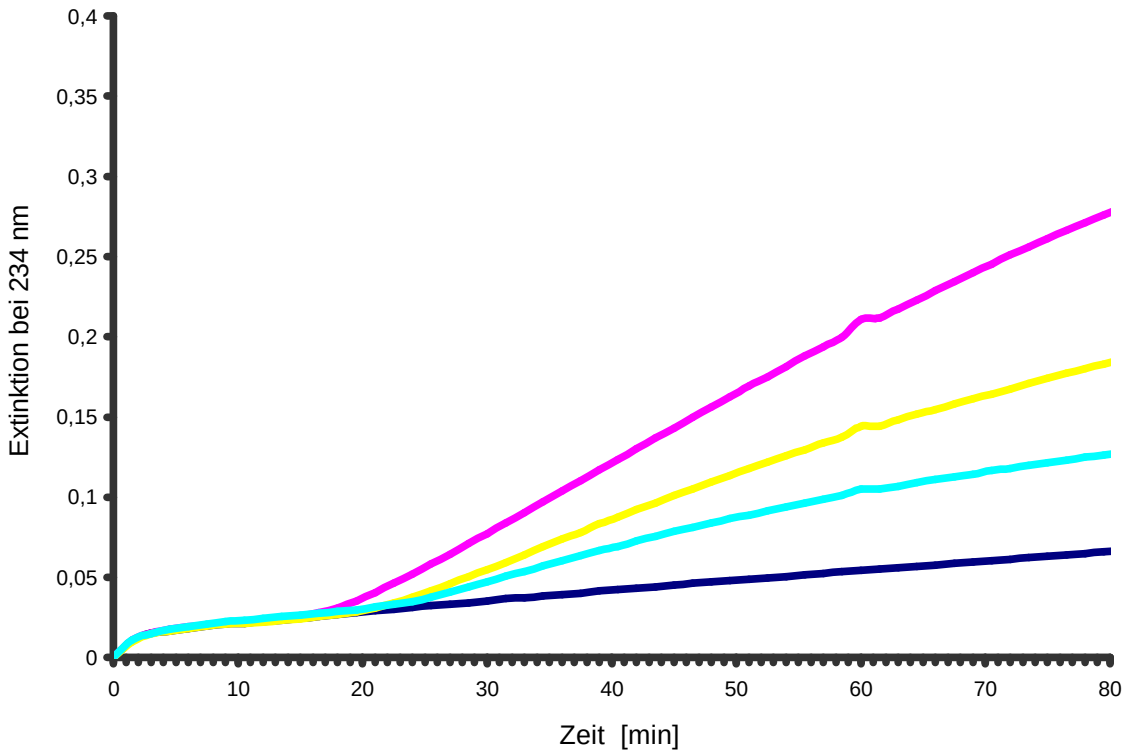


Abb. 3.9: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch MPO mit verschiedenen GOD-Konzentrationen: 313 ng/ml (—), 625 ng/ml (—) und 1250 ng/ml (—). Der Kontrollwert enthält keinen GOD-Zusatz (—). Reaktionsansatz mit Nitrit allein. Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

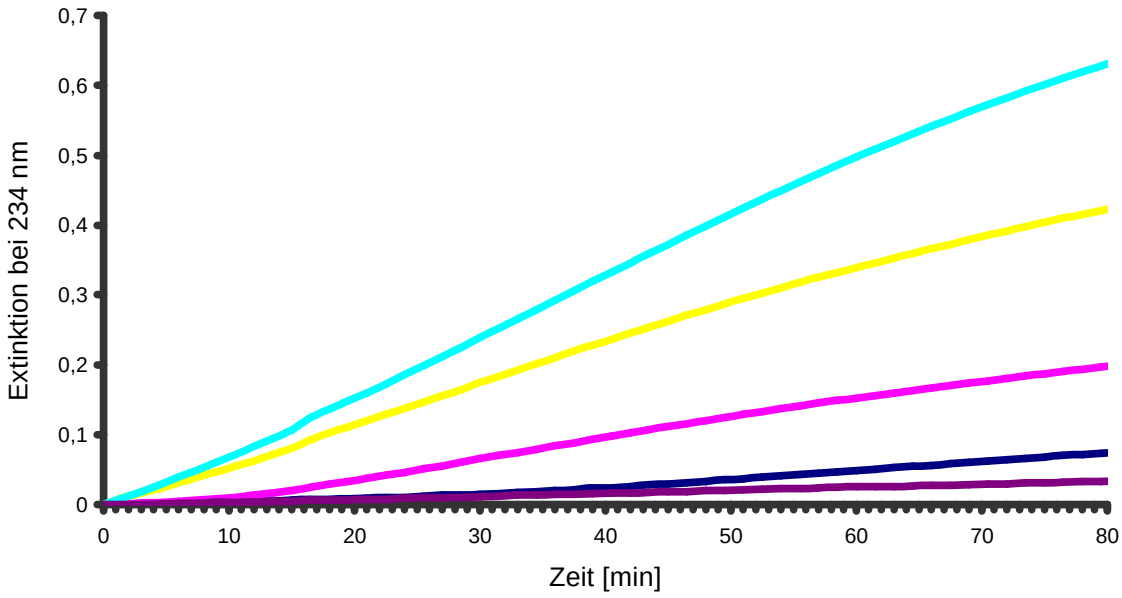


Abb. 3.10: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch MPO mit verschiedenen MPO-Konzentrationen: 12,5 nM (—), 25 nM (—), 50 nM (—) und 75 nM (—). Der Kontrollwert enthält keinen MPO-Zusatz (—). Reaktionsansatz mit Nitrit allein. Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

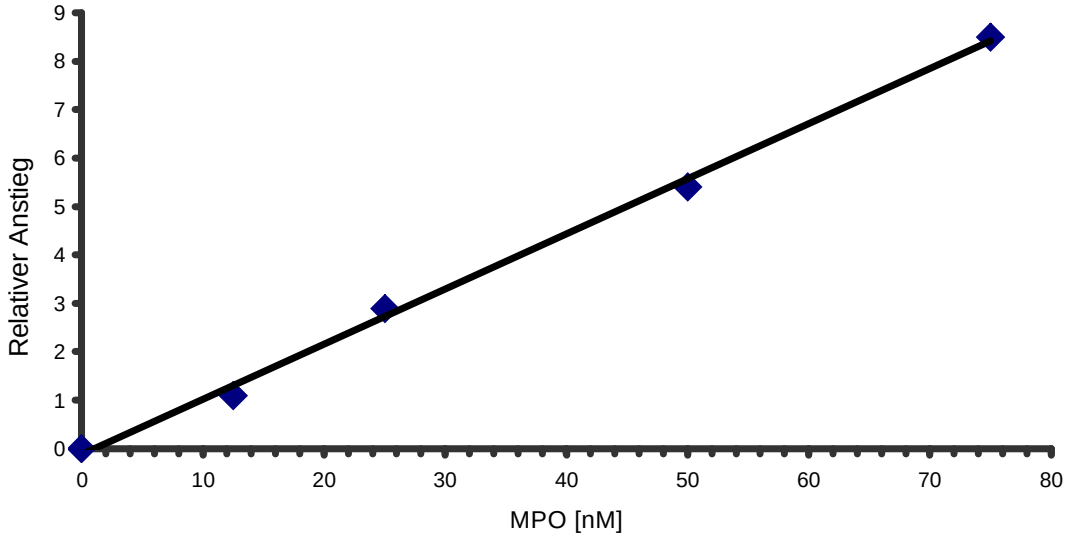


Abb. 3.11: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der konjugierten Dienbildung im LDL von der MPO-Konzentration. Die MPO-Konzentration wurde gegen den relativen Anstieg des zeitlichen Verlaufs bei 234 nm während der Propagationsphase aufgetragen

3.2.3.3 Die Substrate der MPO

Der Reaktionsansatz, der kein Nitrit und nur wenig Chlorid enthielt, zeigte – wenn überhaupt – nur eine geringe Lipidperoxidation, die allerdings durch Zugabe von L-Tyrosin gesteigert werden konnte (PRAKOSAY, 2003).

Im Reaktionsansatz, der kein Nitrit enthielt, aber eine hohe Chloridkonzentration, wurde ebenfalls nur eine geringe Lipidperoxidation beobachtet.

Da Nitrit demzufolge eine wesentliche Voraussetzung für eine hohe Lipidperoxidation des LDL ist, wurde in den weiteren Versuchen hauptsächlich mit dem Reaktionsansatz mit Nitrit plus Chlorid und dem Reaktionsansatz mit Nitrit allein gearbeitet.

3.2.4 Hemmung der Lipidperoxidation des LDL im MPO/GOD-System durch (–)-Epicatechin und seine Metaboliten 3'-O-Methylepicatechin und 3'-O-Methylepicatechin-Glucuronid

Zunächst wurde (–)-Epicatechin eingesetzt, in einer Konzentration von 1,0 µM. Parameter der antioxidativen Wirkung war, wie im Cu^{2+}-System die relative Länge der Lag-Phase (τ_{lag}), die maximale Extinktionszunahme bei 234 nm nach 80 min, sowie die Menge an konjugierten Dienen, die im Lipidextrakt nach Bligh-Dyer ermittelt wurde.

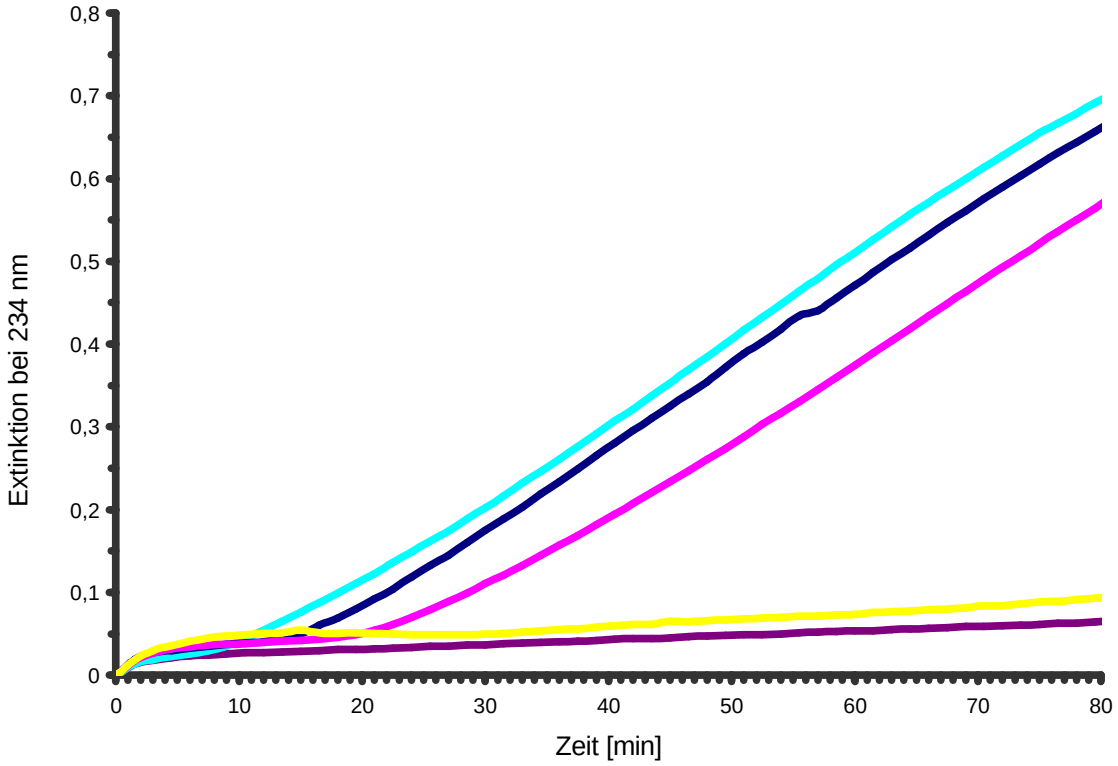


Abb. 3.12: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch MPO. Hemmung durch (–)-Epicatechin in den Konzentrationen 0,5 µM (—), 1,0 µM (—) und 10,0 µM (—). Der Kontrollwert (—) enthält kein (–)-Epicatechin, der Blindwert (—) keine MPO. Reaktionsansatz mit Nitrit plus Chlorid. Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

Die Reaktionsansätze mit Nitrit plus Chlorid und mit Nitrit allein verhielten sich im zeitlichen Verlauf und den Endwerten der gebildeten konjugierter Diene ähnlich. In beiden Reaktionsansätzen führte (–)-Epicatechin zu einer dosisabhängigen Hemmung aller drei beobachteten Parameter. Bei 10 µM wurde eine vollständige Hemmung beobachtet. Unter diesen Bedingungen war weder die Lag-Phase zu ermitteln, noch eine Bildung konjugierter Diene nachzuweisen (Abb. 3.12 und Abb. 3.13).

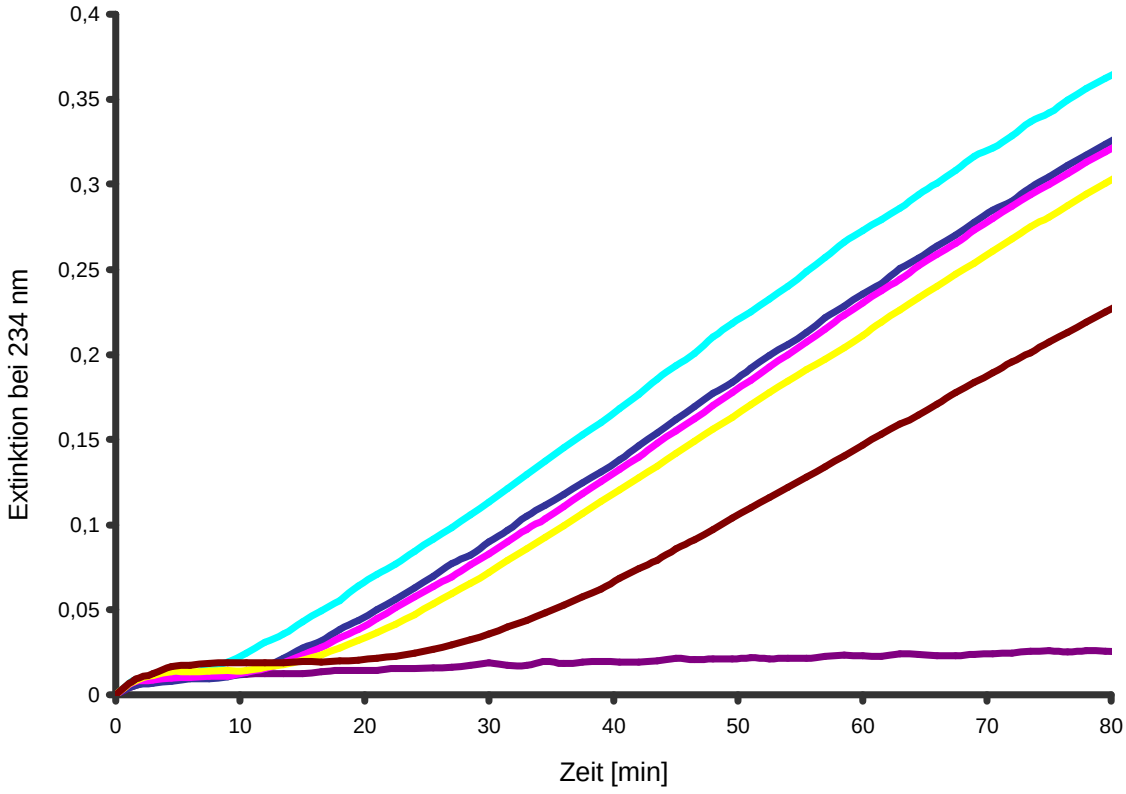
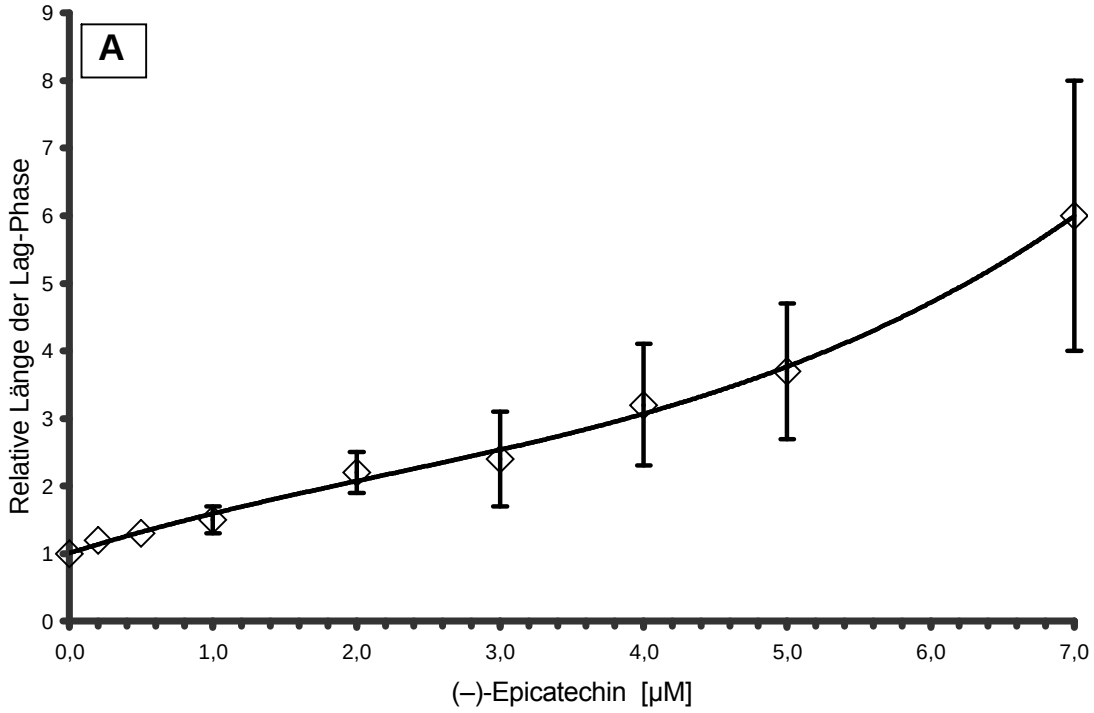


Abb. 3.13: Zeitlicher Verlauf der Lipidperoxidation des LDL durch MPO. Hemmung durch (–)-Epicatechin den Konzentrationen 0,2 µM (—), 0,5 µM (—), 1,0 µM (—) und 2,0 µM (—).Der Kontrollwert (—) enthält kein (–)-Epicatechin, der Blindwert (—) keine MPO. Reaktionsansatz mit Nitrit plus Chlorid. Die gezeigten Kurven sind repräsentative Beispiele.

Die ED_{200} bei der Verlängerung der Lag-Phase lag bei 1,8 µM (–)-Epicatechin. Die Dosis-Wirkungskurve verlief zwischen 0,1 µM und 5,0 µM (–)-Epicatechin linear (Abb. 3.14 A).

Für die Hemmung der Bildung von konjugierten Dienen in der Propagationsphase lag die IC_{50} bei etwa 5,5 µM. Hier verlief die Dosis-Wirkungskurve hyperbolisch (Abb. 3.14 B).



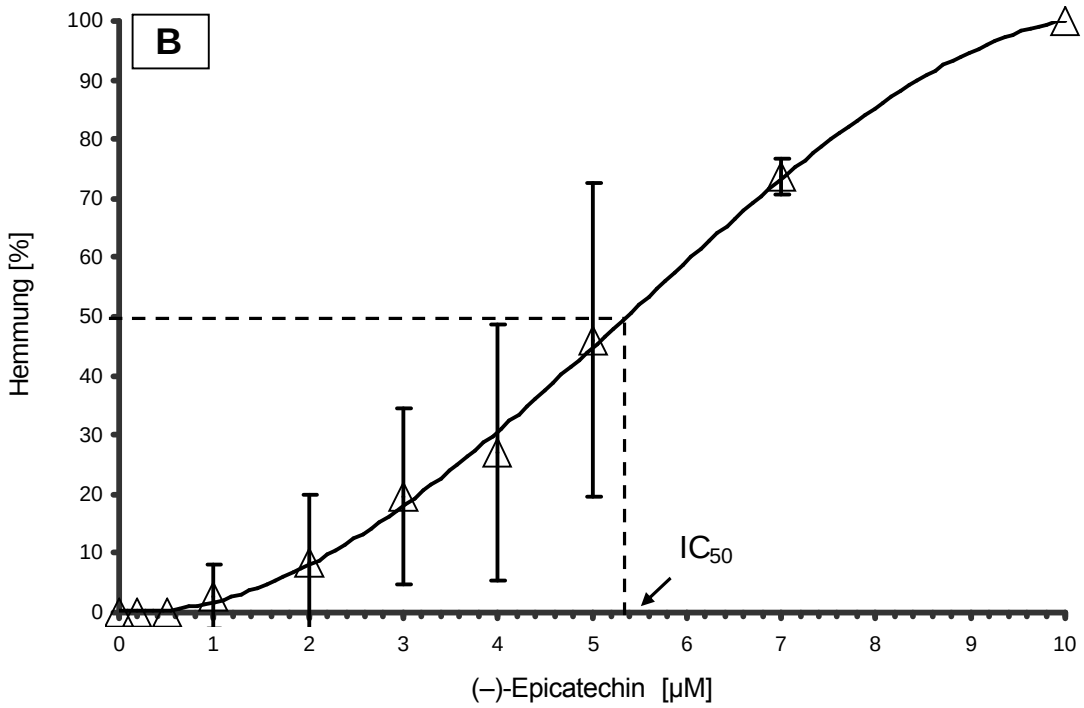


Abb. 3.14: Dosis-Wirkungskurve von (–)-Epicatechin im MPO/GOD-System, Reaktionsansatz mit Nitrit allein. **A**: Relative Länge der Lag- Phase (τ_{lag}) aufgetragen gegen die (–)-Epicatechin-Konzentration in µM. **B**: Die Hemmung der Bildung von konjugierten Dienen aufgetragen gegen die (–)-Epicatechin-Konzentration in µM.

In weiteren Versuchen wurden die Wirkungen der Plasmametaboliten 3'-O-Methylepicatechin und 3'-O-Methylepicatechin-Glucuronid mit denen des (–)-Epicatechins verglichen (Abb. 3.15).

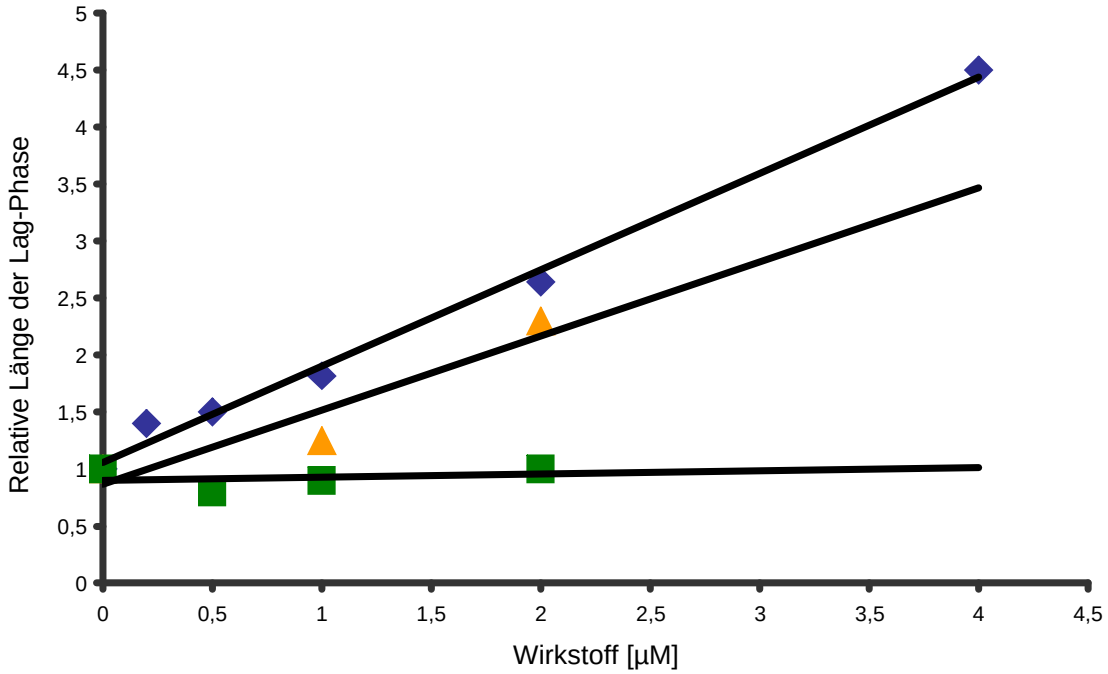


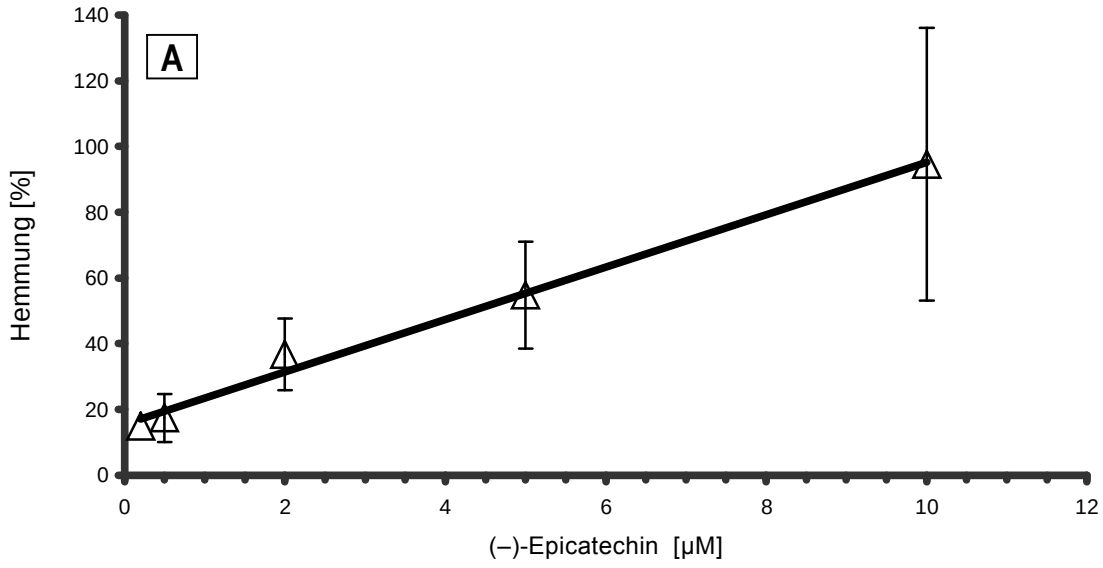
Abb. 3.15: Dosis-Wirkungskurven von (–)-Epicatechin (♦), 3'-O-Methylepicatechin (▲) und 3'-O-Methylepicatechin-Glucuronid (■) im MPO/GOD-System, Reaktionsansatz mit Nitrit allein. Relative Länge der Lag-Phase (τ_{lag}) aufgetragen gegen die Flavonoidkonzentration in µM.

Wie Abb. 3.15 zeigt, unterschieden sich die Effekte von 3'-O-Methylepicatechin nicht von den Blindansätzen ohne Flavonoide. Dieser Metabolit war somit im MPO/GOD-System unwirksam. 3'-O-Methylepicatechin-Glucuronid jedoch verhielt sich, mit einer ED_{200} von ca. 2,0 µM, ähnlich wie (–)-Epicatechin.

3.2.5 Hemmung der basalen Lipidperoxidation des LDL durch MPO mit (–)-Epicatechin

Auch ohne Nitrit und Chlorid findet eine geringe Lipidperoxidation des LDL durch das MPO/GOD-System statt. Nach Zugabe von 30 µM L-Tyrosin (Endkonzentration) waren die Aktivitäten vergleichbar mit den Reaktionsansätzen mit Nitrit, mit dem Unterschied, dass keine Lag-Phase auftrat (PRAKOSAY, 2003).

Diese tyrosin-geförderte Lipidperoxidation wurde durch (–)-Epicatechin in verschiedenen Konzentrationen gehemmt. Durch Extrapolation der resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurven konnte eine IC_{50} von 4,0 µM ermittelt werden (Abb. 3.16 A und B).



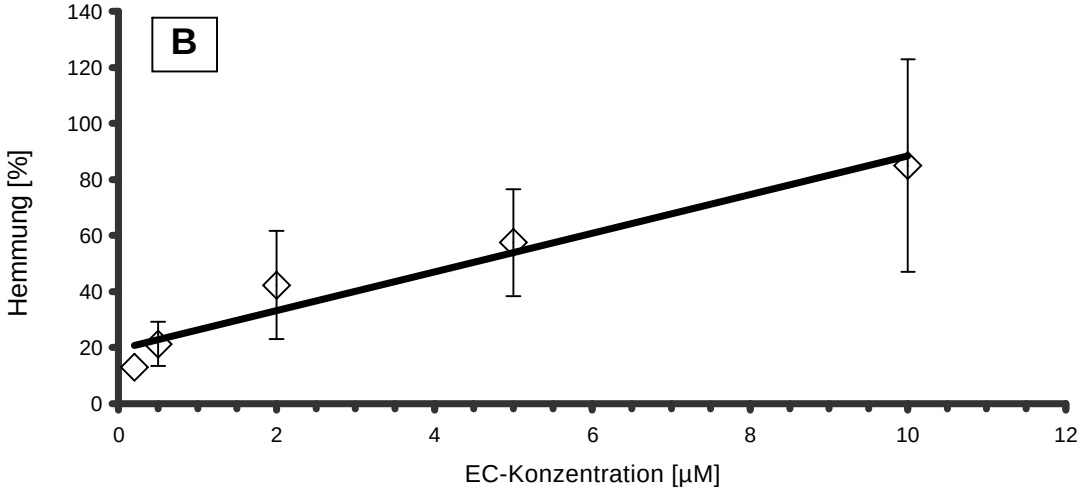


Abb. 3.16 A und B: Dosis-Wirkungskurve von (–)-Epicatechin im MPO/GOD/Tyrosin-System, Reaktionsansatz ohne Nitrit und ohne Chlorid (tyrosin-geförderte Lipidperoxidation). **A**: Die Hemmung der Bildung von konjugierten Dienen aufgetragen gegen die (–)-Epicatechin-Konzentration in µM. **B**: Die Hemmung der Steigung des zeitlichen Verlaufs aufgetragen gegen die (–)-Epicatechin-Konzentration in µM.

3.3 Protein-Tyrosinnitrierung des LDL durch MPO

3.3.1 Etablierung der Methode

Nachdem alle vorausgegangenen Experimente der Lipidkomponente des LDL gewidmet waren, wurde nun die Tyrosinnitrierung des Proteins untersucht. Als Nitrierungsagens wurde Peroxynitrit in einer Konzentration von 500 µM eingesetzt (SCHROEDER *et al*., 2001). Untersucht wurden sowohl die Lipidperoxidation mit Hilfe der Bligh-Dyer-Extraktion, als auch die Proteinnitrierung mittels Dot Blot.

3.3.2 Vergleich von MPO und Peroxynitrit hinsichtlich Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung des LDL

In den nächsten Versuchen wurde Peroxynitrit mit dem MPO/GOD-System verglichen. Es wurde zunächst mit dem Reaktionsansatz mit 50 µM Nitrit gearbeitet.

Das MPO/GOD-System zeigte bei dieser Nitritkonzentration eine deutliche Bildung von konjugierten Dienen, eine Protein-Tyrosinnitrierung war jedoch kaum nachweisbar (Abb. 3.17). Diese wurde erst ab einer Nitritkonzentration von 100 µM beobachtet. Erwartungsgemäß modifizierte die MPO stärker die Lipid-, als die Proteinkomponente des LDL.

Da die Reaktion in Gegenwart von Chlorid durchgeführt wurde, hätte auch HOCl über eine nicht-enzymatische Reaktion mit Nitrit an der Nitrierung beteiligt sein können (PANASENKO *et al*., 1997). Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, dass eine Erhöhung der Chloridkonzentration die Nitrierung nicht verstärkte (S. Frischholz, unveröffentlicht, 2005).

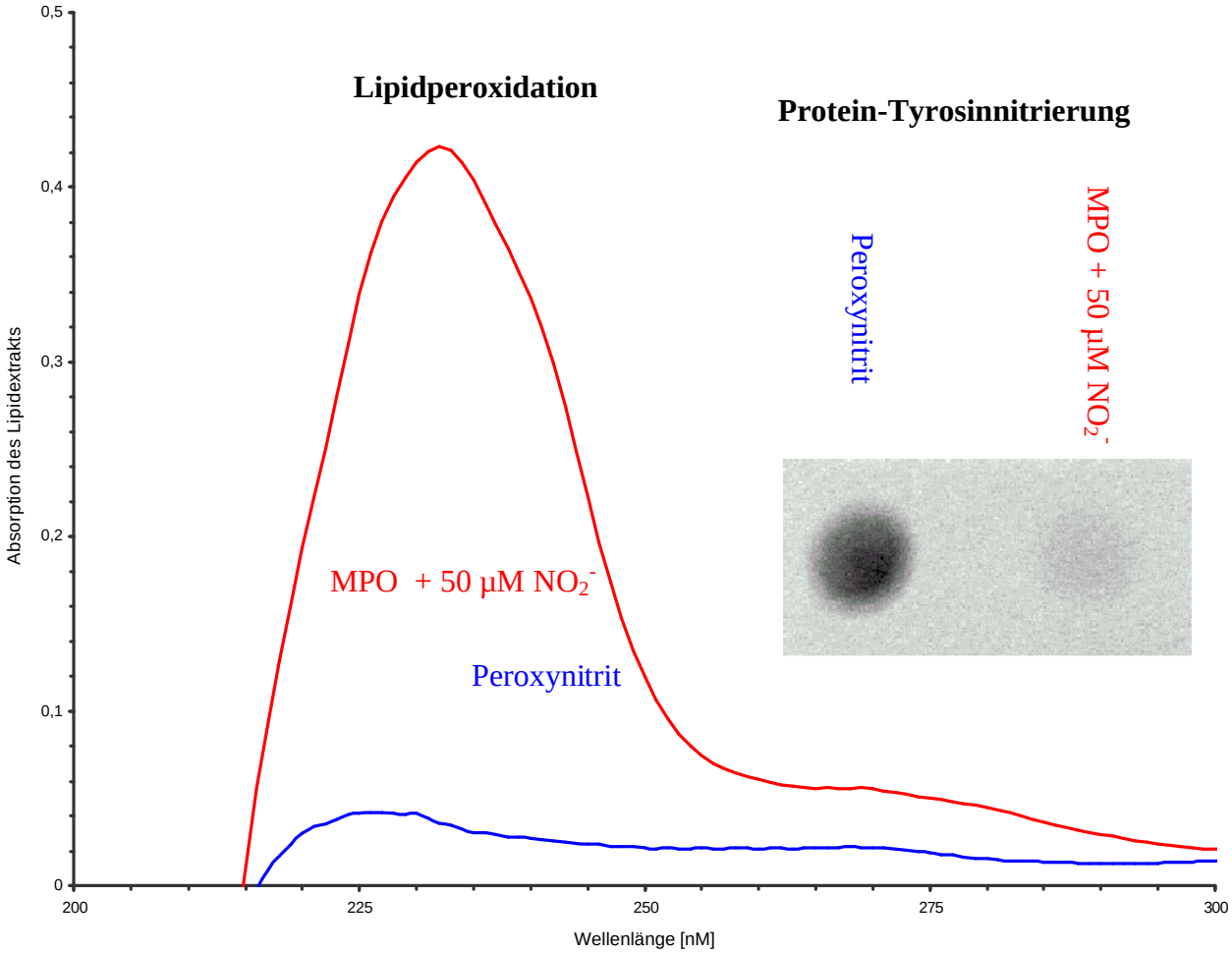


Abb. 3.17: Lipidperoxidation: UV-Differenzspektrum des Lipidextraktes nach Behandlung des LDL mit MPO bzw. Peroxynitrit gegen den Kontrollwert. Protein-Tyrosinnitrierung: Dot-Blot nach Behandlung des LDL mit MPO bzw. Peroxynitrit.

Peroxynitrit als Bolus, in einer Konzentration von 500 µM, zeigte im diametralen Gegensatz zum MPO/Nitrit-System nahezu keine Bildung konjugierter Diene, jedoch eine deutliche Tyrosinnitrierung (Abb. 3.17). Peroxynitrit oxidierte erwartungsgemäß die Lipidkomponente nur wenig oder gar nicht, sondern reagierte hauptsächlich mit der Proteinkomponente des LDL.

3.3.3 Der Einfluss von CO_2 auf die Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung des LDL

Die früheren Versuche wurden ohne Berücksichtigung eines möglichen Einflusses des undefinierten CO_2-Gehaltes der Reaktionsansätze durchgeführt. Kohlendioxid kann mit Peroxynitrit zu Nitrosoperoxokarbonat reagieren (JESSUP *et al*., 1992; DARLEY-USMAR, 1992). Dieses kann sowohl die Lipid-, als auch die Proteinkomponente des LDL modifizieren (FERGUSON *et al*., 1997).

Die bisherigen Versuche mit Peroxynitrit ergaben starke Nitrotyrosinbildung und geringe Lipidperoxidation im Gegensatz zum MPO/ Nitrit-System. *In vivo* liegt eine Plasmakonzentration an Hydrogencarbonat von ca. 25 mM vor. Die Wirkungen des Peroxynitrits könnten in Gegenwart von Hydrogencarbonat größer sein.

Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, wurden die Reaktionsansätze mit Peroxynitrit und MPO jeweils einmal CO_2-frei und einmal mit Zusatz von 25 mM $NaHCO_3$ durchgeführt. Bei der LDL-Präparation wurde CO_2-freies Medium ab der Entsalzungssäule benutzt. Jeder Ansatz wurde hinsichtlich Lipidperoxidation und Nitrotyrosinbildung untersucht (Abb. 3.18).

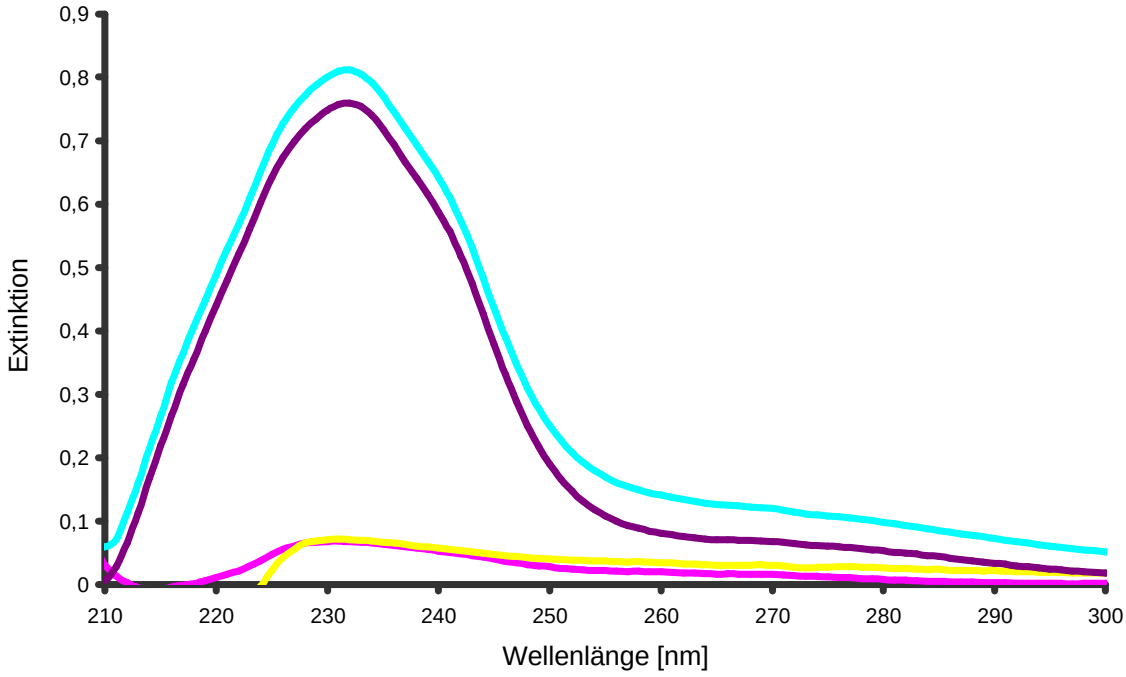


Abb. 3.18: UV-Differenzspektrum des Lipidextraktes nach Behandlung des LDL mit MPO +Nitrit bzw. Peroxynitrit (PN). PN ohne CO_2 (—), PN mit CO_2 (—), MPO +Nitrit Standardansatz (—), MPO +Nitrit mit CO_2 (—).

Bei der Tyrosinnitrierung bestätigten sich die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche: Peroxynitrit war das wesentlich bessere Nitrierungsagens als das MPO/GOD/Nitrit-System. Es wurde kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne CO_2 deutlich. Demnach schien für die Tyrosinnitrierung durch beide Systeme der CO_2-Gehalt nicht wesentlich zu sein.

Die Ansätze mit und ohne CO_2 unterschieden sich erwartungsgemäß auch nicht hinsichtlich der Bildung konjugierter Diene.

3.3.4 Hemmung der Protein-Tyrosinnitrierung des LDL durch (–)-Epicatechin

Nach Etablierung des Systems wurden die Wirkungen von $ONOO^-$ und MPO + Nitrit auf die Protein-Tyrosinnitrierung verglichen und der Einfluss von Einfluss von (–)-Epicatechin untersucht.

Sowohl die Protein-Tyrosinnitrierung durch $ONOO^-$, als auch durch das MPO/GOD-System mit 100 µM Nitrit wurden durch (–)-Epicatechin bereits in einer Konzentration von 0,1 µM gehemmt. Die Hemmung im Peroxynitrit-System lieferte ein reproduzierbares biphasisches Bild: die geringen und sehr hohen Konzentrationen des Flavonoids schienen einen stärkeren Hemmeffekt zu haben als die mittleren Konzentrationen. Eine starke Hemmung wurde bei 0,1 µM, 10 µM und 30 µM beobachtet, eine schwächere Hemmung bei 0,3 µM, 1 µM/ und 3 µM. Bei 100 µM (–)-Epicatechin trat eine Totalhemmung auf (Abb. 3.19). Das MPO/GOD/Nitrit-System schien empfindlicher zu sein als das $ONOO^-$-System. Eine Totalhemmung trat hier bereits bei 3 µM (–)-Epicatechin auf.

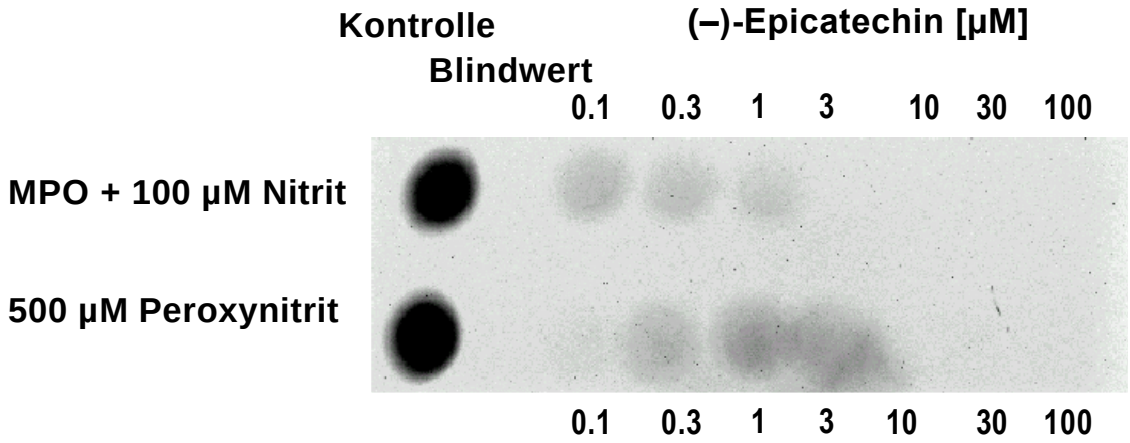


Abb. 3.19: Protein-Tyrosinnitrierung des LDL durch MPO bzw. Peroxynitrit. Hemmung durch (–)-Epicatechin in verschiedenen Konzentrationen.

3.3.5 Wirkung der MPO auf nitriertes LDL

Auch ohne Chlorid und Nitrit fand eine niedrige Lipidperoxidation durch MPO statt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Peroxidase-Reaktionen mit Tyrosinresten des Apo-B-100 zurückzuführen ist (PRAKOSAY, 2003) Es sollte geprüft werden, ob diese Nitrierungen die Reaktion der MPO mit LDL behindern.

In dem folgenden Versuch wurde das LDL vorher mit Peroxynitrit behandelt. Mit diesem modifizierten LDL wurde die Reaktion mit MPO in Gegenwart und Abwesenheit von 50 µM Nitrit durchgeführt. Als Kontrolle dienten Parallelansätze mit nicht-modifiziertem LDL.

Die vorherige Nitrierung durch Peroxynitrit unterdrückte die Reaktionen der MPO mit LDL, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Nitrit nahezu vollständig (Abb. 3.20).

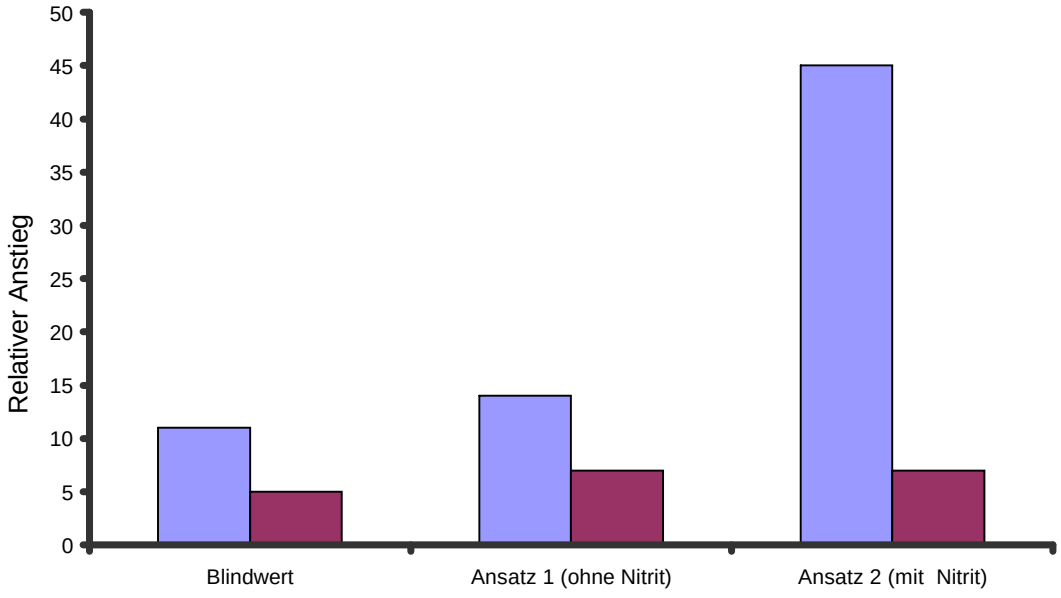


Abb. 3.20: Relativer Anstieg des zeitlichen Verlaufs bei 234 nm von unbehandeltem LDL (■) und peroxynitritbehandeltem LDL (■), in Abwesenheit und in Gegenwart von Nitrit.

4. Diskussion

4.1 Handhabung und Anwendungsmöglichkeiten des MPO/GOD-Systems

Mit der Methode von KLEINVELD *et al*. (1992) wurde ein einfaches Verfahren der LDL-Präparation angewendet. Durch die kurze Dauer der Präparation (~ 4 h) wurde das Risiko einer spontanen Modifikation durch Autoxidation minimiert. Herkömmliche Verfahren der LDL-Isolierung haben hingegen einen Zeitaufwand von mehr als 24 Stunden.

Es wurde ein System etabliert, in dem die oxidative Modifikation des LDL durch MPO untersucht werden konnte. Das MPO/GOD-System erwies sich von den beiden erprobten Varianten dabei als besser geeignet und kann aufgrund seiner einfachen Handhabung auch für Screeningzwecke einsetzt werden. Um die MPO-vermittelte Lipidperoxidation zu quantifizieren, wurde die Extinktionsänderung der Verlaufskurven bei 234 nm verfolgt. Dies ist das Absorptionsmaximum der konjugierten Diene (veresterte und nicht-veresterte Hydro(pero)xypolyen-Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen). Durch UV-spektrophotometrische Bestimmung der Menge an konjugierten Dienen im Lipidextrakt wurde sichergestellt, dass die beobachtete Extinktionsänderung bei 234 nm im kompletten Reaktionsansatz wirklich auf die Lipidperoxidation und nicht etwa auf Veränderungen der Absorption des Apo B-100 oder Trübungseffekte zurückzuführen ist.

Mit der Bestimmung der Menge von konjugierten Dienen im Lipidextrakt nach Reaktionsende und des zeitlichen Anstiegs der Extinktion im kompletten Reaktionsantrag wurden zwei unabhängige Parameter der Lipidperoxidation erfasst. Als dritter wichtiger Parameter erwies sich die Länge der Lag-Phase der Bildung konjugierter Diene im Gesamtansatz.

Die Bestimmung der konjugierten Diene stellt einen sichereren Parameter dar als die Erfassung nur eines ausgewählten Oxidationsproduktes wie z. B. 9-HODE (9-Hydroxyoctadecadiensäure) mittels HPLC, wie sie von anderen Arbeitsgruppen angewendet wurde (BUYN *et al*., 1999; SCHMITT *et al*., 1999).

9-HODE macht nur einen geringen Anteil an der Gesamtmenge der konjugierten Diene im oxidierten LDL aus.
Denkbar ist auch ein Einsatz des MPO/GOD-Systems für *ex vivo*-Eperimente. Dabei müsste LDL aus dem Serum von Probanden präpariert werden, denen vorher flavonoidreiche Präparate verabreicht wurden. In diesem Fall müsste der zeitliche Verlauf der Bildung konjugierter Diene nach MPO-Zusatz eine erhöhte Resistenz des LDL gegenüber der Lipidperoxidation anzeigen.

Die Nitritabhängigkeit der MPO-vermittelten Lipidperoxidation von LDL wurde zuerst von BUYN *et al*. (1999) beschrieben. Diese Autoren vermuten aufgrund ihrer Ergebnisse, dass die hochreaktive Verbindung, die für die Lipidperoxidation verantwortlich ist, $NO_2^{\cdot}$ sein könnte, und nicht Nitrosylchlorid oder HOCl. Andere Arbeitsgruppen haben kurz darauf ebenfalls eine starke Stimulation der MPO-vermittelten Lipidperoxidation durch Nitrit beobachtet (SCHMITT *et al*., 1999). Der direkte Beweis für die Bildung von $NO_2^{\cdot}$ durch MPO und Nitrit wurde von BRENNAN *et al*. (2002) erbracht. Diese Literaturangaben decken sich mit eigenen Ergebnissen. Dabei kommt es vor allem zu einer Lipidperoxidation des LDL. Die Tyrosinnitrierung des Apo B-100 scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen und erfolgte bei den hier beschriebenen Untersuchungen erst bei unphysiologisch hohen Nitritkonzentrationen. Nitrit scheint sowohl die tyrosin-, als auch die chloridabhängigen Reaktionen der MPO zu unterdrücken, wie aus Arbeiten von CARR und FREI (2001) hervorgeht. In Abwesenheit von Chlorid und Nitrit wurde eine geringe Geschwindigkeit der MPO-vermittelten Lipidperoxidation des LDL beobachtet. Dies deckt sich mit Ergebnissen von HEINECKE (2002), der die basale Lipidperoxidation auf Tyrosyl-Radikale im Apo B-100 zurückführt. Die Zugabe von Nitrit führt zu einer signifikanten Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100 µM Nitrit (PRAKOSAY, 2003).

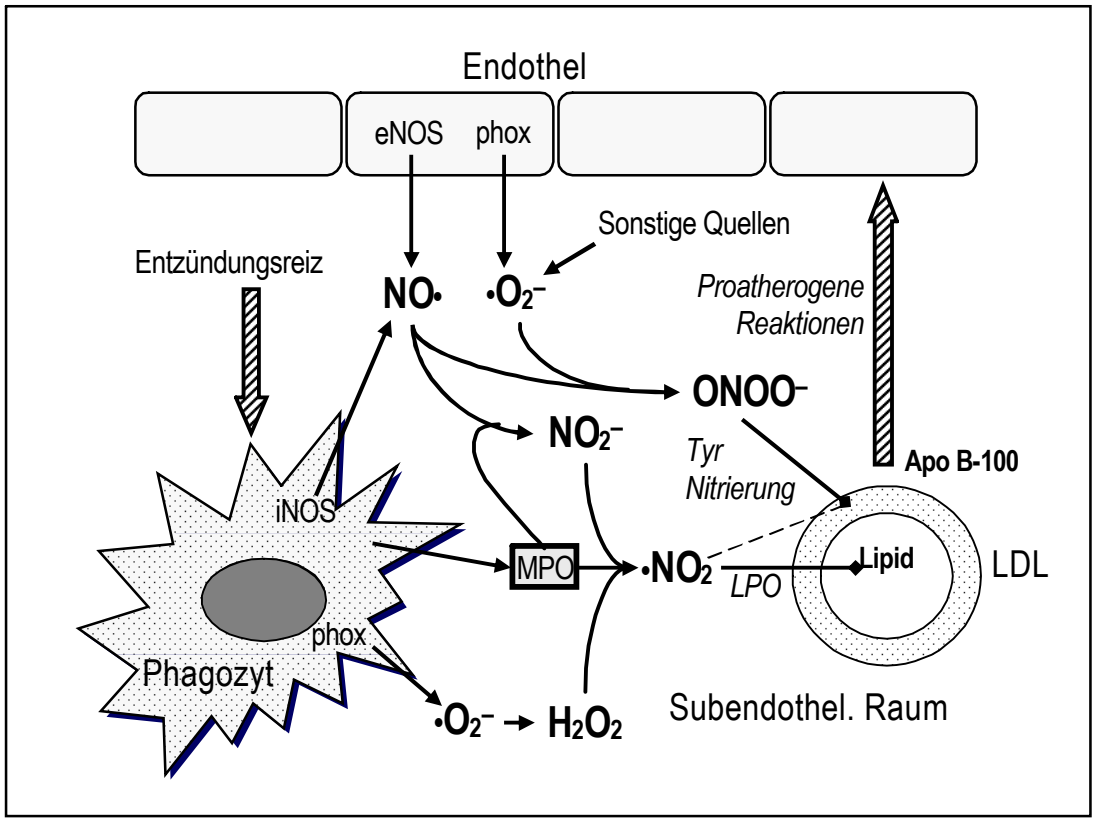


Abb. 4.1: Interaktionen von NO-Stoffwechsel, MPO und LDL im subendothelialen Raum während der Atherogenese. Ein endothelialer Gefäßschaden führt zum Eindringen von LDL und zur Phagozytenmigration. Die Phagozytenaktivierung führt zur Sekretion der MPO und zur Bildung von NO durch NO-Synthase (insbesondere iNOS) sowie von $^{\bullet}O_2^-$ durch NADPH-Oxidase (phox). MPO oxidiert NO zu NO_2^-, das in Gegenwart von MPO mit H_2O_2 zu $NO_2^{\bullet}$ reagiert. $NO_2^{\bullet}$ ist der eigentliche Auslöser der Lipidperoxidation des LDL. Alternativ reagiert NO mit $^{\bullet}O_2^-$ zu Peroxynitrit, das zur Tyrosinnitrierung des Apo B-100 beitragen könnte. Das modifizierte LDL (oxLDL) führt zu weiteren Endothelschädigungen und so schließt sich ein Teufelskreis (modifiziert nach SCHEWE und SIES, 2005).

Chlorid, das „klassische“ Substrat der MPO wird für die Lipidperoxidation des LDL nicht benötigt. Die Oxidation scheint nicht über HOCl-vermittelte Reaktionen abzulaufen, sondern vor allem über NO_2 (Abb. 4.1). *In vitro* führt HOCl überwiegend zu Modifikationen des Apo B-100. Eine Lipidperoxidation findet kaum statt, wie sowohl eigene Ergebnisse als auch Literaturangaben zeigen (CARR *et al*., 2000b).

4.2 Hemmung verschiedener Arten der Lipidperoxidation von LDL durch Flavonoide

Die Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen ist ein hinsichtlich Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit einfaches Modell und wurde daher von vielen Untersuchern als Testsystem auf antioxidative Verbindungen eingesetzt.

Mit diesem System wurden die Wirkungen von (+)-Catechin, (–)-Epicatechin und Quercetin verglichen. Die Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Wirksamkeit der drei Flavonoide hinsichtlich der Hemmung der Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen. Der Wirkmechanismus der Flavonoide besteht in diesem System vermutlich in einer Kupfer-Komplexbildung. Damit lässt sich auch die fehlende Selektivität hinsichtlich einzelner Verbindungsklassen von Flavonoiden erklären.

Die Länge der Lag-Phase der Lipidperoxidation durch Kupferionen ist um eine Zehnerpotenz größer als die entsprechende Länge im MPO/GOD/Nitrit-System. Unter vergleichbaren Bedingungen betrug τ_{lag} im Kupfersystem 62 ± 20 min und im MPO/GOD/Nitrit-System 6,6 ± 1,9 min.

Die Flavonoide haben im Kupfersystem nur τ_{lag} verlängert, ohne die maximale Menge an konjugierten Dienen zu beeinflussen. Die Effektivität von (–)-Epicatechin und anderen Kakao-Flavonoiden auf die Verlängerung von τ_{lag} im Kupfersystem und im MPO/GOD/Nitrit-System war vergleichbar. Signifikante Effekte wurden bereits bei Flavonoidkonzentrationen von 0,3 µM erzielt, die auch im Plasma erreicht werden können.

Für die Lipidperoxidation durch das MPO/GOD-System scheint die Verlängerung der Lag-Phase durch Flavonoide mit der MPO-katalysierten Flavonoid-Oxidation zu korrelieren. KOSTYUK *et al*. (2003) haben nachgewiesen, dass Flavonoide als direkte Substrate der MPO dienen können. Deswegen kann eine direkte Hemmung der MPO-Aktivität durch Flavonoide ausgeschlossen werden. Der Wirkmechanismus der Flavonoide mit MPO und Nitrit ist noch nicht genau verstanden. Mögliche Angriffspunkte sind Compound I und Compound II; die Interaktion führt zur Oxidation der Flavonoide. Möglicherweise konkurrieren die Flavonoide auch mit Nitrit um das aktive Zentrum der MPO, und unterdrücken so die Bildung von $NO_2^{\cdot}$. Ein anderer hypothetischer Wirkmechanismus wäre das direkte Abfangen von $NO_2^{\cdot}$. Dies passiert wahrscheinlich am aktiven Zentrum des Enzyms, wo das Flavonoid gebunden wird. Das Abfangen des $NO_2^{\cdot}$, bevor es die Lipidkomponente des LDL erreichen und oxidieren kann, sollte zwangsläufig zu einer Unterdrückung der Lipidperoxidation führen.

Die Effektivität, mit der (–)-Epicatechin und andere Kakao-Flavonoide die Lipidperoxidation des LDL durch MPO hemmen, wird von anderen lipophilen Antioxidantien, wie Vitamin E und Probucol nicht erreicht (BUYN *et al*., 1999; HEINECKE, 2003). Für diese Substanzen wurde nur eine geringe Hemmung bei 50 µM festgestellt, wohingegen (–)-Epicatechin bereits bei 2 µM signifikante Effekte ausübt und bei 10 µM eine totale Hemmung zeigt. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen von Antioxidantien liegt vermutlich in der größeren Reaktivität der Flavonoide gegenüber $NO_2^{\cdot}$ begründet.

Es ist zu vermuten, dass Kakao-Flavonoide über verschiedene Mechanismen die oxidativen Modifizierungen des LDL durch Kupferionen, MPO/Nitrit und Peroxynitrit *in vitro* hemmen und damit die Umwandlung des LDL in ein atherogenes Molekül verhindern.

4.3 Universalität der Schutzwirkung von Flavonoiden gegenüber atherogenen Modifizierungsreaktionen des LDL

Eine Reihe von Flavonoiden hemmt im mikromolaren Konzentrationsbereich die Lipidperoxidation von LDL durch MPO. Sie hemmen konzentrationsabhängig zum einen die Reaktionsgeschwindigkeit und zum anderen die Menge an konjugierten Dienen, die im Reaktionsansatz gebildet werden. Es wurde gezeigt, dass (–)-Epicatechin auch die bei hohen Nitritkonzentrationen beobachtete Protein-Tyrosinnitrierung von LDL hemmt.

Modellreaktion	**Prozess**
MPO/Nitrit	Lipidperoxidation
MPO/Tyrosin	
Cu^{2+}	
MPO/Nitrit	Protein-Tyrosinnitrierung
Peroxynitrit	

Tab. 4.1: Die verschiedenen Modelle, an denen die Schutzwirkungen von Flavonoiden gegenüber Lipidperoxidation bzw. Protein-Tyrosinnitrierung von LDL nachgewiesen wurde.

4.4 Vergleich der Wirkungen von MPO und Peroxynitrit auf Lipidperoxidation und Protein-Tyrosinnitrierung von LDL

Interessanterweise konnte unter den experimentellen Bedingungen der MPO/Nitrit-vermittelten Lipidperoxidation keine Bildung von Nitrotyrosin nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Reaktionen der MPO mit LDL sich bei physiologischen Nitritkonzentrationen auf die Lipidkomponente des LDL zu beschränken scheinen. Die in der Arterienintima gefundenen Oxidationsprodukte des Apo B-100 scheinen daher nicht auf Reaktionen der MPO mit dem LDL zurückzuführen zu sein. Möglicherweise geht die Protein-Tyrosinnitrierung des LDL *in vivo* von Peroxynitrit aus, dessen Reaktionsselektivität im diametralen Gegensatz zur MPO steht. Peroxynitrit zeigt nahezu keine Bildung konjugierter Diene, aber eine deutliche Tyrosinnitrierung.

ESPEY *et al*. (2002) hingegen postulieren, dass die Bildung von NO_2 durch Hämperoxidasen, wie MPO, eine biologisch wichtigere Rolle spielt, als die Protein-Tyrosinnitrierung durch Peroxynitrit. Die Autoren kritisieren speziell den Einsatz von Peroxynitrit-Boli von > 250 µM, da diese *in vivo* nicht vorkommen. Die Nitritkonzentration, bei der eine Absorptionsminderung von 50 % ihres Testsystems (GFP) beschrieben wird, liegt jedoch bei 250 µM und damit ebenfalls jenseits des physiologischen Bereichs in der Arterienintima.

Das MPO/GOD-System zeigte in den hier dargestellten Untersuchungen schon bei einer Nitritkonzentration von 50 µM eine beträchtliche Bildung von konjugierten Dienen, aber nur eine geringe Tyrosinnitrierung. Ein solches Verhalten ist kaum mit einem einheitlichen Mechanismus beider Reaktionen zu erklären; vielmehr spricht es für eine unterschiedliche Wirkungsweise des MPO/Nitrit-Systems bei niedrigen und hohen Nitritkonzentrationen.

Nach Ansicht von MONZANI *et al*. (2004) gibt es zwei alternative Mechanismen der nitrierenden Reaktion der MPO mit Nitrit, die dort als "Pathway A" und "Pathway B" bezeichnet werden. Die Lipidperoxidation des LDL durch MPO/Nitrit erfolgt über "Pathway A" und findet bei physiologisch relevanten Nitritkonzentrationen statt, die Nitrierung des LDL erfolgt hingegen über "Pathway B", erfordert aber unphysiologisch hohe Nitritkonzentrationen. Für Pathway B postulieren die Autoren die Beteiligung eines Peroxidase-Peroxynitrit-Komplexes als nitrierendes Agens; in Einklang mit einem solchen Mechanismus für die Nitrierung des LDL durch MPO steht die starke Nitrierung durch freies Peroxynitrit (Abb. 3.17 und 3.19)

Die Frage, Inwieweit Flavonoide die Modifizierung des Apo B-100 durch MPO/Chlorid beeinflussen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden und bleibt Folgeuntersuchungen vorbehalten. NUSZKOWSKI *et al*. (2001) postulieren, dass die Hemmung der NO-Synthase durch HOCl-modifiziertes LDL zu Endothelschäden führt und somit ein wichtiger Schritt der Atherogenese ist. HAZELL und STOCKER (1993) konnten nachweisen, dass HOCl *in vitro* LDL oxidiert und damit zur Schaumzellbildung beiträgt.

5. Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Oxidative Modifikationen des LDL werden als pathogenetisch bedeutender Schritt in der Atherogenese angesehen. Für diesen Prozess sind unter anderem Metallionen, die Myeloperoxidase (MPO) und Peroxynitrit verantwortlich.

Es sollte geprüft werden, ob Flavonoide die oxidativen Modifizierungen des LDL hemmen. Flavonoide sind natürliche Pflanzenfarbstoffe, die unter anderem in hohen Konzentrationen in Kakaoprodukten vorkommen.

Methodik: In den Reaktionsansätzen wurde das LDL entweder durch Kupferionen, MPO oder Peroxynitrit modifiziert. Als Parameter der Lipidperoxidation wurde die Bildung konjugierter Diene photometrisch bei 234 nm und im Lipidextrakt gemessen. Um die Protein-Tyrosinnitrierung zu untersuchen, wurden Dot-Blots durchgeführt. Den Reaktionsansätzen wurden Kakao-Flavonoide in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

Ergebnisse:

1. Bei der Lipidperoxidation des LDL durch Kupferionen ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Flavonoid-Dosis und der auf die Kontrolle normierten Lag-Phase (τ_{lag}).

2. Im MPO/GOD-System ist die Anwesenheit von Nitrit eine wesentliche Voraussetzung für eine hohe Lipidperoxidation des LDL.

3. Die Lipidperoxidation des LDL wurde durch (–)-Epicatechin dosisabhängig gehemmt. Dieser Effekt beruht auf zwei Komponenten; zum einem auf einer Verlängerung der Länge der Lag-Phase und zum anderen auf einer Hemmung der Geschwindigkeit der Dienbildung.

4. Die Hemmung der Protein-Tyrosinnitrierung durch (–)-Epicatechin lieferte ein biphasisches Bild: geringe und sehr hohe Konzentrationen des Flavonoids schienen einen stärkeren Hemmeffekt auszuüben als mittlere Konzentrationen.

Schlussfolgerung: Kakao-Flavonoide verhindern die Umwandlung des LDL in ein atherogenes Molekül, indem sie die oxidativen Modifizierungen durch Kupferionen, MPO/Nitrit und Peroxynitrit *in vitro* hemmen.

6. Literaturverzeichnis

Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinauer MC, Maeda N, Koyama H (2004). *In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense. *Jpn J Infect Dis*. 57: S15

Arteel GE, Sies H (1999). Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett*. 462, 167–170

Arteel GE, Schroeder P, Sies H (2000). Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr*. 130: 2100S–2104S

Arts ICW, Hollmann PCH, Kromhout D (1999). Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet*. 354, 488

Assmann G, Cullen P, Schulte H (1998). The Münster Heart Study (PROCAM). Results of a follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 19, Suppl A:A2-11

Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC et al. (2001). Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosin nitration. *J Clin Invest*. 108: 1759–1770

Berliner JA, Heinecke JW (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 20: 707–27

Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.*. 37(8): 911–7

Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT et al. (2002). A tale of two controversies. Defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation *in vivo* using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 277: 17415–17427

Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL (2003). Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*. 23: 1595–604

Buijsse B, Feskens, EJM, Kok FJ, Kromhout D (2006). Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality. The Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med*. 166: 411–417

Burner U, Furtmüller PG, Kettle AJ, Koppenol WH, Obinger C (2000a). Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J Biol Chem*. 275: 20597–20601

Burner U, Krapfenbauer G, Furtmüller PG, Regelsberger G, Obinger C (2000b). Oxidation of hydroquinone, 2,3-dimethylhydroquinone and 2,3,5-trimethylhydroquinone by human myeloperoxidase. *Redox Rep*. 5: 185–190

Byun J, Mueller DM, Fabjahn JS, Heinecke JW (1999). Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low-density lipoprotein. *FEBS Lett*. 455: 243–246

Cadenas E, Sies H (1998) The lag phase. *Free Radic Res*. 28(6): 601–9

Carr AC, Myzak MC, Stocker R, McCall MR, Frei B (2000a). Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Lett*. 487: 176–180

Carr AC, Tijerina T, Frei B (2000b). Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine-dependent modifications of low-density lipoprotein. *Biochem J*. 346: 491–499

Carr AC, Frei B (2001). The nitric oxide congener nitrite inhibits myeloperoxidase/H_2O_2/Cl^--mediated modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 276(3): 1822–8

Chisolm GM, Steinberg D (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*. 28: 1815–26

Cox DA, Cohen ML (1996). Effects of oxidized low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications of atherosclerosis. *Pharmacol Rev*. 48: 3–19

Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S (1992). The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*. 17: 9–20

Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 94: 437–444

Dillinger TL, Barriga P, Escarcega S, Jiminez M, Lowe DS, Grivetti LE (2000). Food of the Gods – Cure for Humanity? *J Nutr*. 130: 2057S–2072S

Dolecek TA, Milas NC, Van Horn LV, Farrand ME, Gorder DD, Duchene AG, Dyer JR, Stone PA, Randall BL (1986). A long-term nutrition intervention experience: lipid responses and dietary adherence patterns in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *J Am Diet Assoc*. 86: 752–8

Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Lusis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA (2002). Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296: 2391–2394

Espey MG, Xavier S, Thomas DD, Miranda KM, Wink DA (2002). Direct real-time evaluation of nitration with green fluorescent protein in solution and within human cells reveals the impact of nitrogen dioxide vs. peroxynitrite mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(6): 3481–6

Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourd'Heuil D, Kelm M (2002). Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO *in vivo*. *FASEB J*. 16: 1775–85

Fenna R, Zeng J, Davey C (1995). Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1: 653–6

Ferguson E, Singh RJ, Hogg N, Kalyanaraman B (1997). The mechanism of apolipoprotein B-100 thiol depletion during oxidative modification of low-density lipoprotein. *Arch Biochem Biophys*. 341: 287–94

Furtmüller PG, Burner U, Jantschko W, Regelsberger G, Obinger C (2000). Two-electron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase. *FEBS Lett*. 484: 139–143

Galijasevic S, Saed GM, Diamond PP, Abu-Soud HM (2003). Myeloperoxidase up-regulates the catalytic activity of inducible nitric oxide synthase by preventing nitric oxide feedback inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 14766–14771

Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri G (2005). Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr*. 81: 611–4

Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, Heinecke JW (2004). Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 90: 724–33

Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr*. 130: 2086S–92S

Hazell LJ, Stocker R (1993). Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite cause transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J*. 290: 165–172

Hazell LJ, van den Berg JJ, Stocker R (1994). Oxidation of low density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. *Biochem J*. 302: 297–304

Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A (1987). The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 262: 10098–10103

Heinecke JW (2002). Tyrosyl radical production by myeloperoxidase: a phagocyte pathway for lipid peroxidation and dityrosine cross-linking of proteins. *Toxic*. 177: 11–22

Heinecke JW (2003). Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 91: 12A–16A

Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H (2003). Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *J Am Med Assoc*. 290: 1030–31

Holvoet P (1999). Endothelial dysfunction, oxidation of low-density lipoprotein, and cardiovascular disease. *Ther Apher*. 3: 287–293

Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K (2003). Myeloperoxidase has directely-opposed effects on nitration reaction – study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radic Res*. 37: 481–489

Jessup W, Mohr D, Gieseg Sp, Dean RT, Stocker R (1992). The participation of nitric oxide in cell free- and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1180: 73–82

Kannel WB, Neaton JD, Wentworth D, Thomas HE, Stamler J, Hulley SB, Kjelsberg MO (1986). Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MRFIT. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am Heart J*. 112: 825–36

Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH (2005). Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*. 81 (suppl): 298S–303S

Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN (1992). Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem*. 38(10): 2066–72

Koppenol WH, Kissner R, Beckman JS (1996). Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? *Methods Enzymol*. 269: 296–302

Kostyuk VA, Kraemer T, Sies H, Schewe T (2003). Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. *FEBS Lett*. 537: 146–150

Kühn H, Belker J, Suzuki H, Yamamoto S (1994). Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities. *J Lipid Res*. 35: 1749–1759

Lazarus SA, Hammerstone JF, Schmitz HH (1999). Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. *Lancet*. 354: 1825

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem*. 51: 7292–5

Malle E, Waeg G, Schreiber R, Gröne EF, Sattler W, Gröne HF (2000). Immunhistochemical evidence for the myeloperoxidase/H_2O_2/halide system in human atherosclerotic lesions. Coloalization of myeloerpoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur J Biochem*. 267: 4495–4503

Manach C, Morand C, Crespy V, Demigné C, Texier O, Régérat F, Rémésy C (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant. *FEBS Lett*. 426: 331–336

Mitchell AE, Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH, Keen CL, Rucker R (1999). Identification of procyanidin oligomers in cocao and chocolate using HPLC and electrospray ionisation mass spectrometry (ESI/MS) *FASEB*. Abstract 204.6

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

Monzani E, Roncone R, Galliano M, Koppenol WH, Casella L (2004). Mechanistic insight into the peroxidase catalyzed nitration of tyrosine derivatives by nitrite and hydrogen peroxide. *Eur J Biochem*. 271, 895–906

Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, *et al*. (1997). Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 78: 97–107

Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakamura Y, Osawa T, Terao J (2003). Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med*. 34 (7) : 840–9

Natsume M, Osakabe N, Yasuda A, Baba S, Tokunaga T, Kondo K, Osawa T, Terao J (2004). In vitro antioxidative activity of (-)-epicatechin glucuronide metabolites present in human and rat plasma. *Free Radic Res*. 38 (12) : 1341–8

Nuszkowski A, Gräbner R, Marsche G, Unbehaun A, Malle E, Heller R (2001). Hypochlorite-modified low density lipoprotein inhibits nitric oxide synthesis in endothelial cells via an intracellular dislocalization of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 276: 14212–21

Panasenko OM, Briviba K, Klotz LO, Sies H (1997). Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Arch Biochem Biophys*. 343(2):254-9

Pearson DA, Schmitz HH, Lazarus SA, Keen CL (2001). Inhibition of *in vitro* low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present n chocolate and cocao. *Methods Enzymol*. 335: 350–60

Pfeiffer S, Lass A, Schmidt K, 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

Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL (2000). Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 28: 1717–1725

Prakosay I (2003). Untersuchungen zur Rolle des Myeloperoxidase/Nitrit-Systems für die oxidative Modifizierung von low-density lipoprotein und zur Schutzwirkung von Flavonoiden. Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Ramljak D, Romanczyk LJ, Metheny-Barlow LJ, Thompson N, Knezevic V, Galperin M, Ramesh A, Dickson RB (2005). Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 4: 537–46

Rein D, Pearson DA, Paglieroni T, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL (2000a). Cocao inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr*. 72: 30–35

Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG (2000b). Epicatechin in human plasma: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma antioxidant capacity. *J Nutr*. 130: 2109S–2114S

Reynolds WF, Rhees J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, Masliah E (1999). Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 155: 31–41

Rodriguez J, Maloney RE, Rassaf T, Bryan NS, Feelisch M (2003). Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 336–41

Sadik C (2005). Ernährungsrelevante Polyphenole als Lipoxygenaseinhibitoren: Struktur-Wirkungsbeziehungen und Wirkungsmechanismus. Doktorarbeit der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Sano J, Inami S, Seimiya K, Ohba T, Sakai S, Takano T, Mizuno K (2004). Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease. *Circ J*. 68: 665–70

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

Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kühn H, Sies H (2001). Polyphenols of cocao: Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem*. 382: 1687–1696

Schewe T, Sies H (2005). Myeloperoxidase-induced lipid peroxidation of LDL in the presence of nitrite. Protection by cocoa flavonols. *Biofactors*. 24: 49–58

Schmitt D, Shen Z, Zhang R, Colles SM, Wu W, Salomon RG, Chisolm GM, Hazen SL (1999). Leukocytes utilize Myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry*. 38: 16904–16915

Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Enunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, Keen CL (2001). Chocolate procyanidins decrease the leukotriene/ prostacyclin ration in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Nutr*. 73: 36–40

Schroeder P, Klotz LO, Buchczyk DP, Sadik CD, Schewe T, Sies H (2001). Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*. 285: 782–7

Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M (2005). Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr*. 81: 304S–12S

Sparrow CP, Olszewski J (1993). Cellular oxidation of LDL is caused by thiol production in media containing transition metal ions. *J Lipid Res*. 34, 1219–1228

Stamler J, Wentworth D, Neaton JD (1986). Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *J Am Med Assoc.* 256: 2823–8

Steinberg D (1997). Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95: 1062–1071

Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witzum JL, Steinberg D (1984). Modification of low-density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degregation of low-density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81: 3883–3887

Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W (2003). Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *J Am Med Assoc*. 290: 1029–30

Torre D, Ferrario G, Speranza F, Orani A, Fiori GP, Zeroli C (1996). Serum concentrations of nitrite in patients with HIV-1 infection. *J Clin Pathol*. 49: 574–6

van Dalen CJ, Winterbourn, Senthilmohan R, Kettle AJ (2000). Nitrite as substrate and inhibitor of myeloperoxidase. Implication for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. *J Biol Chem*. 275: 11638–11644

van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE (1997). Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem*. 272: 7617–7625

Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM (2001). Effects of cocao powder and dark chocolate on LDL oxidative suspectibility and prostaglandin levels in humans. *Am J Clin Nutr.* 74: 596–602

Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensuna JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL (2000a). A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr*. 130: 2115S–2119S

Wang JF, Schramm DD, Schmitz HH, Keen CL (2000b). Procyanidins contribute to the antioxidant properties of chocolate. *FASEB*. Abstract 350.2

Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruening M, Pfister E, Schewe T, Sies H (2004). Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F_2-isoprostane concentrations in humans. *Free Radic Biol Med*. 37: 411-21

Yang C, Wang J, Krutchinsky AN, Chait BT, Morrisett JD, Smith CV (2001). Selective oxidation *in vitro* by myeloperoxidase of the N-terminal amine in apolipoprotein B-100. *J Lipid Res*. 42(11): 1891–6

Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL (2002). Myeloperoxidase functions as major catalyst for inhibition of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem*. 277: 46116–46122

7. Anhang

7.1 Publikationen

7.1.1 Zeitschriftenbeiträge

Kostyuk VA, Kraemer T, Sies H, Schewe T (2003). Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. *FEBS Lett*. 573: 146-50

Kraemer T, Prakosay I, Date RA, Sies H, Schewe T (2004). Oxidative modification of low-density lipoprotein: lipid peroxidation by myeloperoxidase in the presence of nitrite. *Biol Chem*. 385: 809-18

7.1.2 Abstracts

Kostyuk VA, Vladykovskaya EN, Kostyuk TV, Kraemer T, Sies H, Schewe T (2004). Protective activity of flavonoids in myeloperoxidase and oxyhemoglobin model system utilizing nitrite. Abstracts of the Summer Meeting SFRR-Europe: Reactive oxygen species and antioxidants, July 2004, Łódź, Poland, pp. 173-174

7.1.3 Poster

Schewe T, Kraemer T, Prakosay I, Date RA, Kostyuk VA, Sies H (2003). Lipid peroxidation of low-density lipoprotein by myeloperoxidase in the presence of nitrite. Meeting of the SFRR, June 2003, Ioannina, Greece

Kostyuk VA, Kraemer T, Sies H, Schewe T (2003). Myeloperoxidase /nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. Meeting of the SFRR, June 2003, Ioannina, Greece

Schewe T, Sadik CD, Kraemer T, Date RA, Sies H (2003). Action of cocoa flavanols on prooxidant enzyme systems. 1st International Conference on Polyphenols and Health, November 2003, Vichy, France

Kraemer T, Prakosay I, Kostyuk VA, Sies H, Schewe T (2003). Cocao flavanols protect against myeloperoxidase/nitrite-induced oxidative modification of low-density lipoprotein. 1st International Conference on Polyphenols and Health, November 2003, Vichy, France

7.2 Selbständigkeitserklärung

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

(Tilo Krämer)

Düsseldorf, den 01.06.2006

7.3 Curriculum vitae

10.11.1978	Geburt in Düsseldorf als Sohn von Dr. rer. nat. Silke Krämer (geb. Kubny) und Dr. Dipl.-Ing. Hans-Joachim Krämer
08/1985 – 06/1989	Erich-Kästner-Grundschule, Dormagen
08/1998 – 06/1998	Bettina-von-Arnim-Gymnasium, Dormagen
06/1998	Allgemeine Hochschulreife
08/1998 – 09/1999	Zivildienst am Kreiskrankenhaus Dormagen
10/1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
08/2001	Ärztliche Vorprüfung
02/2002 – 04/2004	Experimentelle Phase der Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2005 – 08/2005	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf, Innere Medizin
08/2005 – 12/2005	Praktisches Jahr am Kantonspital Chur (Schweiz), Gynäkologie und Geburtshilfe
12/2005 – 03/2006	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf, Chirurgie
05/2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 06/2006	Assistenzarzt in den Medizinischen Kliniken des Kreiskrankenhauses Grevenbroich, St. Elisabeth

7.4 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. **Helmut Sies** bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine Unterstützung und für die Möglichkeit an seinem Institut zu forschen.

Bei Herrn Prof. Dr. **Tankred Schewe** bedanken ich mich für die vorzügliche Betreuung meiner Arbeit, für sein großes Engagement und seine zahlreichen Ratschläge und Anregungen.

Frau **Sonja Gründel** danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ihre Tatkraft und ihre große Erfahrung haben mir oft weitergeholfen und ihr unerwarteter Tod hat mich tief erschüttert.

Herrn Prof. Dr. **Vladimir Kostyuk** (Byelorussian State University, Minsk) danke ich für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit und die vielen neuen Erkenntnisse hinsichtlich des MPO-Metabolismus.

Herrn Prof. **Robert J. Hansen** (University of California, Davis) danke ich für die gute Kooperation und die Bereitstellung der (–)-Epicatechin-Plasmametaboliten.

Bei den Mitgliedern der **„Research Group Flavonoids“** und bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I bedanke ich mich für die freundliche und konstruktive Arbeitsatmosphäre.