
Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

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

Zur Wirkung des Flavonoids Epicatechin auf die
Expression und Aktivität der Prostazyklinsynthese
in Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Cornelia Schütt

2007

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Meiner lieben Oma zum Dank

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Funktion des Endothels	1
1.1.1 Bradykinin	1
1.2 Arachidonsäurestoffwechsel	2
1.2.1 Eikosanoide	2
1.2.2 Prostazyklinsynthese (PGIS) und Prostazyklin (PGI ₂)	3
1.3 Die Bedeutung des Endothels in der Atherogenese	4
1.4 Klinische Bedeutung der Atherosklerose	6
1.5 Kakao – nicht nur ein Genussmittel	9
1.5.1 Flavonoide	10
1.5.1.1 Metabolismus und Pharmakokinetik der Flavonoide	11
1.5.2 Epicatechin	13
1.6 Ziel der Arbeit	15
1.6.1 Ausschluss einer Schädigung der Zellen durch Epicatechin	15
1.6.2 Beeinflussung der Expression der PGI ₂ -Synthase auf der Ebene der Transkription	15
1.6.3 Modulation der Enzymaktivität der PGIS	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Untersuchungsmaterialien und Chemikalien	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Nährmedien und Puffer	17
2.2 Reagenzien	20
2.3 Zellbiologische und molekularbiologische Methoden	22
2.3.1 Zellzucht und Kultivierung	22
2.3.1.1 Kultivieren der MAEC und RAEC	22

2.3.1.2 Kultivieren der EA.hy926 und BAEC	23
2.3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	23
2.4 MTT-Test	24
2.4.1 Prinzip	24
2.4.2 Durchführung	24
2.5 RT-PCR	25
2.5.1 RNA-Isolierung	25
2.5.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA	25
2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	26
2.5.4 Agargelelektrophorese	27
2.6 Enzymimmunoassay 6-keto Prostaglandin F _{1α} EIA	28
3. Ergebnisse	32
3.1 Zytotoxizität von Epicatechin und Quercetin	32
3.2 RT-PCR	34
3.3 6-keto Prostaglandin F _{1α} EIA	36
4. Diskussion	45
4.1 Eignung des MTT-Tests zur Prüfung auf zytotoxische Wirkungen von Polyphenolen	45
4.2 Wie könnten Epicatechin oder andere Polyphenole eine erhöhte Abgabe von PGI ₂ an das Plasma verursachen?	45
4.3 Vorschläge für weiterführende Studien	49
4.3.1 Untersuchungen an Endothelzellen unter Normalbedingungen <i>in vitro</i>	49
4.3.2 Untersuchungen an geschädigten oder gestressten Endothelzellen	49
5. Zusammenfassung	50
6. Abkürzungsverzeichnis	51
7. Literaturverzeichnis	52
8. Anhang	60

8.1. Selbständigkeitserklärung	60
8.2 Curriculum vitae	61
8.3 Danksagung	62

1. Einleitung

1.1 Die Funktion des Endothels

Endothelzellen bilden die Barrierschicht an der Innenseite sowohl des arteriellen als auch des venösen Gefäßsystems. Das Endothel stellt nicht nur eine für niedermolekulare Substanzen permeable Grenzmembran zwischen Extra- und Intrazellularraum dar, sondern ist darüber hinaus als eigenständiges, metabolisch aktives Organ anzusehen. Neben seiner Funktion als Diffusionsbarriere steuert es einen großen Teil an der Regelung des Kreislaufes durch die Synthese von vasoaktiven Mediatoren bei.

Tab. 1.1 Endotheliale vasoaktive Substanzen

vasodilatative Faktoren	vasokonstriktive Faktoren
Prostazyklin (PGI ₂)	Prostaglandin H ₂ (PGH ₂)
Stickstoffmonoxid (NO)	Thromboxan A ₂ (TXA ₂)
Endothelium-derived-hyperpolarizing factor (EDHF)	Endothelin-1
	Angiotensin II

Die Durchblutung der Organe wird durch eine an die metabolischen Bedürfnisse angepasste Regulation des Gefäßtonus gewährleistet. Zwischen den vasodilatativen und vasokonstriktiven Faktoren besteht ein fein abgestimmtes Gleichgewicht. Ebenso wie Prostazyklin gehört Bradykinin zu den vasoaktiven Substanzen.

1.1.1 Bradykinin

Bradykinin ist ein Oligopeptid, bestehend aus neun Aminosäuren mit folgender Sequenz: Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg. Bradykinin wird zu der Gruppe der Kinine gezählt. Zu den Eigenschaften des Bradykinin gehören zum einen die Beteiligung an der Schmerzvermittlung und zum anderen die rezeptorvermittelte Freisetzung von Inositoltrisphosphat (IP₃) über die Phospholipase C ebenso wie der Anstieg des zytosolischen Ca²⁺. Zu den bisher identifizierten Bradykininrezeptoren werden der B₁ und der B₂-Rezeptor gezählt (HALL, 1992). In den Endothelzellen führt

der Ca^{2+} -Anstieg, über die B_2 -Aktivierung, zu einer Stimulierung der Phospholipase A_2 , und folglich zur Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels. Dies bedingt wiederum eine vermehrte Synthese der vasodilatativen Substanzen wie des Prosta-zyklins.

1.2 Arachidonsäurestoffwechsel

1.2.1 Eikosanoide

Unter dem Begriff Eikosanoide fasst man solche Naturstoffe zusammen, die aus C-20-Polyenfettsäuren durch oxidativen Metabolismus im tierischen und menschlichen Organismus entstehen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind die Vorstufen biologisch aktiver Oxygenierungsprodukte – der Eikosanoide und anderer Oxylipine. Sie lassen sich in zwei Familien einteilen. Diese Fettsäurenfamilien ($\omega 6$ und $\omega 3$) leiten sich metabolisch von der Linolsäure bzw. der α -Linolensäure ab. Bei der Linol- und der α -Linolensäure handelt es sich zudem um essentielle Fettsäuren. Diese essentiellen Fettsäuren müssen mit der Nahrung aufgenommen werden, da sie im Organismus nicht synthetisiert werden können. Andere $\omega 6$ - und $\omega 3$ -Fettsäuren, wie z.B. die Arachidonsäure und die Eikosapentaensäure, werden aus den entsprechenden essentiellen C-18-Fettsäuren durch Desaturierungen (Bildung von cis-Doppelbindungen) und C-Kettenverlängerung gebildet.

Die als Ester in den Phospholipiden zellulärer Membranen vorliegende Arachidonsäure wird zunächst durch eine der verschiedenen Phospholipasen A_2 freigesetzt. Im nächsten Schritt entsteht durch die Zyklooxygenasen, welche in zwei Isoformen (COX I und COX II) vorkommen, zunächst PGG_2 . In der nachfolgenden Reduktion der 15-Hydroperoxygruppe zum Hydroxid durch die den Zyklooxygenasen innewohnende Hydroperoxidaseaktivität entsteht schließlich das PGH_2 (Abb. 1.1)

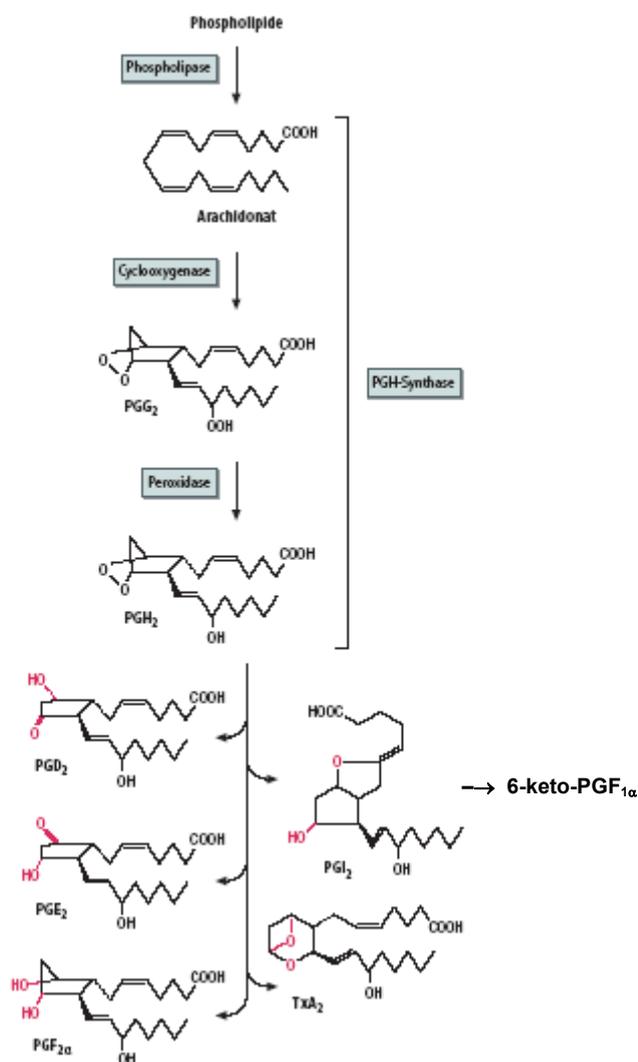


Abb. 1.1 Arachidonsäurestoffwechsel der Zelle (aus Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie 6. Auflage, 1998)

1.2.2 Prostazyklinsynthase (PGIS) und Prostazyklin (PGI₂)

Aus dem COX - Endprodukt PGH₂ wird mittels des Enzyms Prostazyklin-Synthase (PGIS) das Prostazyklin (PGI₂) gebildet. Die Prostazyklinsynthase (PGIS) ist ein Hä-moprotein mit den spektralen Eigenschaften eines Cytochroms P-450 (ULLRICH *et al.*, 1981). Die PGIS überführt durch eine Isomerisierungsreaktion das Prostaglandin-Endoperoxid (PGH₂) in PGI₂. Das Enzym kommt hauptsächlich in den Endothelien und glatten Muskelzellen der Blutgefäße vor. Eine Expression der PGIS wurde auch in anderen Geweben und Organen gefunden, wie z.B. in den Zellen der Ovarien, der Lunge und in der Skelettmuskulatur (YOKOYAMA *et al.*, 1996). Unter Stressbedingungen wurde eine Zunahme der Expression der PGIS beschrieben (WU *et al.*, 2005).

Ebenfalls zeigte sich dabei eine Aktivitätszunahme der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) und der COX II in diesen Zellen. In Zellen des Kolonkarzinoms sowie in Kardiomyozyten konnte nachgewiesen werden, dass die PGI₂-Bildung über die Reaktionsfolge COX II – PGIS erfolgt (GUPTA *et al.*, 2000; CAUGHEY *et al.*, 2001). In der Zellkernhülle und dem endoplasmatischen Retikulum ist die PGIS mit den Enzymen COX I und COX II kolokalisiert. Die PGI₂-Synthese ist nicht allein abhängig von der Konzentration der PGIS, sondern vom Verhältnis PGIS zu COX I. Ein 1:1-Verhältnis beider Enzyme zueinander scheint optimal zu sein (Wu *et al.*, 2005).

Das Hauptprodukt der PGIS ist das Prostazyklin (PGI₂). PGI₂ ist instabil und zerfällt spontan mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Minuten zu 6-keto-PGF_{1α}. PGI₂ ist ein hochpotenter Vasodilatator und ein starker endogener Inhibitor der Plättchenaggregation. Physiologischer Antagonist des Prostazyklins ist Thromboxan A₂ (TXA₂). TXA₂ wird in Thrombozyten gebildet, induziert die Plättchenaggregation und -adhäsion und bewirkt eine Vasokonstriktion. Zu den Wirkungen des PGI₂ auf Blutgefäße gehören die Hemmung der Adhäsion neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten an Endothelzellen, Hemmung der Thrombozytenaggregation und die antiproliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen.

Von klinischem Interesse sind die Wirkungen des PGI₂, die im Zusammenhang mit der Entstehung und der Progression der Atherosklerose stehen. Man geht heutzutage davon aus, dass bei thromboembolischen Erkrankungen eine bedeutende Rolle dem gestörten Gleichgewicht zwischen endothelialer PGI₂-Produktion einerseits und thrombozytärer TXA₂-Synthese andererseits zukommt. Anhand verschiedener Studien konnte gezeigt werden, dass stabile Prostazyklinmimetika in der Lage sind, die Bildung atherosklerotischer Läsionen zu reduzieren sowie die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu verhindern. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass Entstehung und Progression der Atherosklerose mit einer unzureichenden Produktion bzw. Verfügbarkeit von PGI₂ im Zusammenhang stehen könnten.

1.3 Die Bedeutung des Endothels in der Atherogenese

Im engen Zusammenhang mit der Atherogenese steht die endotheliale Dysfunktion. Das Endothel bildet eine Zellschicht, die das Lumen sowohl des arteriellen als auch

des venösen Gefäßsystems auskleidet. Neben seiner Funktion als Diffusionsbarriere reguliert das Endothel die Gefäßwandreparatur und moduliert den Gefäßtonus. Eine endotheliale Dysfunktion kann durch eine Reihe verschiedener Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. oxidiertes LDL, Hypercholesterolämie, Hypertonie, Rauchen und Glukosestoffwechselstörungen. Die Endotheldysfunktion bedingt eine höhere Permeabilität für Lipoproteine und andere Blutbestandteile. Infolge vermehrter Bildung von endothelialen Adhäsionsmolekülen wandern Leukozyten und Monozyten in den subendothelialen Raum ein. Mit der Akkumulation atherogener Plasmalipide in der Intima beginnt die atherosklerotische Läsion. Über Vermittlung durch Matrixkomponenten kommt es zur Bindung vor allem von LDL in oxidativ modifizierter Form. Dies führt zur spontanen oder zellvermittelten Modifikation von Plasma-Lipoproteinen, insbesondere LDL. Modifiziertes LDL wird von Makrophagen über „Scavenger-Rezeptoren“ aufgenommen. Dies zieht die Bildung sogenannter Schaumzellen („foam cells“) nach sich. Dieses Stadium ist zunächst noch reversibel. Durch Substanzen wie PDGF (platelet derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IL-1 beta (interleukin 1 beta), TNF alpha (tumor necrosis factor alpha) und HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor) kommt es im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung von medialen glatten Gefäßmuskelzellen mit deren Proliferation und Einwanderung in die Intima. Der Untergang der Schaumzellen führt zuletzt zu extrazellulären Ablagerungen von Lipiden, die zusammenfließen und den Lipidkern des atherosklerotischen Plaques bilden (Abb.1.2). Die fortschreitende Anhäufung von Lipiden, Einrisse in der Intima und die wiederholte Ablagerung von thrombotischem Material auf Intimaeinrissen können zur Stenosierung des Gefäßlumens und damit zu Symptomen der Schädigung des Herzkreislaufsystems führen.

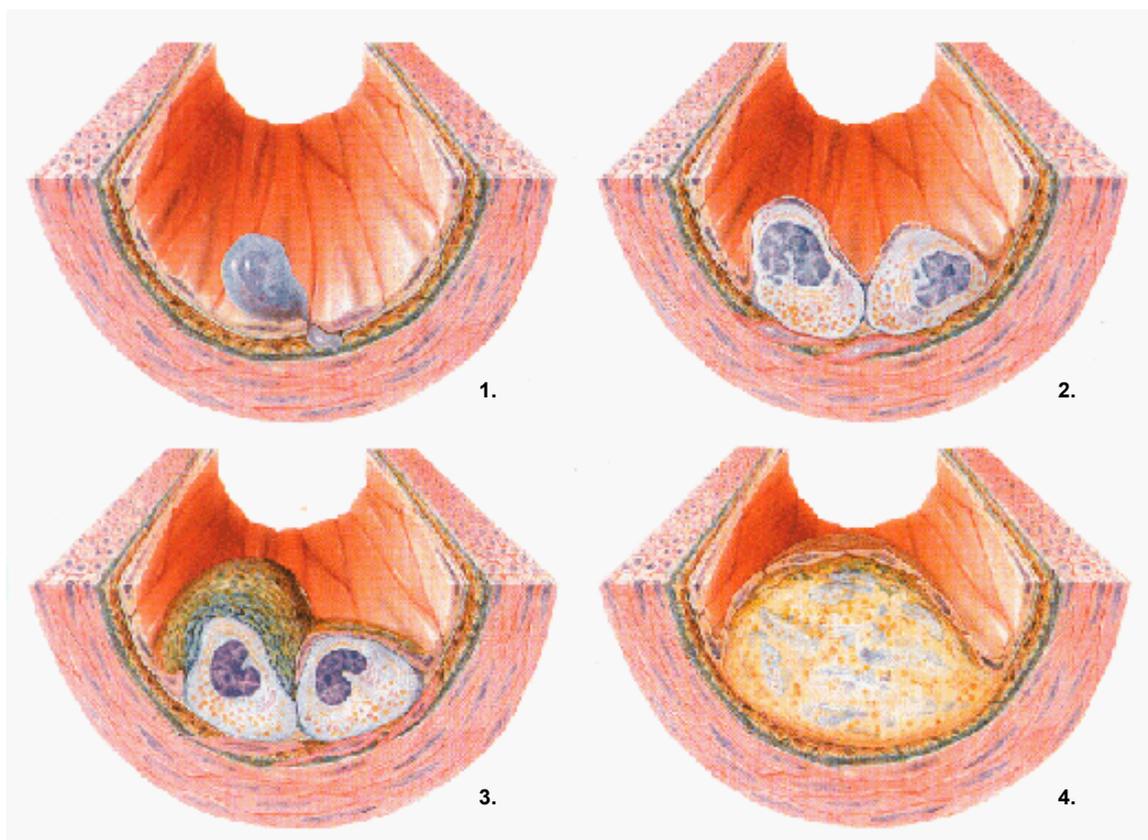


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Atherogenese: 1. Thrombozytenadhäsion, 2. Einwanderung in die Intima, 3. Akkumulation von Lipiden und thrombogenem Material, 4. Plaquebildung und daraus folgende Gefäßlumenverengung (www.h-wie-herz.de)

Hämodynamische Komplikationen können, je nach Lokalisation, z.B. in Form von instabiler Angina pectoris, TIA (transitorische ischämische Attacken) und PRIND (prolongiertes reversibles ischämisches Defizit) auftreten. Durch Plaqueein- oder ausrisse kann es zu embolischen Komplikationen kommen, die ihrerseits zum Verschluss eines Gefäßes in der Endstrombahn führen und so einen ischämischen Infarkt auslösen.

1.4 Klinische Bedeutung der Atherosklerose

Definition der Atherosklerose

Die Bezeichnung Atherosklerose stammt aus dem Griechischen (athära = Grütze, skleros = hart). Die WHO (1957) definiert die Atherosklerose als „variable Kombination von Veränderungen der Gefäßwandintima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen,

Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.“

Die klinischen Folgeerscheinungen bzw. Komplikationen der Atherosklerose sind weltweit, noch vor den Infektionskrankheiten, die Haupttodesursache.

Zu den klinischen Hauptmanifestationen gehören:

- koronare Herzkrankheit (Angina pectoris, Herzinfarkt)
- periphere arterielle Verschlusskrankheit
- zerebrale Ischämie (Schlaganfall, vaskuläre Demenz)

Weitere Folgen betreffen u.a. die

- Aorta (atherosklerotische Aneurysmen),
- Mesenterialgefäße (Angina abdominalis) und
- Nierenarterien (renale Hypertonie, Niereninsuffizienz)

Die Entstehung der Atherosklerose lässt sich durch ein multifaktorielles Geschehen erklären. Viele Risikofaktoren treten häufig zusammen auf. In epidemiologischen Studien konnte in den letzten Jahren eine Reihe von Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose festgestellt werden. ASSMANN *et al.* (1998) konnten in der PROCAM-Studie (Prospective Cardiovascular Münster) zeigen, dass es zum einen unveränderliche Risikofaktoren wie Lebensalter, Geschlecht und familiäre Prädisposition gibt und zum anderen beeinflussbare Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Adipositas, Hypercholesterolämie, Hypertriglyceridämie, hohe Serumspiegel von LDL und Homocystein, niedrige HDL-Serumspiegel sowie Hyperurikämie, Bewegungsmangel und Stress.

Das gemeinsame Auftreten der Symptome Adipositas, arterielle Hypertonie, Insulinresistenz bei Diabetes Typ II, gestörter Kohlenhydratstoffwechsel und Hypertriglyceridämie wird als metabolisches Syndrom bezeichnet (sog. Tödliches Quartett), welches eine hohe Atherogenität bedingt.

Die in der Nahrung vorkommenden Polyphenole bieten vermutlich einen Schutz vor Gefäßkrankheiten. Die Polyphenole werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, zum einem in die Phenolkarbonsäuren (Kaffeensäureabkömmlinge) und zum anderen in die Flavonoide. Als Untergruppe der Flavonoide findet man die Flavan-3-ole in vielen Nahrungsmitteln. Beispiele hierfür sind Tee, Rotwein, Weintrauben und Kakaopro-

dukte. Für das Flavan-3-ol Epigallocatechin-3-gallat wurde beschrieben, dass es die Proliferation der Gefäßendothelien senkt und somit als Inhibitor in der Tumorangio-genese wirken könnte (NEUHAUS *et al.*, 2004).

BUIJSSE *et al.* (2006) untersuchten in der Zutphen Elderly Studie seit 1985 die Ess- und Trinkgewohnheiten der älteren Einwohner in der niederländischen Kleinstadt Zutphen und stellten dabei unter anderem fest, dass die Probanden, welche mehr Kakaoprodukte zu sich nahmen, im Durchschnitt einen niedrigeren Blutdruck hatten, als die übrigen, welche weniger Kakaoprodukte einnahmen.

In weiteren Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der gezielte Konsum flavanolreicher Schokolade und anderer Kakaoprodukte zu einer Verbesserung der Endothelfunktion über eine bessere Bioverfügbarkeit des NO führt, und somit die Morbidität und Mortalität senkt (HEISS *et al.*, 2003; FISHER *et al.*, 2003; ENGLER *et al.*, 2004; SIES *et al.*, 2005; SCHROETER *et al.*, 2006).

1.5 Kakao – nicht nur ein Genussmittel



Abb. 1.3 Theobroma cacao (www.meemelink.com)

Schon seit mehreren Jahrhunderten wird dem Kakao eine heilende Wirkung zugeschrieben. Mehr als 100 Indikationen für den medizinischen Einsatz des Kakaos sind überliefert (DILLINGER *et al.*, 2000). Diese gesundheitsfördernde Wirkung des Kakaos ist u.a. auf Inhaltsstoffe wie die Flavonoide zurückzuführen.

Der uns heute bekannte Kakao wird durch Röstung der Früchte der Pflanze *Theobroma cacao* gewonnen. Bereits mehr als Tausend Jahre v. Chr. war der Kakao- baum bei den Olmeken bekannt. Bei den Maya und Azteken war der Genuss des Kakaogetränks nur Mitgliedern des höheren Standes vorbehalten. Durch die Eroberung des Aztekenreiches durch die Spanier gelangte der Kakao im 16. Jahrhundert nach Europa. Dort wurde er mit Zucker vermischt schnell sehr beliebt. Jedoch diente der Kakao nicht nur als Genussmittel. Nicht nur die Maya und Azteken verwendeten den Kakao zu medizinischen Zwecken, sondern auch die Europäer fanden medizinische Indikationen zum Einsatz des Kakaos. Der Kakao wurde z.B. eingesetzt zur Gewichtszunahme, zur Stimulation des Nervensystems und zur Verbesserung der Nieren- und Blasenfunktion (DILLINGER *et al.*, 2000). Aus heutiger Sicht ist anzunehmen, dass flavonoidreicher Kakao vermutlich sogar die Mortalität senken kann (BUIJSSE *et al.*, 2006).

1.5.1 Flavonoide

Kakao ist bei Anwendung schonender Gewinnungsverfahren reich an Flavonoiden. Flavonoide gehören zu den in der Nahrung häufig vorkommenden Polyphenolen. Sie bestehen aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen und einem O-heterozyklischen Ring. Anhand struktureller Unterschiede am C-Ring können die Flavonoide in 6 Gruppen eingeteilt werden.

Tab. 1.2 Verbindungsklassen der Flavonoide (Ernährungs-Umschau 48, 2001)

Verbindungs-klasse	Vertreter	Vorkommen (Beispiel)
Flavonole	Quercetin Kämpferol	Zwiebeln Endivie
Flavanole	Catechin Epicatechin	Rotwein Dunkle Schokolade
Flavanone	Naringenin Hesperidin	Grapefruit Orange
Flavone	Apigenin Luteolin	Sellerie Paprika
Anthocyane	Malvidin Cyanidin	Blaue Trauben Kirschen
Isoflavonoide	Genistein Daidzein	Sojabohnen Sojabohnen

Mit Ausnahme der Flavanole liegen die meisten Flavonoide in der Natur nicht frei, sondern als Flavonoidglykoside vor. Der Flavonoidgehalt einer Pflanze hängt von der Sorte und dem Klima ab. Flavanole sind außer in Kakaoprodukten vor allem in grünem Tee, einigen Früchten und daraus hergestellten Getränken enthalten. Neben den monomeren Flavanolen sind auch oligomere Flavanole, die Procyanidine, in Äpfeln, Rotwein und dunkler Schokolade enthalten. Neuere Studien belegen, dass das Erkrankungsrisiko für KHK durch den regelmäßigen Genuss von flavonoidreichem Kakao gesenkt werden kann (LEE *et al.*, 2003). In anderen Studien konnte zusätzlich

gezeigt werden, dass Kakaoflavonoide möglicherweise auch vor dem diabetischen Katarakt (Osakabe *et al.*, 2004) schützen könnten. Weiterhin wurde *in vitro* nachgewiesen, dass Kakaoflavonoide die Oxidation des LDL hemmen (KRAEMER *et al.*, 2004) und vor Oxidations- und Nitrierungsreaktionen durch Peroxynitrit schützen (SCHROEDER *et al.*, 2001; ARTEEL und SIES, 1999; ARTEEL *et al.*, 2000). Nach dem Verzehr von Schokolade konnte ein Anstieg des Epicatechinspiegels im Plasma und damit eine Erhöhung der antioxidativen Komponenten des Plasmas nachgewiesen werden (REIN *et al.*, 2000b; WANG *et al.*, 2000; WAN *et al.*, 2001, ENGLER *et al.*, 2004; SCHROETER *et al.*, 2006).

Tab. 1.4 Gehalt an Flavanolen in ausgewählten Lebensmitteln in mg/kg Frischgewicht (ARTS *et al.*, 2000a und b)

Lebensmittel	Catechin	Epicatechin	Gesamtcatechine
Äpfel mit Schale	4,0-15,6	67,1-103,2	71,1-115,4
Äpfel ohne Schale	2,8-16,5	48,3-86,1	51,2-95,6
Aprikose	49,5	60,6	110,1
Süßkirsche	21,7	95,3	117,1
Schwarzer Tee	3,5-8,8	12,5-62,4	101,9-418,4
Rotwein	16,3-53,4	9,2-42,1	27,3-95,5
Dunkle Schokolade	132,4	327,4	459,8

Die Bioverfügbarkeit, die Resorption und der Stoffwechsel der Flavonoide *in vivo* ist noch Gegenstand intensiver Untersuchungen.

1.5.1.1 Metabolismus und Pharmakokinetik der Flavonoide

Die Resorption der Flavonoide beginnt bereits mit der oralen Aufnahme. Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechingallat (EGCG) zeigen bereits eine Resorp-

tion über die Mundschleimhaut. Des Weiteren wurde im Speichel eine Catechin-Esterase-Aktivität nachgewiesen, die EGCG zu EGC umwandelt (SPENCER, 2003).

Wie bereits erwähnt, liegen die Flavonoide in den Nahrungsmitteln überwiegend als Glykoside vor. Im Dünndarm werden diese Glykoside über einen spezifischen Transporter („Sodium-dependent glucose transporter 1“ (SGLT1)) aufgenommen (HOLLMAN *et al.*, 1995). Für Quercetin konnte gezeigt werden, dass die glykosidische Form besser aufgenommen wird als das Aglykon (HOLLMAN *et al.*, 1995). Im Dünndarm kommt es nach Aufnahme in den Mukosazellen zu einer Spaltung der glykosidischen Bindung durch die β -Glukosidase (DAY *et al.*, 1998). In den Epithelzellen der Dünndarmmukosa findet als weiterer Metabolisierungsschritt die Konjugation mit Glukuronsäure statt (DONOVAN *et al.*, 2001; GEE *et al.*, 2000). In weiteren Versuchen mit Hepatozyten konnte eine Aufnahme der Konjugate in die Zellen gezeigt werden. Hier scheint die bevorzugte Metabolisierung neben Glukuronidierung und Sulfatierung, die Methylierung durch die Catecholamin-O-Methyltransferase (COMT) zu sein (O'LEARY *et al.*, 2003, MANACH *et al.*, 2004). Durch Sezernierung in die Galle und Wiederaufnahme in das Kolon zirkulieren die entstandenen Konjugate innerhalb des enterohepatischen Kreislaufes. In Versuchen mit ^{14}C -markiertem Quercetin konnte nach oraler Aufnahme eine Resorption bis zu 53% nachgewiesen werden (WALLE *et al.*, 2001).

1.5.2 Epicatechin

Der Tab.1.4 ist zu entnehmen, dass dunkle Schokolade verglichen mit anderen Lebensmitteln, einen besonders hohen Gehalt an Epicatechin besitzt. Epicatechin zählt zur Gruppe der Flavanole und ist ein pflanzlicher Sekundärmetabolit. Es trägt in Position 3 des C-Rings eine Hydroxylgruppe und gehört somit zu den Flavan-3-olen. Diese kommen nicht ausschließlich als Monomere, sondern auch oxidativ oligomerisiert als Procyanidine vor.

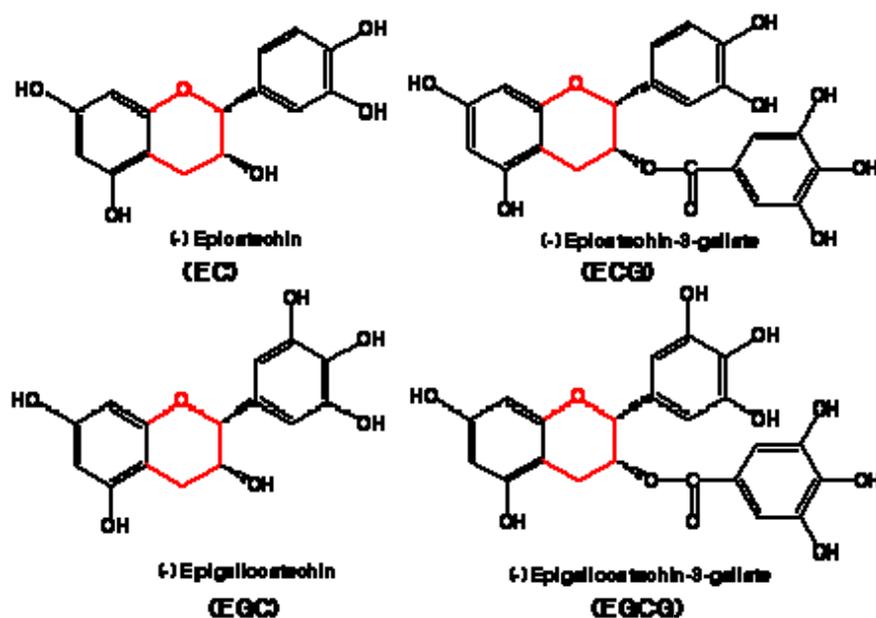


Abb. 1.4 Struktur der Flavonoide Epicatechin, Epicatechin-(3)-gallate, Epigallocatechin und Epigallocatechin-(3)-gallate

Kakaobohnen (Abb 1.3) enthalten hohe Konzentrationen an (-)-Epicatechin (Tab.1.4) und Procyanidinen (ADAMSON *et al.*, 1999; HAMMERSTONE *et al.*, 1999a und b; LAZARUS *et al.*, 1999; HAMMERSTONE *et al.*, 2000).

Die Eikosanoidsynthese wird dahingehend beeinflusst, dass es z. B. nach Aufnahme einer procyanidinreichen Schokolade, einerseits zu einem Anstieg des 6-keto-PGF_{1α} im Plasma kommt, und sich andererseits der Cysteinyl-Leukotrien/Prostazyklin-Quotient zu Gunsten des Prostazyklins verschiebt [siehe Abb. 1.5 (SCHRAMM *et al.*, 2001)].

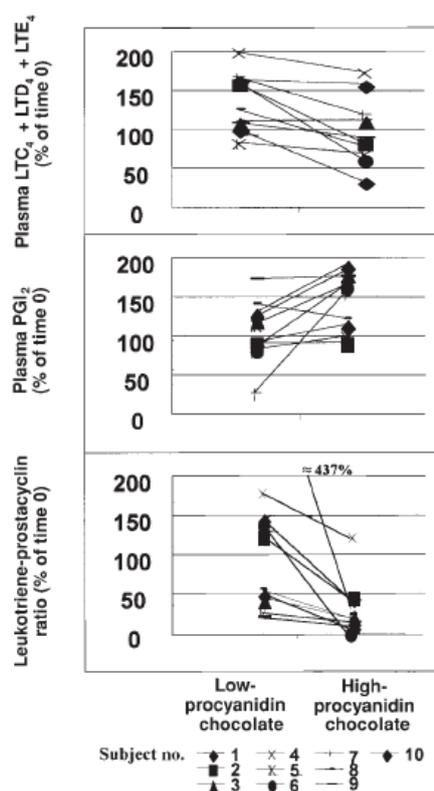


Abb. 1.5 Vergleich der PGI₂- und der Cysteinyl-Leukotrien-Konzentrationen im Plasma nach Aufnahme einer procyanidinreichen bzw. procyanidinarmen Schokolade (SCHRAMM *et al.*, 2001)

Ebenso konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass nach dem Genuss von epicatechinreicher Schokolade die Thrombozytenaktivierung unterdrückt wurde (REIN *et al.*, 2000a). Auch die Aufnahme von rotem Traubensaft, der ebenfalls einen hohen Gehalt an Epicatechin aufweist (ARTS *et al.*, 2000a und b), zeigte einen Anstieg des 6-keto-PGF_{1α} von 20% im Plasma (POLAGRUTO *et al.*, 2003). Auf glatte Muskelzellen der Arterienwand wirkt Epicatechin relaxierend und somit vasodilatierend (KENNY *et al.*, 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass Epicatechin und andere Flavanole die isolierten 5- und 15-Lipoxygenasen direkt auf Enzymebene hemmen. (SCHEWE *et al.*, 2001 und SCHEWE, 2002; SADIK *et al.*, 2003; SIES *et al.*, 2005). Dieser Befund könnte die von SCHRAMM *et al.*, (2001) in vivo beobachtete Senkung des Plas-

maspiegels an Cysteinyl-Leukotrienen plausibel erklären. Unabhängig davon zeigten WISWEDEL *et al.*, (2004), dass der Konsum eines flavonoidreichen Kakaotranks dem Anstieg des Plasmaspiegels an F₂-Isoprostanen beim postprandialen oxidativen Stress entgegenwirkt. Dieser Parameter ist ein Maß für die Lipidperoxidation *in vivo*. Zusammengenommen sprechen die Literaturdaten dafür, dass die vermutete gesundheitsfördernde Wirkung des Epicatechins und verwandter Verbindungen verschiedene Mechanismen in sich vereint.

1.6 Ziel der Arbeit

Wie bereits erwähnt, beschrieben SCHRAMM *et al.*, (2001) einen Anstieg des 6-keto-PGF_{1α} im Serum bei Probanden, denen zuvor procyanidinreiche Schokolade verabreicht wurde, im Vergleich zur Einnahme procyanidinarmer Schokolade als Kontrolle.

Ziel dieser Arbeit war es, *in vitro* zu prüfen, ob Epicatechin die zellulären Vorgänge dahingehend beeinflusst, dass es zu einem Anstieg der PGI₂-Freisetzung aus den Endothelzellen kommt.

1.6.1 Ausschluss einer Schädigung der Zellen durch Epicatechin

Durch den MTT-Test sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass die Substanz Epicatechin, in den anzuwendenden Konzentrationen, schädigend auf Endothelzellen wirkt. Zusätzlich wurde auch Quercetin getestet.

1.6.2 Beeinflussung der Expression der PGI₂-Synthase auf der Ebene der Transkription

Mittels der RT-PCR sollte geprüft werden, ob durch die Behandlung der Zellen mit Epicatechin oder Quercetin, die Transkriptionsebene der PGIS beeinflusst wird.

1.6.3 Modulation der Enzymaktivität der PGIS

Es sollte weiterhin geprüft werden, ob Epicatechin die Enzymaktivität der PGIS moduliert. Dies erfolgte nach verschiedenen Gesichtspunkten:

-
- 1.) Stimulierung der Zellen durch Bradykinin. Dadurch sollten Effekte auf der Ebene der Signaltransduktion miterfasst werden.
 - 2.) Zusatz von Arachidonsäure zu den Zellen. Auf diese Weise werden die meisten Schritte des Signaltransduktion, darunter die Freisetzung der AA aus den Phospholipiden, kurzgeschlossen. Die Reaktionsfolge von AA bis PGI₂ erfasst dann nur noch zwei Enzymschritte, die Zyklooxygenasen und die PGIS. Sofern die COX-Reaktion nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, würde diese Teststrategie auch eine Erhöhung der PGIS-Expression auf Translationsebene erfassen, da unter diesen Bedingungen die volle Enzymkapazität der PGIS ausgeschöpft wird.
 - 3.) Zeitabhängigkeit

In Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Prostazyklinbildung sollte geprüft werden, ob eine Erhöhung der Gesamtmenge an 6-keto-PGF_{1α} dadurch zustande kommt, dass Epicatechin die Selbstinaktivierung der PGIS durch ihre Reaktionsprodukte („Suizidreaktionen“) unterdrückt.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterialien und Chemikalien

2.1.1 Zelllinien

BAEC

Die Zellen wurden von European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) bezogen.

MAEC

Die primären murinen Aortaendothelzellen wurden von Herrn Dr. Christoph V. Suschek aus der immunologischen Arbeitsgruppe der Hautklinik im BMFZ Düsseldorf (Prof. Victoria Kolb-Bachhofen) zur Verfügung gestellt.

RAEC

Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau A. Borchardt (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, HH-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt

EA.hy926-Zellen

Die Endothelzelllinie EA.hy926 stammt von Dr. C. J.-S. EDGELL. (University of North Carolina, Chapel Hill, NC). Diese Zelllinie wurde ursprünglich hergestellt durch Verschmelzung von venösen Nabelschnurendothelzellen des Menschen mit Lungen-Adenocarcinom-A549-Zellen (EDGELL *et al.*, 1983).

2.1.2 Nährmedien und Puffer

Die in der Zellkultur verwendeten Lösungen wurden durch Sterilfiltration (Satoriusfilter, 0,2 µm, Greiner bio-one) oder durch Autoklavieren mit Wasserdampf (2 bar /121°C/15 min) in einem Autoklaven (Webeco, Lüdenscheid) sterilisiert.

Folgende Nährmedien wurden eingesetzt:

Vollmedium für EA.hy926-Zellen:und BAEC

Dulbecco`s Modified Essential Medium (DMEM) mit Phenolrot:

500 ml Dulbecco`s Modified Essential Medium (DMEM; SIGMA–ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

fötales Kälberserum (FCS) 10% (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

5 ml 200 mM L-Glutamat-Fertiglösung (Glutamax; Gibco)

5 ml Penicillin/Streptomycinfertiglösung (50.000 E. Penicillin/ml und 50 µg/ml Streptomycin; PAA Laboratories)

Vollmedium für MAEC und RAEC:

RPMI-Medium mit Phenolrot:

500 ml RPMI (SIGMA–ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

FCS (fötales Kälberserum) 10% (Greiner bio-one)

5 ml 200 mM L-Glutamat-Fertiglösung (Gibco)

5 ml Penicillin /Streptomycinfertiglösung (PAA Laboratories)

Versuchsmedien:

500 ml serumfreies DMEM Vollmedium ohne Phenolrot (SIGMA–ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

500 ml serumfreies RPMI Vollmedium ohne Phenolrot (SIGMA–ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

Einfriermedium (Kryomedium) für Zellen

DMEM-Vollmedium mit 10% DMSO

RPMI-Vollmedium mit 10% DMSO

Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung (PBS)

KCl	2,68 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,1 mM pH 7.4

(Tris-Acetat-EDTA Puffer) TAE-Puffer:

50xTAE-Puffer g/L für TAE-Puffer (50-fach konzentriert):

Tris-Base	2,0 M
Eisessig	1,0 M
EDTA	0,1 M

pH 8.3

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch im Volumenverhältnis 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt.

Puffer zum Beladen von Agarosegelen, 10fach konzentriert:

Glycerol	50%
Bromphenolblau	0,0125%
10 x TAE-Puffer	500 µl
H ₂ O ad 10 ml	

Trypsin/ EDTA –Lösung:

Trypsin	0,05 g
EDTA	0,2 g
PBS ad 100 ml	

2.2 Reagenzien

MTT-Stammlösung:

5 mg/ml MTT (SIGMA–ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in PBS sterilfiltriert und dunkel bei -20°C gelagert

Arachidonsäurestammlösung:

Arachidonsäure (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA)

1 mM Arachidonsäure wurde, nach Empfehlung des Herstellers, in Ethanol gelöst und dunkel bei -20°C aufbewahrt

Kaliumarachidonat aus Arachidonsäure:

Um eine 33 µM Kaliumarachidonatlösung zu erhalten, wurden 100 µl einer 32,8 mM KOH-Lösung mit 10 µl einer 328 mM Arachidonsäurelösung vermischt und auf 10 ml Zellmedium aufgefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Arachidonsäure langsam unter Schütteln zur KOH dazugegeben wurde. Die Lösung blieb unter diesen Bedingungen ca. 4-5 Stunden klar und wurde stets frisch angesetzt.

Bradykinin-Stammlösung

Bradykinin-Triacetat-Salz (SIGMA–ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

Für eine 10 mM Stammlösung wurden 5 mg Bradykinin-Triacetat gemäß Angabe des Herstellers in 471 µl Aqua bidest gelöst.

RT-PCR-Reagenziensatz (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAGEN „OneStep“ RT-PCR Enzym Mix (enthält Omniskript™ Reverse Transcriptase, Sensiscript™ Reverse Transcriptase und HotStar Taq™ Polymerase)

QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer (enthält 12,5 mM MgCl₂) 5x

Q-Solution, 5x

dNTP-Mix, jeweils 10 mM pro dNTP

Enzymimmunoassay 6-keto Prostaglandin F_{1α}-EIA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA)

Der Reagenziensatz enthielt folgende Einzel-Reagenzien:

6-keto-Prostaglandin_{1α}-Monoklonaler Antikörper

6-keto-Prostaglandin_{1α}-EIA-AchE-Tracer

6-keto-Prostaglandin_{1α}-EIA-Standard

EIA-Puffer-Konzentrat

Wasch-Puffer-Konzentrat

Tween 20

Anti-Maus-IgG beschichtete Platte

Ellmans-Reagenz

EIA-Tracer

EIA-Antiserum

DNA-Längenstandards

Zur Abschätzung der Fragmentlänge der cDNA wurde ein 100 bp-Marker verwendet.

Lösungsmittel für (-)-Epicatechin:

2-Methoxyethanol (Methylglykol) (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

2.3 Zellbiologische und molekularbiologische Methoden

2.3.1 Zellzucht und Kultivierung

Die im Folgenden beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (Heracus, Hanau) durchgeführt. Zur Kontrolle und Beobachtung der Zellkulturen wurde ein Inversmikroskop (Zeiss, Jena) mit 32- und 200-facher Vergrößerung eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C in einem Inkubator der Firma Heracus, Hanau bei 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in dem entsprechenden Medium kultiviert und wuchsen in 175 cm² Zellkulturflaschen aus Polystyrol, sowie in Polystyrol-Gefäßen mit 3 cm Durchmesser, bzw. in 6- oder 24-Lochplatten der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland). Die Einwegkulturflaschen und -pipetten wurden von Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) bezogen.

2.3.1.1 Kultivieren der MAEC und RAEC

MAEC und RAEC wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS in 175 cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5% CO₂ enthielt, kultiviert. Das Zellmedium wurde jeden zweiten bis dritten Tag erneuert. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen mit PBS gespült. Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zu den Zellen gegeben. Die Einwirkzeit betrug maximal 10 min. Eine längere Einwirkzeit hätte eine Zellschädigung zur Folge haben können. Der Ablösevorgang wurde zusätzlich mikroskopisch kontrolliert. Nach Ablösen der Zellen aus dem Kulturbehältnis wurden diese in 15 ml RPMI-Medium aufgenommen und bei 700 Upm pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen in RPMI-Medium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt. Hierbei wurden für eine 175 cm²-Kulturflasche 25-30 ml Medium verwendet.

2.3.1.2 Kultivieren der EA.hy926 und BAEC

EA.hy926 und BAEC wurden in der selben Weise und unter den gleichen Bedingungen wie MAEC und RAEC kultiviert (siehe 2.3.1.1). Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet. Da sich mit steigender Passagenzahl die Gefahr von Mutationen und Selektionen erhöht, wurde in der Regel keine Zelllinie über die 13. Passage hinaus verwendet. Die Ausnahme bildeten MAEC, hier wurde bis zur 18 Passage gearbeitet.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mittels 5 ml Trypsin abgelöst und anschließend 5 min bei 700 Upm zentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets in Einfriermedium (siehe 2.1.2) aufgenommen und in 1 ml-Aliquots auf Einfrier-Röhrchen aufgeteilt. Zur Konservierung wurden die Zellen bei -80°C gelagert. Um die Zelllinien zu rekultivieren, wurden die tiefgefrorenen Zellen zunächst in einem auf 37°C angewärmtem Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 9 ml Vollmedium aufgenommen und 5 min bei 700 Upm abzentrifugiert. Dann wurden sie in 10 ml Vollmedium resuspendiert und danach in eine 75 cm^2 -Kulturflasche überführt.

2.4 MTT-Test

2.4.1 Prinzip

Mittels des MTT-Testes kann die Vitalität bzw. die Proliferationsfähigkeit von Zellen bestimmt werden. Über Rückwärtsreaktionen des mitochondrialen Elektronentransfersystems der Atmungskette wird MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu Formazan reduziert. Diese Fähigkeit („reducing power“) setzt die Funktionstüchtigkeit der mitochondrialen Energiekonservierung voraus. Formazan fällt als schwerlöslicher blauer Farbstoff aus und kann nach Aufnahme in einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. DMSO) photometrisch quantifiziert werden. Seine Menge ist ein Maß für die Anzahl funktionstüchtiger Mitochondrien. Kommt es zu einer Schädigung der Mitochondrien, bleibt die Formazanbildung aus (MOSMANN *et al.*, 1983). Neuere Untersuchungen auf diesem Gebiet haben jedoch ergeben, dass an der Reduktion des MTT nicht nur mitochondriale, sondern auch zytosolische und mikrosomale Enzyme beteiligt sein könnten. Somit könnte ein Vitalitätsverlust nicht allein auf die Schädigung der mitochondrialen Energiekonservierung zurückgeführt werden (GONZALEZ *et al.*, 2001).

2.4.2 Durchführung

Die Zellen wurden auf 24-Lochplatten bis zu ca. 80-90 %iger Konfluenz gezüchtet. Im Anschluss daran wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und dann 500 µl der entsprechenden Verdünnungsansätze zu den Zellen gegeben. Die Verdünnung erfolgte in serumfreiem Medium (RPMI 1640). Nach 24-stündiger Inkubation in o.g. Atmosphäre, wurde der Überstand verworfen und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Aus einer 5 mg/ml MTT-Stammlösung wurde eine Lösung der Konzentration 1 mg/ml hergestellt. Die Zellen wurden dann mit 200 µl dieser MTT-Lösung für 4 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von zunächst jeweils 500 µl DMSO pro Zellkulturschale, wurde die Suspension in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Um noch ungelöste Formazanreste aufzunehmen, wurden weitere 500 µl DMSO zu den Zellkulturschalen gegeben und anschließend in die Eppendorfgefäße gegeben. Nach sorgfältiger Durchmischung und kurzem Zentrifugieren wurde die Lösung bei 570 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Der Nullabgleich wurde gegen Luft

durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil vitaler Zellen bezogen auf den Kontrollansatz, ausgewertet.

2.5 RT-PCR

2.5.1 RNA-Isolierung

Die Mengenangaben beziehen sich auf 3 cm-Zellkulturgefäße. Nach Entfernen des Mediumüberstandes wurden die Proben zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 500 µl Trizol auf die Zellen gegeben und mit Hilfe eines Spatels suspendiert, und die Lösung wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 150 µl Chloroform zugegeben. Pro 100 µl Trizol wurden hier 30 µl Chloroform eingesetzt. Nach Durchmischung (mittels Vortex) erfolgte 20 min Zentrifugieren bei 15°C und 14000 Upm. Von dem nun entstandenen Zweiphasengemisch wurde die wässrige Phase vorsichtig mit einer Eppendorfpipette abgenommen und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und jeweils 700 µl Propan-2-ol (Isopropanol) dazugegeben, um die RNA auszufällen. Nach 60 min Zentrifugieren bei 4°C und 14000 Upm wurde der wässrige Überstand verworfen und mit 70%-igem Ethanol gewaschen, indem 500 µl Ethanol zu jedem Ansatz gegeben und nochmals bei 14000 Upm 5 min zentrifugiert wurde. Wiesen die Proben dann noch Phenolgeruch auf, wurde der Waschvorgang abermals wiederholt. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Um einer Hydrolyse der RNA durch RNAsen entgegenzuwirken, wurde das getrocknete Pellet danach mit 50 µl 0,1%iges DEPC in Wasser (Diethylpyrocarbonat, freundlicherweise von Dr. Ira Melchheier zur Verfügung gestellt) aufgenommen und bei 65 °C und 400 Upm geschüttelt und im Anschluss sofort auf Eis gestellt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Da die isolierte Gesamt-RNA-Menge abhängig von Zellzahl in der Probe variierte, musste für jede Probe der RNA-Gehalt bestimmt werden, um identische RNA-Mengen einsetzen zu können. Da eine RNA-Lösung mit einer optischen Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm eine Konzentration von 40 µg/ml besitzt, kann RNA bei 260 nm photometrisch quantifiziert werden. Hierzu wurden Quarzküvetten von 1,0 mm Schichtdicke verwendet. Mit DEPC-Lösung wurde das Photometer auf den Null-Wert eingestellt. Für die PCR wurden 100 ng/µl RNA eingesetzt.

Der RNA-Gehalt der Probe errechnete sich wie folgt:

OD-Wert bei 260 nm – OD bei 280 nm x Verdünnungsfaktor x 40 µg/ml

2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die RT-PCR wurde der Reagenziensatz von Qiagen für OneStep RT-PCR[®] verwendet.

Um einen Mastermix herzustellen, wurden nachstehende Reagenzien verwendet, dabei wurde der Enzym-Mix zuletzt dazu gegeben.

Die Primersequenzen wurden freundlicherweise von Dr. Steinbrenner (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Universität Düsseldorf) mit einer Software zum Erstellen von Primersequenzen ermittelt und von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland bezogen.

Pro Probe: 5,0 µl 5*Qiagen OneStep RT-PCR Buffer
 0,5 µl dNTP Mix
 0,5 µl Primer (100 µM)
 1,0 µl Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix
 17,5 µl H₂O
 1,0 µl Probe

Primersequence für die Prostacyclinsynthase der Maus:

F 5' to 3': TTC TGG CTC CTT CTT TTC CTC CTC

R 5' to 3': CTT CAG CCG TTT CCC ATC TTT GTA

Länge des Produktes: 408 bp

Primersequence für Housekeeping-Gen HPRT:

F 5' to 3': GCA GTC CCA GCG TCG TGA T

R 5' to 3': CTT AGG CTT TGT ATT TGG CTT TTC

Länge des Produktes: 648 bp

Die PCR wurde für 33 Zyklen durchgeführt, wobei die „Annealing-Temperatur“ 70°C betrug.

2.5.4 Agargelelektrophorese

Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Um die durch die PCR hergestellten Produkte als fluoreszierende Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden sie mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Dabei wurden zur Herstellung eines 1%-igen Gels 0,5 g Agarosepulver in 50 ml TAE-Puffer zum Kochen gebracht, um die Agarose vollständig zu lösen. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurden 2 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben und das Gel in eine Gelkammer gegossen. Jeweils 5 µl der DNA wurden mit 3 µl Probenpuffer (siehe 2.1.2) in den Gelschlitz gegeben und einer Spannung von 85 V für 40-90 min ausgesetzt. Um die Größe der PCR-Produkte bestimmen zu können, wurden 2,5 µl einer 100-bp-Leiter für den Bereich von 100-1500 bp als Marker aufgetragen. Die Gele wurden anschließend mit einer Kamera (Raytest) unter UV-Licht abfotografiert.

2.6 Enzymimmunoassay 6-keto Prostaglandin F_{1α} EIA

Da es aufgrund der kurzen Halbwertszeit des PGI₂ von $t_{1/2} = 2$ min nur schwer möglich ist das PGI₂ direkt zu erfassen, wurde auf den stabilen Metaboliten 6-keto-PGF_{1α} zurückgegriffen.

Das Prinzip dieses Testes beruht auf der Konkurrenz zwischen 6-keto-PGF_{1α} und eines 6-keto-PGF_{1α}-Acetylcholinesterase-Komplexes (AChE) um die Bindung an einen spezifischen Antikörper. 6-keto-PGF_{1α}-AChE wurde in diesem Testverfahren als Indikator verwendet. Die entstandene Verbindung, aus entweder freiem 6-keto-PGF_{1α} oder AChE-gebundenem 6-keto-PGF_{1α}, reagiert mit dem monoklonalem Antikörper in den beschichteten Platten (Abb. 2.1). Nach Auswaschen der nicht gebundenen Bestandteile wurde Ellman's Reagenz dazugegeben.

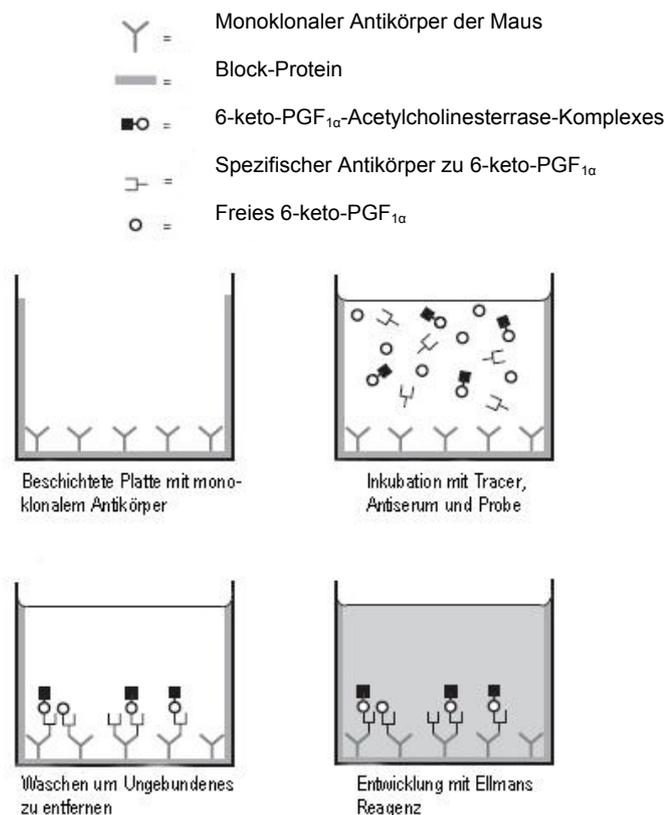


Abb.2.1 Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips des EIA (Cayman[®], modifiziert)

Durch Disulfidtausch (siehe Abb. 2.2) zwischen dem Acetylthiocholin und dem Ellman's Reagenz entsteht bei genügend hohem pH-Wert das gelbe p-Nitrothiophenolat-Anion. Je mehr freies 6-keto-PGF_{1α} in der Probe vorhanden ist, desto schwächer ist die Ausbildung des gelben Farbstoffes.

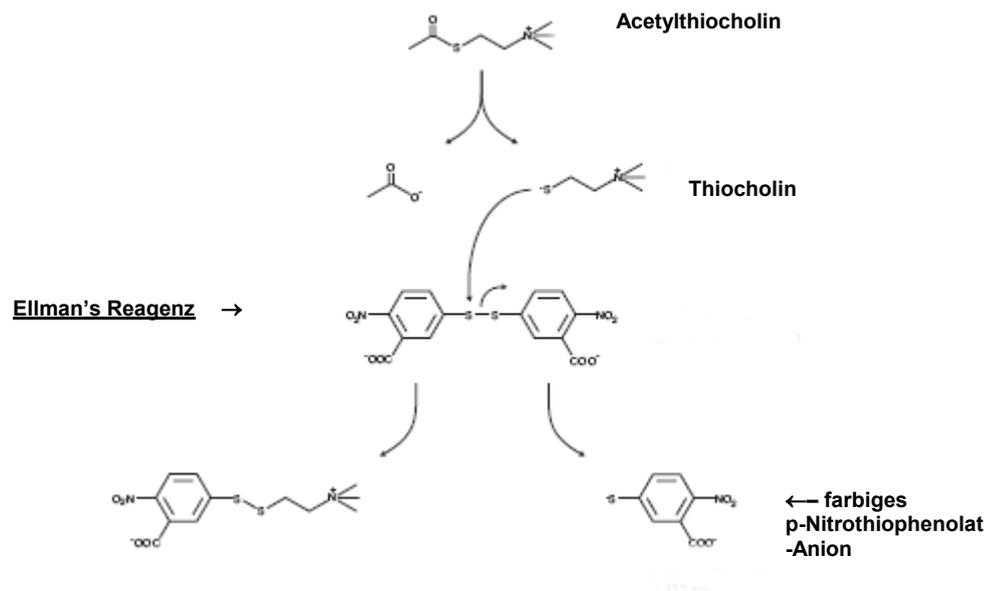


Abb 2.2 Reaktionsschema des Ellman's Reagenz (Cayman[®], modifiziert)

Zur Durchführung des EIA wurden MAEC, RAEC, BAEC oder EA.hy926-Zellen unter den in 2.3 genannten Bedingungen in 6-Lochplatten bis zur Konfluenz gezüchtet. Um die Effekte auf die Signaltransduktion zu erfassen, wurden die Zellen mit Bradykinin stimuliert (YAMASAKI *et al.*, 2000). In weiteren Versuchen wurden durch Zugabe von Arachidonsäure (AA) die vorgelagerten Schritte der Signaltransduktion kurzgeschlossen, so dass nur noch die Reaktionsschritte zwischen AA und PGI₂ erfasst wurden. Da unveresterte AA schlecht wasserlöslich ist, wurde Kaliumarachidonat verwendet.

Nach Entfernen des Mediumüberstandes wurden die Zellen dreimal mit serum- und phenolrotfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die entsprechenden Verdünnungsansätze zu den Zellen gegeben. Zur Verdünnung der Bradykinin- und Epicatechin-Stammlösungen wurde serum- und phenolrotfreies Medium verwendet. Das Gesamtkubationsvolumen betrug 2 ml. Anschließend wurden die Zellen in unterschiedlich langen Zeiträumen mit unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen

Reagenzien inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mediumüberstände vorsichtig mittels einer Eppendorf-Pipette abgenommen, in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und danach zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der EIA nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden auf beschichteten Platten die Reagenzien wie Tab.2.1 zu entnehmen pipettiert.

Tab. 2.1 Pipettierschema zur Durchführung des 6-keto-PGF_{1α} EIA

Probenfeld	EIA Puffer	Probe bzw. Standard	6-keto-PGF_{1α}-AChE-Tracer	Antikörper
Blindprobe	--	--	--	--
Stärkste Aktivität	--	--	5 µl nach Entwicklung	--
Nicht spezifisch Gebundenes	100 µl	--	50 µl	--
B₀ (max Gebundenes)	50 µl	--	50 µl	50 µl
Probe bzw. Standard	--	50 µl	50 µl	50 µl

Die Platte wurde anschließend mit einer Plastikfolie abgedeckt und zur Entwicklung 18 h bei 4°C aufbewahrt. Nach dem Vorgang der Entwicklung wurden die Probenfelder fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Hierbei wurde mit einer Eppendorf-Mehrkanalpipette jeweils 200 µl Waschpuffer auf die Felder pipettiert und danach wieder abgegossen. Im Anschluss wurde zu jedem Feld 200 µl Ellmans Reagenz gegeben. Zu dem Feld der stärksten Aktivität wurden zusätzlich noch 5 µl 6-keto-PGF_{1α}-AChE-Tracer hinzugefügt. Die Platte wurde abermals mit einer Plastikfolie verschlossen und zusätzlich in Aluminiumfolie eingewickelt, um Lichteinflüsse möglichst gering zu halten. Nach 90-120 min Entwicklung auf einem Schüttler wurde die

Absorption der Proben bei 420 nm gemessen und in einer Excel-Tabelle ausgewertet. Anhand der Eichkurve (Abb.2.2) wurden die Werte ermittelt.

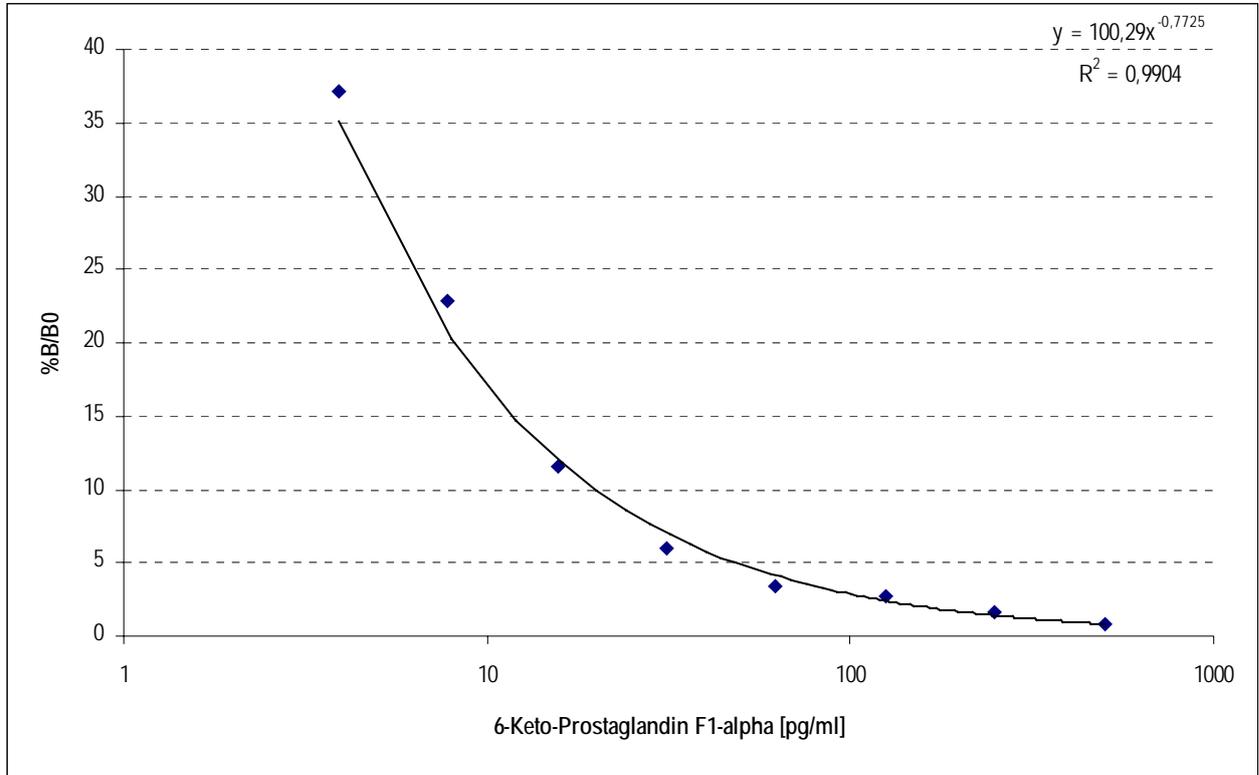


Abb. 2.2 Eichkurve zur Bestimmung des 6-keto-PGF_{1α}

3. Ergebnisse

3.1 Zytotoxizität von Epicatechin und Quercetin

Um die Wirkung von Flavonoiden auf die Prostaglandinsynthese in Endothelzellen prüfen zu können, war es zunächst erforderlich, eine etwaige allgemeine Zytotoxizität der Verbindungen in den anzuwendenden Konzentrationsbereichen auszuschließen. Dafür wurde der MTT-Test eingesetzt. Die Zellen wurden jeweils mit steigenden Konzentrationen (3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM und 300 μM) an Epicatechin und Quercetin über 24 Stunden inkubiert.

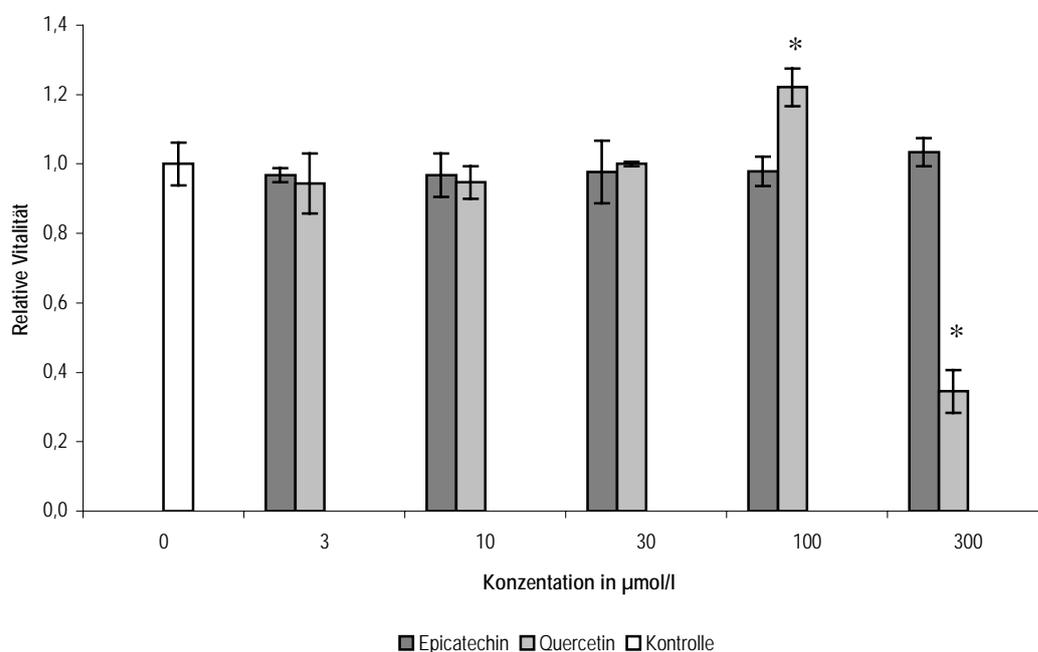


Abb. 3.1 Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung der Flavonoide Epicatechin und Quercetin auf MAEC's.

Die Zellen wurden für 24 h im Medium in Gegenwart der angegebenen Konzentrationen an Flavonoiden ($n = 4$) inkubiert. Die Lösungsmittelkonzentration (2-Methoxyethanol) wurde konstant bei 1 Vol% gehalten. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, deren Vitalität gleich 1 gesetzt wurde. Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt wie unter 2.4.2 beschrieben. (Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels t -Test nach Student)

Die Grafik zeigt, dass Epicatechin auch noch bei einer Konzentration von 300 μM die Zellen nicht schädigte. Quercetin hingegen übte bei 100 μM einen schützenden ($p < 0,05$) und bei 300 μM verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,05$) eine signifikante

Zellschädigung aus. In den weiteren Experimenten wurde daher mit Konzentrationen unterhalb von 100 μM gearbeitet.

3.2 RT-PCR

Um zu prüfen, ob Epicatechin und Quercetin die Expression der Prostazyklinsynthese (PGIS) auf der Ebene der Transkription beeinflusst, wurde eine „OneStep“-RT-PCR in MAEC durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen jeweils 2, 4, 8 und 16 Stunden mit einer 10 µM Epicatechinlösung inkubiert. Die Amplikongröße der PGIS betrug 408 bp (untere Bande), die von HPRT 648 bp (obere Bande).

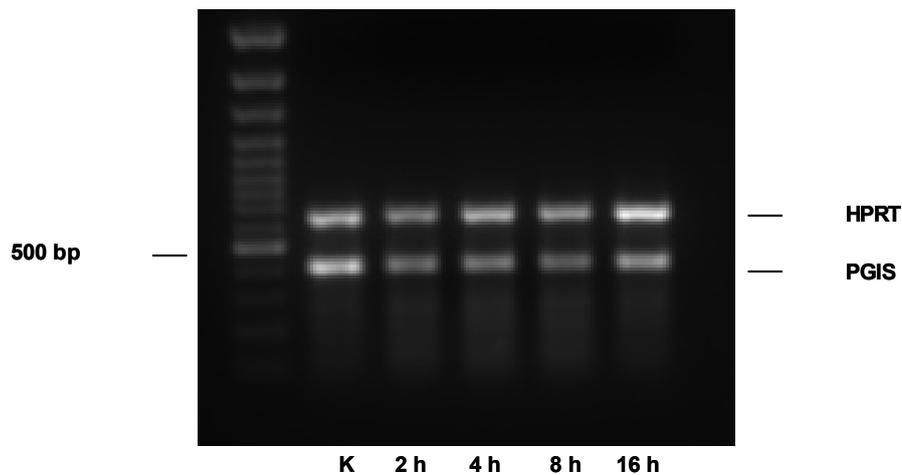


Abb. 3.2 Einfluss von Epicatechin auf die Expression der PGIS in MAEC
MAEC wurden mit 10 µM Epicatechin für die jeweils angegebene Zeit inkubiert. Danach wurde RNA isoliert (siehe 2.5.1) und im Anschluss die RT-PCR durchgeführt (siehe 2.5.3). Die Lösungsmittelkonzentration betrug konstant 1 Vol%. Zur Darstellung der Genprodukte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Als Kontrolle (K) wurden unbehandelte Zellen verwendet. Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) diente als Referenzgen.

Verglichen mit den unbehandelten Zellen war hier tendenziell eher eine Abnahme der Expression der PGIS-mRNA in den MAEC zu beobachten (Abb. 3.2). Dieser Effekt konnte jedoch nicht bei Versuchen dieser Art festgestellt werden. Niemals trat jedoch eine Zunahme der PGIS-mRNA auf. Diese Beobachtung spricht gegen die Annahme, dass die von SCHRAMM *et al.* (2001) beschriebene Erhöhung des Plasmaspiegels an 6-keto-PGF_{1α}, nach Verabreichung procyanidinreicher Schokolade auf eine erhöhte Expression der PGIS in den Endothelien zurückgeführt werden könnte.

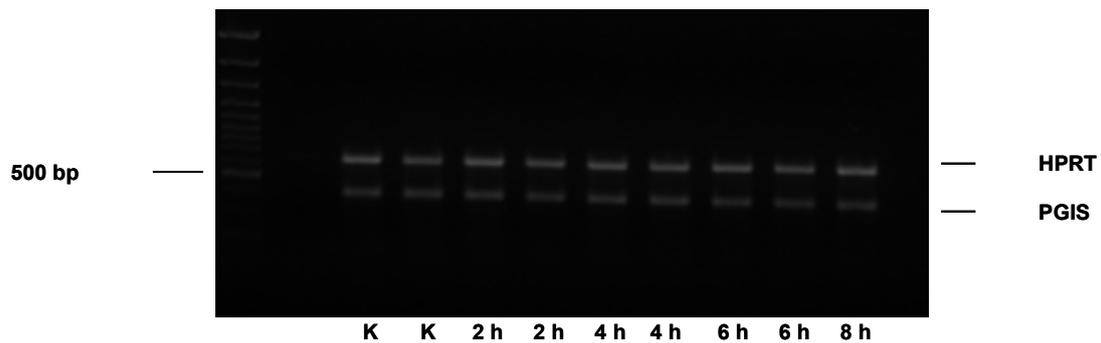


Abb. 3.3 Einfluss von Quercetin auf die Expression der PGIS in MAEC
MAEC wurden mit 10 μ M Quercetinlösung für die jeweils angegebene Zeit inkubiert. Danach wurde RNA isoliert und im Anschluss die PCR durchgeführt wie in Abb. 3.2 angegeben.

Auch die Behandlung der Zellen mit Quercetin zeigte keinen nennenswerten Anstieg der Expression der PGIS in MAEC im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb 3.3).

Da nicht auszuschließen war, dass das Epicatechin während der langen Inkubationszeiten in den Endothelien abgebaut wird, wurde in weiteren Versuchen das Epicatechin alle 2 Stunden erneut zugesetzt.

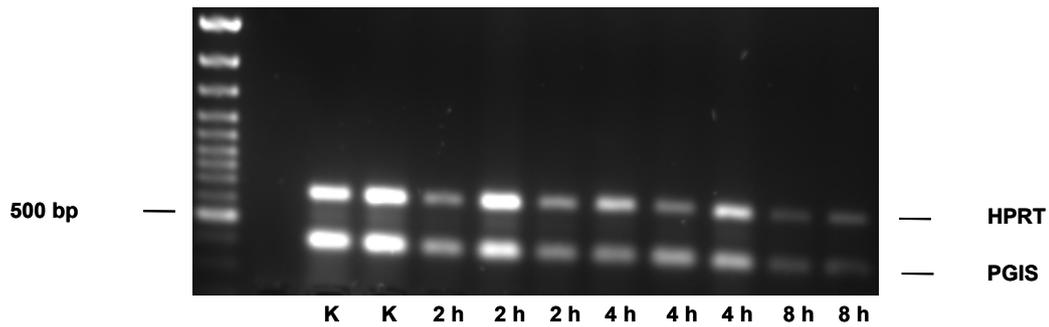


Abb. 3.4 Kumulativer Effekt von Epicatechin auf die Expression der PGIS
MAEC wurden mit 10 µM Epicatechin jeweils 2, 4, und 8 Stunden inkubiert. Dabei wurde jeweils nach 2 Stunden die Epicatechinlösung erneut zugesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Übrige Bedingungen wie in Abb. 3.2 angegeben

Weder die Inkubation mit Epicatechin noch mit Quercetin innerhalb der verschiedenen Zeiträume, zeigten eine nachweisbare Erhöhung der Expression der Prosta-zyklinsynthase in den MAEC. Auch konnte durch ständige Erneuerung des Epicatechinzusatzes keine verstärkte Expression im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden.

3.3 6-keto Prostaglandin F_{1α} EIA

Zunächst wurde der in Nabelschnurzellen beschriebene Bradykinineffekt auf die PGI₂-Bildung (u.a. von YAMASAKI *et al.*, 2000) untersucht. Durch die Stimulierung der Zellen durch Bradykinin sollten Effekte auf die Signaltransduktion miterfasst werden. Einerseits kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺, andererseits hat die Stimulation mit Bradykinin sowohl eine verstärkte Aktivität als auch eine erhöhte Expression der cPLA₂ zur Folge, die wiederum eine Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels zur Folge haben.

Hierzu wurden MAEC's oder EA.hy926-Zellen mit 10⁻⁵ M und 10⁻⁷ M Bradykinin sowie jeweils mit 4 µM und 40 µM Epicatechin für 30 min inkubiert. Für die Verdünnungen wurde serum- und phenolrotfreies DMEM, für den Enzymimmunoassay (EIA) wurde der Medienüberstand verwendet.

Tab. 3.1 6-keto-PGF_{1α}-Bildung in mit Bradykinin oder Epicatechin behandelten MAEC. MAEC wurden jeweils 30 min mit 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M Bradykinin und 40 μM und 4 μM Epicatechin inkubiert. Mit dem Mediumüberstand wurde dann der EIA zur Bestimmung der 6-keto-PGF_{1α} durchgeführt. Anschließend wurde bei 412 nm (PowerWave X, Bio-Tek Instruments Inc.) die Absorption gemessen. Für die Verdünnungsansätze wurde serum- und phenolrotfreies RPMI 1640 verwendet.

Behandlung der MAEC	6-keto-PGF _{1α} [pg/ml]
unbehandelt	1,61
10 ⁻⁵ M Bradykinin	1,61
10 ⁻⁷ M Bradykinin	1,40
40 μM Epicatechin	1,61
4 μM Epicatechin	1,69

Tab. 3.2 6-keto-PGF_{1α}-Bildung in mit Bradykinin oder Epicatechin behandelten EA.hy926-Zellen. EA.hy926-Zellen wurden jeweils 30 min mit 10⁻⁵ M, 10⁻⁷ M Bradykinin und 40 μM und 4 μM Epicatechin inkubiert. Die Messung erfolgte wie in Tab. 3.1 beschrieben. Für die Verdünnungsansätze wurde serum- und phenolrotfreies DMEM verwendet.

Behandlung der EA.hy926	6-keto-PGF _{1α} [pg/ml]
unbehandelt	1,42
10 ⁻⁵ M Bradykinin	1,43
10 ⁻⁷ M Bradykinin	1,40
40 μM Epicatechin	1,43
4 μM Epicatechin	1,37

Den Tabellen ist zu entnehmen, dass in den vorliegenden Untersuchungen weder Bradykinin noch Epicatechin zu einem Anstieg der geringen basalen Bildung von 6-keto-PGF_{1α} geführt hatten. Im Einklang mit diesem Befund steht die Beobachtung, dass die verwendeten MAEC entgegen der Erwartung außerdem keine eNOS-

Expression zeigten (Rahul Date, persönliche Mitteilung); demnach ist zu vermuten, dass die Zellen durch zu häufige Passagierung Gene verloren haben könnten. Dies könnte auch zur Eliminierung von Komponenten des Signalübertragungssystems geführt haben (z.B. durch Verlust der Bradykinin-Rezeptoren), wodurch der fehlende Bradykinineffekt bedingt sein könnte.

In den in Tab. 3.1 und Tab. 3.2 beschriebenen Experimenten ließ sich keine Stimulierung des Arachidonsäurestoffwechsels durch Bradykinin erzielen. Dies steht im Gegensatz zu Literaturangaben (YAMASAKI *et al.*, 2000). Die Bradykinin-vermittelte PGI₂-Bildung in den Zellen erfolgt in drei Schritten.

1. Bradykinin-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure durch Aktivierung der cPLA₂
2. Aktivierung der COX I und/oder COX II und Bildung von PGH₂ durch die PGH-Synthase
3. PGI₂-Bildung aus PGH₂ durch die PGIS

Wenn es bereits zum Ausfall des ersten Schrittes kommt, kann dies durch exogenen Zusatz von Arachidonsäure kompensiert werden. Gelingt dies, ist damit der Ausfall des ersten Schrittes dieser Signalkaskade als Ursache für die ausbleibende Bradykininwirkung nachgewiesen.

Da Arachidonsäure Substrat für die COX I und COX II und folglich auch Vorstufe für die Synthese von PGI₂ ist, wurden verschiedene Endothelzellen in den folgenden Versuchen mit Arachidonsäure, in Form des besser wasserlöslichen Kaliumarachidonats, stimuliert. Somit konnte festgestellt werden, ob die Zellen über eine aktive Prostazyklin-Synthase verfügen.

Hierzu wurden EA.hy926-Zellen, MAEC und BAEC mit 10 µM Kaliumarachidonat und RAEC zusätzlich noch mit 10 µM Bradykinin stimuliert und anschließend für 15 min inkubiert.

Tab. 3.3 Vergleich der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung in unbehandelten und mit Kaliumarachidonat behandelten MAEC, RAEC und BAEC.

Die Zellen wurden 15 min mit jeweils 10 μM Kaliumarachidonat inkubiert und aus dem Mediumüberstand, mittels EIA, 6-keto-PGF_{1α} bestimmt. Als Inkubationsmedium diente PBS.

	6-keto-PGF _{1α} [pg/ml] Un- behandelte Zellen	6-keto-PGF _{1α} [pg/ml] mit 10 μM Kaliumarachidonat
MAEC	53	7526
RAEC	16	373
BAEC	3	29
EA.hy926	1,61	1,80

Die Inkubation der MAEC, RAEC und BAEC mit Kaliumarachidonat führten zu einer deutlich stärkeren Bildung des 6-keto-PGF_{1α}, wobei die höchsten Werte bei MAEC beobachtet wurden (Tab. 3.3). Bei EA.hy926-Zellen hingegen konnte trotz Zugabe von Kaliumarachidonat keine nennenswerte Erhöhung der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung festgestellt werden. Die Behandlung der RAEC mit Bradykinin zeigte auch hier, wie bei den anderen Zelllinien keinen Effekt auf die Bildung von 6-keto-PGF_{1α} (Daten nicht gezeigt). Wie aus Tab. 3.3 ersichtlich ist, wurde bei BAEC ein ca. 10-facher, bei RAEC ein ca. 23-facher und MAEC ein ca. 142-facher Anstieg des 6-keto-PGF_{1α}, gegenüber dem Basalwert der unbehandelten Zellen ermittelt. Diese Unterschiede könnten teilweise durch unterschiedliche Mengen an Zellprotein in den konfluenten Zellkulturen bedingt sein, die in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmt wurden.

In anschließenden Experimenten wurden MAEC und RAEC außer mit 10 μM Kaliumarachidonat zusätzlich mit 5 μM bzw. 1 μM Epicatechinlösung behandelt. Die letztere Konzentration wurde gewählt, weil ein solcher Plasmaspiegel beim Menschen nach oraler Aufnahme epicatechinreicher Nahrungsquellen erzielt werden kann.

Um die Zeitabhängigkeit der 6-keto-PGF_{1α}-Produktion zu untersuchen, wurde jeweils nach 5; 10; 15 und 30 min ein Aliquot von 20 μl für den EIA abgenommen. In den Versuchen zur Zeitabhängigkeit sollte geprüft werden, ob eine Erhöhung der Gesamtmenge an 6-keto-PGF_{1α} dadurch zustande kommt, dass die Selbstinaktivierung der PGIS durch ihre Reaktionsprodukte („Suizidreaktionen“) durch Epicatechin unterdrückt wird. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.4 bis 3.6 sowie den Abb. 3.5 bis 3.7 zusammengestellt.

Tab. 3.4 Bildung des 6-keto-PGF_{1α} aus AA in MAEC im zeitlichen Verlauf.
Die Zellen wurden mit 10 μM Kaliumarachidonat und 5 μM Epicatechin inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit Kaliumarachidonat inkubiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 20 μl des Mediumüberstandes von der Probe abgenommen und dem EIA unterzogen. Um den Einfluss des Lösungsmittels Methylglykoll (2-Methoxyethanol) konstant zu halten, wurden zu den Kontrollen 20 μl Methylglykoll gegeben.

Zeit [min]	6-keto-PGF _{1α} -Bildung [pg/ml]			
	Kontrolle 1	Kontrolle 2	5 μM Epicatechin, Ansatz1	5 μM Epicatechin, Ansatz2
0	16,3	10,3	14,3	34,2
5	159	179	35,4	179
10	108	73,8	92,5	25,3
15	214	677	296	102
30	225	497	187	47,8

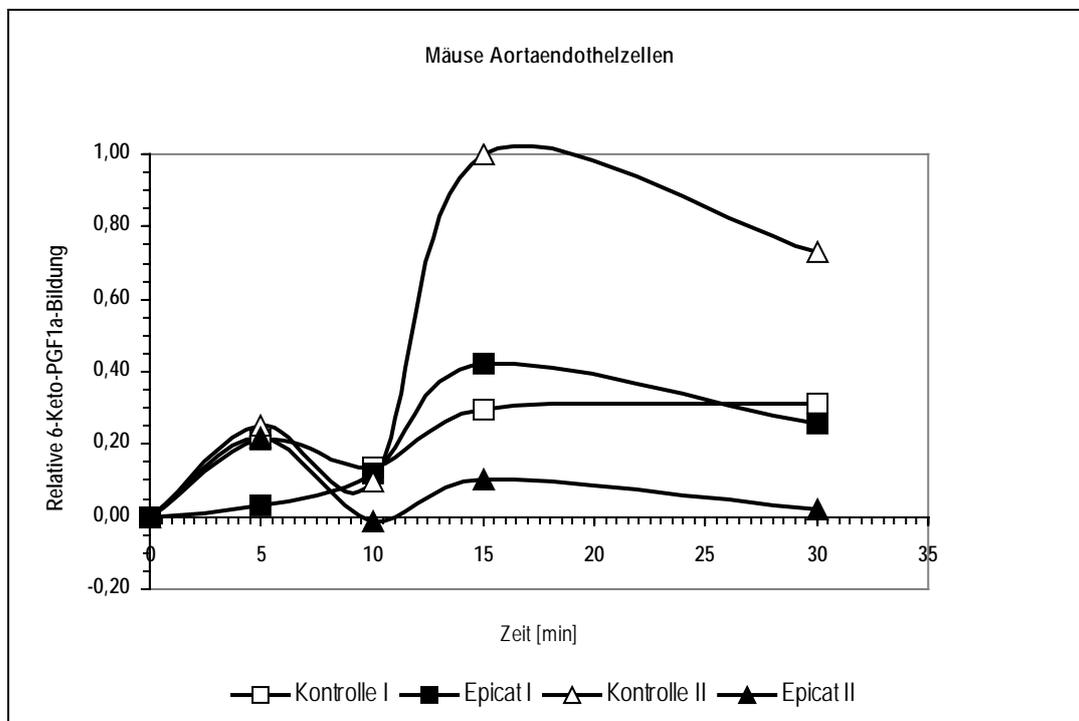
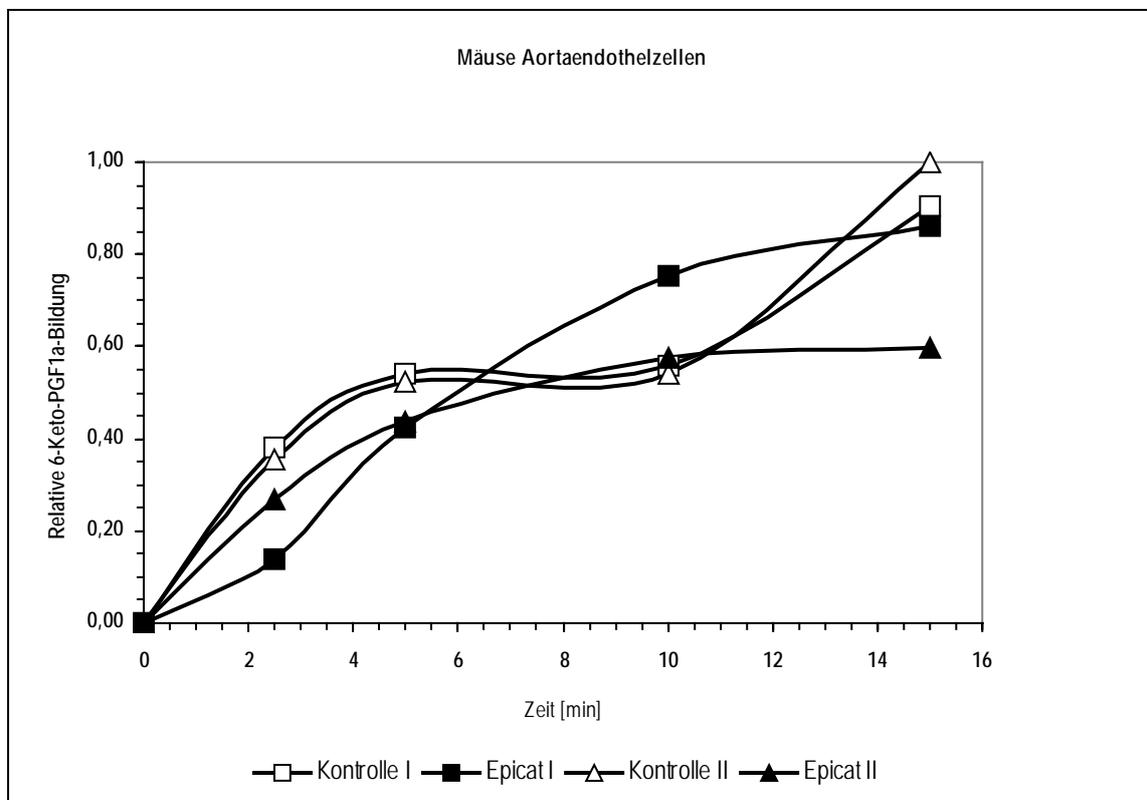


Abb. 3.5 Darstellung der relativen Bildung von 6-keto-PGF_{1α} von MAEC, im zeitlichen Verlauf. Die absoluten Werte sind Tab. 3.4 zu entnehmen.

Tab.3.5 Bildung des 6-keto-PGF_{1α} in MAEC im zeitlichen Verlauf.

Die Zellen wurden mit 10 μM Kaliumarachidonat und 1 μM Epicatechin inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit 10 μM Kaliumarachidonat inkubiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 20 μl des Mediumüberstandes von der Probe abgenommen und für den EIA eingesetzt. Um den Einfluss des Lösungsmittels Methylglykol konstant zu halten, wurden zu den Kontrollen 20 μl Methylglykol gegeben.

Zeit [min]	6-keto-PGF _{1α} -Bildung [pg/ml]			
	Kontrolle 1	Kontrolle 2	1 μM Epicatechin Ansatz1	1 μM Epicatechin Ansatz2
0	309	288	366	352
2,5	8824	8212	3499	6376
5	12352	11967	9777	10045
10	12760	12352	17126	13191
15	20444	22564	19512	13650

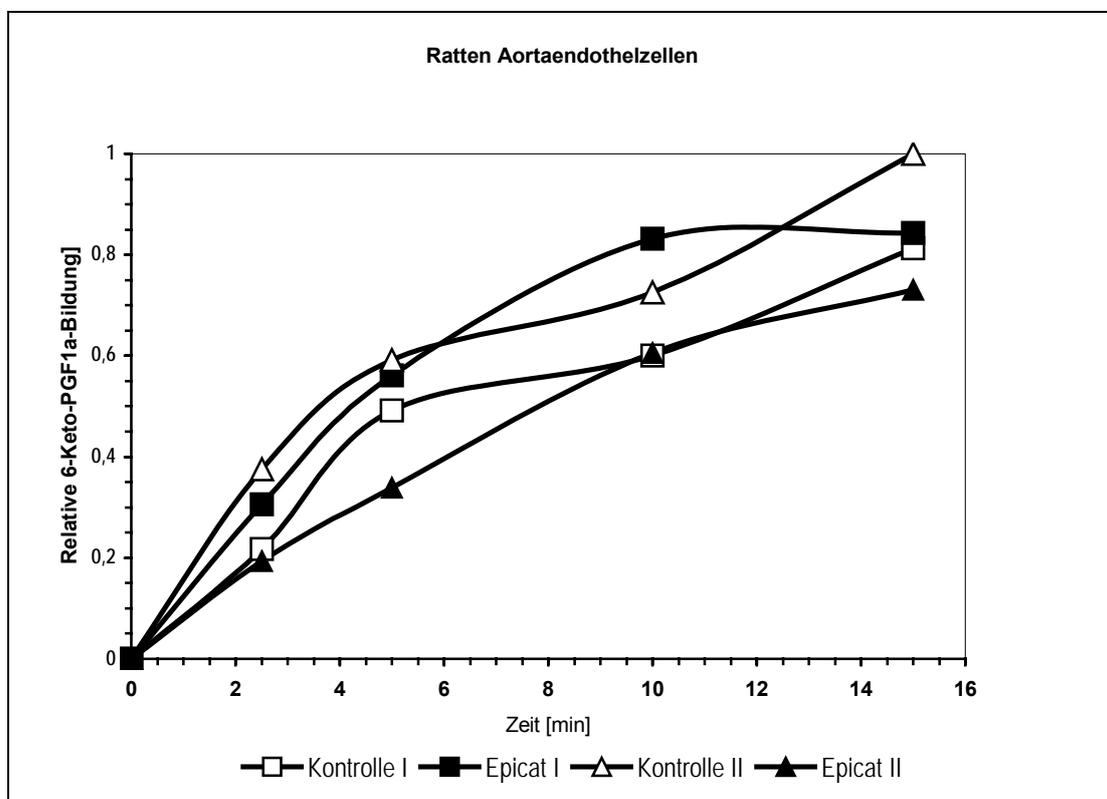
**Abb. 3.6** Darstellung der relativen Bildung von 6-keto-PGF_{1α} in MAEC im zeitlichen Verlauf. Die absoluten Werte sind Tab. 3.5 zu entnehmen.

Im Experiment in Tab. 3.5 war die Bildung von 6-keto-PGF_{1α} in den MAEC im Vergleich zu den Daten in Tab. 3.4 etwa um das 100-fache erhöht. Es stellte sich allerdings nach dem Versuch leider heraus, dass bei dieser Zellpassage eine Mycoplasmeninfektion vorlag. Möglicherweise lässt sich auch hier die verstärkte Bildung des 6-keto-PGF_{1α} auf die Mycoplasmeninfektion zurückführen. KAGEMANN *et al.* (2005) konnten nämlich an murinen Keratinocyten, welche zuvor mit *Mycoplasma hyorhinis* infiziert wurden, eine erhöhte Expression der iNOS zeigen. Dieses Beispiel belegt, dass bei infizierten Zellen ein verändertes Muster der Proteinexpression vorliegen kann.

Tab. 3.6 Bildung des 6-keto-PGF_{1α} in RAEC im zeitlichen Verlauf.

Die Zellen wurden mit 10 μM Kaliumarachidonat und 1 μM Epicatechin inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit 10 μM Kaliumarachidonat inkubiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 20 μl des Mediumüberstandes den Ansätzen entnommen und dem EIA unterzogen. Um den Einfluss des Lösungsmittels Methylglykol konstant zu halten, wurden zu den Kontrollen 20 μl Methylglykol gegeben.

Zeit [min]	6-keto-PGF _{1α} -Bildung [pg/ml]			
	Kontrolle 1	Kontrolle 2	1 μM Epicatechin Ansatz1	1 μM Epicatechin Ansatz2
0	149	202	190	185
2,5	269	370	397	292
5	420	511	516	372
10	480	660	590	519
15	597	667	741	588

**Abb. 3.7** Darstellung der relativen Bildung von 6-keto-PGF_{1α} in RAEC im zeitlichen Verlauf. Die absoluten Werte sind Tab. 3.6 zu entnehmen.

Bei den mit Kaliumarachidonat behandelten Aortaendothelzellen der Maus, der Ratte und des Rindes konnte eine starke Erhöhung der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung beobachtet werden. Die Behandlung der Zelllinie EA.hy926 mit Kaliumarachidonat zeigte hingegen keinen Anstieg der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Bei den Mauszellen schien nur der initiale Schritt der Arachidonsäurekaskade, die Freisetzung unveresterter Arachidonsäure, ausgefallen zu sein, d.h. nach Zugabe von Kaliumarachidonat konnte eine aktive PGIS festgestellt werden. Bei den EA.hy926-Zellen war dagegen anscheinend mindestens ein anderer Schritt der Arachidonsäurekaskade ausgefallen. Entweder verfügten die Zellen über keine aktive PGIS, oder der Ausfall lag bereits auf der Ebene der COX-Reaktion. In der Literatur ist bis dato keine aktive PGI₂-Synthese in EA.hy926-Zellen beschrieben worden. Sollte sie tatsächlich in dieser humanen Zelllinie fehlen, so hätte das wesentliche Auswirkungen auf die Verwendbarkeit dieser Zellen als Modell für das biochemische und funktionelle Verhalten von Gefäßendothelzellen. So wurden EA.hy926-Zellen in der Literatur vielfach für Untersuchungen des endothelialen NO-Stoffwechsels herangezogen. Da im Gefäßendothel mit Wechselwirkungen zwischen den beiden wichtigen vasodilatatorischen Signalsystemen (Prostazyklin und Stickstoffmonoxid) zu rechnen ist, würde eine solche Eigenschaft mit dieser Zelllinie nicht richtig widerspiegelt werden.

Eine eindeutige Steigerung der PGI₂-Produktion durch Epicatechin wurde jedoch auch bei den anderen Zelllinien zu keiner Zeit beobachtet. MIZUGAKI *et al.* (2000) zeigten einen Anstieg der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung bei Inkubation von BAEC mit Epigallocatechingallat, allerdings erst bei Konzentrationen zwischen 25 μM – 200 μM.

4. Diskussion

4.1 Eignung des MTT-Tests zur Prüfung auf zytotoxische Wirkungen von Polyphenolen

Mittels des MTT-Tests wurde gezeigt, dass Epicatechin bis 300 μM und Quercetin bis 100 μM nicht zytotoxisch auf Endothelzellen wirken. Eine mögliche Ursache für die nachgewiesene Toxizität von 300 μM Quercetin könnte die Autoxidation von Quercetin zu Chinonmethiden (AWAD *et al.*, 2001) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sein. Ähnliches wurde bereits von CHICHIRAU *et al.* (2005) beschrieben. Das Einwirken von Wasserstoffperoxid bedeutet oxidativen Stress für die Zellen und könnte *in vivo* zu einer endothelialen Dysfunktion führen, was wiederum pro-atherogene Effekte auslösen würde. Der Zusatz von Katalase *in vitro* würde das Entstehen des Zellgiftes Wasserstoffperoxid verhindern. Katalase wandelt in einer Disproportionierungsreaktion das Wasserstoffperoxid in H_2O und O_2 um und macht es somit unschädlich. Auch für andere antioxidativ wirkende Substanzen, z.B. α -Tocopherol (Vitamin E) ist bekannt, dass bei höheren Konzentrationen eine pro-oxidative Wirkung eintreten kann. Für das Antioxidanz Ascorbinsäure (Vitamin C) ist beschrieben, dass es in erhöhter Konzentration und in Anwesenheit von hohen Glukosekonzentrationen die zytotoxische Wirkung des oxLDL verstärkt (ASHIDATE *et al.*, 2003). Dies stellt in bezug auf Diabetes mellitus einen wichtigen Gesichtspunkt dar.

Epicatechin hingegen wirkt nicht nur nicht zytotoxisch, sondern schützt die Zellen zudem noch gegenüber zytotoxischen Agenzien, wie oxLDL (STEFFEN *et al.*, 2005; 2006).

4.2 Wie könnten Epicatechin oder andere Polyphenole eine erhöhte Abgabe von PGI_2 an das Plasma verursachen?

Eine Arbeitsgruppe in Davis, CA beschrieb einen Anstieg des 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ im Plasma von Probanden, die zuvor eine procyanidinreiche Schokolade SCHRAMM *et al.* (2001) bzw. den Saft roter Trauben (POLAGRUTO *et al.*, 2003) zu sich genommen hatten. Auf dieser Basis stellt sich die Frage, ob und wenn ja, wie Epicatechin zu diesem Effekt beiträgt. Eine erhöhte Expression des Enzyms Prostazyklinsynthase konnte weder für Epicatechin noch für Quercetin festgestellt werden. Im Unterschied zu an-

deren Arbeiten, wie z.B. von OKAHARA *et al.* (1998), die eine erhöhte Expression der Prostazyklinsynthase unter „Shear Stress“ feststellen konnten, wurde jedoch bei der Zellbehandlung mit Epicatechin und Quercetin in dieser Arbeit eine solche Belastung der Zellen nicht herbeigeführt.

Auch konnte keine Steigerung der Aktivität der Prostazyklinsynthase in den vorliegenden Experimenten gefunden werden, dies schließt auch einen durch Epicatechin vermittelten Anstieg der Menge an aktivem Enzymprotein aus. Diese Umstände lassen vermuten, dass der Mechanismus der 6-keto-PGF_{1α}-Erhöhung im Plasma auf einer anderen Ebene zu suchen ist.

Eine der Möglichkeiten könnte sein, dass nicht Epicatechin, sondern einer seiner Metaboliten das wirksame Agens darstellt. So wird ein großer Teil des oral aufgenommenen Epicatechins im Organismus durch Konjugation, Sulfatierung und O-Methylierung in andere Verbindungen umgewandelt (BABA *et al.*, 2001), die ihrerseits wiederum den Stoffwechsel in Endothelzellen beeinflussen können (KOGA *et al.*, 2001). Neben diesen Reaktionen kommen auch oxidative Umwandlungen des Epicatechins in Betracht. So bewirkt z.B. Myeloperoxidase (MPO) in Gegenwart von H₂O₂ eine Oxidation von Epicatechin. Dies konnte am Auftreten einer Absorptionsbande bei 435 nm nachgewiesen werden (KOSTYUK *et al.*, 2003). In gesunden Endothelzellen ist zwar keine MPO vorhanden, jedoch wird dieses Enzym in atherosklerotisch geschädigten Gefäßarealen infolge der inflammatorischer Leukozytenrekrutierung in enzymatisch aktiver Form angereichert (DAUGHTERY *et al.*, 1994). Auch andere Reaktionen des oxidativen Stoffwechsels von Flavonoiden sind bekannt (WALLE, 2004), wobei deren naheliegende Rolle beim oxidativen Stress im Vergleich zu den Konjugationsprodukten von etlichen Autoren anscheinend unterschätzt wird. Solche Einflüsse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst werden, da die Zellen keinem oxidativen Stress ausgesetzt wurden.

Weiterhin muss bei der Beurteilung der vorliegenden Daten berücksichtigt werden, dass die Zellen nicht mit Epicatechin vorbehandelt wurden. STEFFEN und Mitarbeiter wiesen bei verschiedenen Gefäßendothelzelllinien Schutzwirkungen gegenüber der cytotoxischen Wirkung von oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL) nach, die eine mehrstündige Vorinkubation der Zellen mit Epicatechin erforderten (STEFFEN *et al.*, 2005; 2006a; 2006b).

Möglicherweise beeinflussen Epicatechin oder seine Metaboliten die Prostazyklin-synthese nicht direkt, sondern greifen an anderer Stelle in den Arachidonsäurestoffwechsel ein. So könnte eine verstärkte Arachidonsäurefreisetzung auch durch eine Stimulierung der zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) bedingt sein. MERHI-SOUSSI *et al.* (2000) zeigten einen möglichen Zusammenhang zwischen der PGI₂-Synthese und der Aktivität der cPLA₂. So beschrieben YAMASAKI *et al.* (2000) eine erhöhte Expression der cPLA₂-mRNA unter dem Einfluss von Bradykinin; dies sollte eine erhöhte Synthese von PGI₂ zur Folge haben. Dass im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen in den MAEC ein solches Verhalten nicht beobachtet wurde, ist vermutlich auf ein verändertes Proteinmuster im Bereich der bradykinin-vermittelten Arachidonsäurefreisetzung zurückzuführen.

Anstelle der PGIS kämen prinzipiell auch die COX I und COX II als Angriffspunkte des Epicatechins in Frage. Da jedoch Epicatechin keine verstärkte Bildung des 6-keto-PGF_{1α} aus Arachidonsäure hervorgerufen hat, ist eine direkte Stimulierung der COX I und COX II durch Epicatechin wenig wahrscheinlich. Dennoch bestünde die Möglichkeit, dass Epicatechin zu einer erhöhten Expression der COX I und/oder der COX II führen könnte, falls nicht die Umwandlung von Arachidonsäure in PGH₂ geschwindigkeitsbestimmend für die PGI₂-Synthese ist. Auch muss die Rolle des Verhältnisses zwischen COX II und PGIS (siehe 1.2.2) in Betracht gezogen werden.

Als weitere Möglichkeit kann spekuliert werden, dass nicht die Kakao-Flavanole die eigentlichen Mediatoren der Modulierung der Prostazyklin-Bildung sind, sondern ein anderer Mediator, dessen Bioverfügbarkeit durch die Flavanole verbessert wird und so sekundär die Prostazyklin-Bildung beeinflusst. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre das NO. Diese Annahme würde sich mit den Studien von HEISS *et al.* (2003; 2005) decken. HEISS *et al.* zeigten, dass die Bioverfügbarkeit des NO durch die Einnahme eines flavanolreichen Kakaotranks erhöht wird. Eine Aktivierung der PGIS durch NO wurde von WADE & FITZPATRICK (1997) beschrieben.

CAMACHO *et al.* (1998) gehen u.a. davon aus, dass die PGIS in Endothelzellen durch Peroxynitrit inaktiviert wird. Peroxynitrit steht in direkter Verbindung zum NO-Stoffwechsel; Epicatechin und andere Flavanole des Kakaos schützen vor den oxidierenden und nitrierenden Reaktionen dieses reaktiven Sekundärmetaboliten des NO-Stoffwechsels (ARTEEL & SIES 1999; SCHROEDER *et al.*, 2001).

Ein wichtiger Faktor könnte außerdem sein, das Epicatechin allein gar nicht in der Lage ist, die von SCHRAMM *et al.* (2001) beschriebenen Effekte hervorzurufen. SCHRAMM *et al.* (2001) arbeiteten mit Flavonoidgemischen des Kakaos und nicht mit Epicatechin als Einzelsubstanz. Möglicherweise ist gerade die Kombination der einzelnen Inhaltsstoffe des Kakaos wichtig, um den beschriebenen Anstieg des 6-keto-PGF_{1α} im Plasma durch orale Aufnahme, und auch *in vitro* durch die Behandlung der Endothelzellen zu erzielen.

4.3 Vorschläge für weiterführende Studien

4.3.1 Untersuchungen an Endothelzellen unter Normalbedingungen *in vitro*

Um den Mechanismus für die Erhöhung des Spiegels an 6-keto-PGF_{1α} im Blutplasma herauszufinden, sollten in zukünftigen Studien andere Zielsysteme genauer betrachtet werden. Folgende Zielsysteme bieten sich hierbei an:

1. Einfluss auf die Expression der Zyklooxygenasen (COX I und COX II)
2. cPLA₂ als möglicher Angriffspunkt, sowohl Expression als auch Aktivität
3. Die beschriebene Erhöhung der Bioverfügbarkeit des NO könnte im Zellkulturmodell hinsichtlich einer möglichen Vermittlung einer höheren Prosta-zyklinfreisetzung untersucht werden. Durch Zusatz von Arginin als Vorstufenmolekül für NO sowie von Inhibitoren der NO-Synthasen ließe sich eine solche Möglichkeit überprüfen.
4. Rezeptorvermittelte Arachidonsäurefreisetzung (neben Bradykinin auch Acetylcholin oder andere Mediatoren)

4.3.2 Untersuchungen an geschädigten oder gestressten Endothelzellen

Es ist anzunehmen, dass sich der Stoffwechsel geschädigter Endothelzellen von dem „gesunder“ Endothelzellen unterscheidet. Unter pathologischen Bedingungen kommt es z.B. zu einer erhöhten Expression der COX II. Ebenso könnten andere Enzyme verstärkt exprimiert bzw. aktiviert werden.

Um einen pathologischen Zustand der Zellen zu simulieren, könnten die Zellen zuvor mit schädigenden Agenzien behandelt werden. Dafür kommen unter anderem oxLDL, Angiotensin II und Peroxynitrit in Frage. Eine andere Maßnahme wäre, die Zellen einem Scherstress zu unterwerfen. Auf diese Weise könnten die Zellen in einen Zustand gebracht werden, der sie gegenüber modulierenden (schädigenden wie schützenden) Agenzien besser ansprechbar macht. Bei den so „gestressten“ Zellen können die in 4.3.1 genannten Parameter sowie die PGIS-Aktivität untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Die in der Nahrung vorkommenden Polyphenole sind Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass eine erhöhte Nahrungsaufnahme von Kakao-Flavonoiden die Mortalität und Herz-Kreislauf-Morbidität senkt. Auf welche Mechanismen diese Wirkungen zurückzuführen sind, ist unklar. SCHRAMM *et al.* (2001) beschrieben einen Anstieg des 6-keto-PGF_{1α}/Leukotrien-Quotienten im Serum bei Probanden nach Gabe flavonoidreicher Schokolade im Vergleich zur Verabreichung flavonoidarmer Schokolade. Beim 6-keto-PGF_{1α} handelt es sich um den stabilen Metaboliten des vasodilatierenden Eikosanoids Prostazyklin (PGI₂), das hauptsächlich in Endothelzellen der Blutgefäße synthetisiert wird. PGI₂ schützt vor endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose. Epicatechin, ein im Kakao vorkommendes Flavonoid, könnte für den Anstieg von 6-keto-PGF_{1α} *in vivo* verantwortlich sein.

Ziel: Ziel dieser Arbeit war es, *in vitro* zu prüfen, ob Epicatechin kultivierte Endothelzellen dahingehend moduliert, dass es zu einer erhöhten Prostazyklin-Freisetzung kommt. Als Voraussetzung für solche Untersuchungen musste zunächst ausgeschlossen werden, dass Epicatechin die Endothelzellen schädigt. Es sollte untersucht werden, ob die Behandlung der Zellen mit Epicatechin die Transkription der Prostazyklinsynthase (PGIS) erhöht oder die Enzymaktivität im Sinne einer verbesserten PGI₂-Synthese moduliert.

Methodik: Die Zytotoxizität von Epicatechin und zusätzlich auch von Quercetin wurde mittels des MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Tests an Mäuse-Aorta-Endothelzellen (MAEC) untersucht. Mittels RT-PCR wurde der Einfluss von beiden Substanzen auf die Transkriptionsebene der PGIS in MAEC ermittelt. Die Modulation der Enzymaktivität der PGIS wurde durch den 6-keto-PGF_{1α}-Enzym-Immuno-Assay an verschiedenen Endothelzelllinien, Mäuse-, Rinder- (BAEC) und Ratten-Aorta-Endothelzellen (RAEC) sowie die Hybridzelllinie EA.hy926, untersucht. Dabei wurde einerseits die Ebene der Signaltransduktion durch Stimulation mit Bradykinin erfasst und andererseits Arachidonsäure in Form von Kaliumarachidonat als Substrat direkt zu den Zellen zugesetzt.

Ergebnisse: Epicatechin zeigte bis 300 μM und Quercetin bis 100 μM keine toxische Wirkung auf Mäuse-Aorta-Endothelzellen. Auf der Ebene der Expression trat keine Zunahme der PGIS-mRNA auf. Weder Bradykinin noch Epicatechin führten bei MAEC, RAEC und EA.hy926 zu einer verstärkten Bildung von 6-keto-PGF_{1α}. Bei den mit Kaliumarachidonat behandelten Zellen MAEC, BAEC und RAEC konnte eine starke Erhöhung der 6-keto-PGF_{1α}-Bildung beobachtet werden. Eine Steigerung der PGI₂-Produktion durch Epicatechin wurde jedoch nicht beobachtet.

Schlussfolgerungen: Der in der Literatur zuvor beschriebene Anstieg des 6-keto-PGF_{1α} im Plasma, nach dem Genuss flavonoidreicher Schokolade, ist vermutlich nicht auf eine direkte Wirkung von Epicatechin auf die Menge und Aktivität der Prostazyklinsynthase in unbehandelten Endothelzellen zurückzuführen. Ziel nachfolgender Untersuchungen sollten daher andere Zielsysteme, wie z.B. COX I, COX II, die cPLA₂ oder Komponenten des Signalübertragungssystems in Aorta-Endothelzellen sein. Als weitere Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, dass die Kakao-Flavonoide die Prostazyklin-Bildung nicht direkt, sondern über einen anderen Mediator fördern, wie z.B. das Stickstoffmonoxid. Für NO ist hinreichend bekannt, dass dessen Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität durch Epicatechin und verwandte Verbindungen verbessert wird. Weiterhin ist denkbar, dass ein Effekt des Epicatechins auf die Prostazyklinbildung erst bei geschädigten oder gestressten Endothelzellen nachweisbar ist.

6. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AChE	Acetylcholinesterase
BAEC	Rinder-Aortaendothelzellen
bp	Basenpaare
COMT	Catecholamin-O-Methyltransferase
COX	Zyklooxygenase
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modifiziertes Eagle-Medium
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EIA	Enzym-Immunoassay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
MAEC	Mäuse-Aortaendothelzellen
MG	2-Methoxyethanol
MPO	Myeloperoxidase
OxLDL	Oxidativ modifiziertes LDL
Pa	Passage
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PGI ₂	Prostacyclin (Prostaglandin I ₂)
PGIS	Prostacyclin – Synthase
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster-Studie
RAEC	Ratten-Aortaendothelzellen
SGLT1	Sodiumdepend glucose transporter 1
6-keto-PGF _{1α}	6-keto-Prostaglandin F _{1α}

7. Literaturverzeichnis

Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 1999;**47**:4184-4188.

Arteel GE, Sies H. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett.* 1999;**462**:167-170.

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

Arts ICW, Hollman PCH, Kromhout D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet.* 1999;**354**:488.

Arts ICW, van de Putte B, Hollman PC. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. *J Agric Food Chem.* 2000;**48**:1746-1751.

Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem.* 2000;**48**:1752-1757.

Ashidate K, Kawamura M, Tohda H, Miyazaki S, Hayashi H, Teramoto T, Hirata Y. Ascorbic acid augments cytotoxicity induced by oxidized low-density lipoprotein. *J Atheroscler Thromb.* 2003;**1**:7-12.

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

Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Bladeren PJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. Structure-activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 2001;**14**:398-408.

Baba S, Osakabe N, Natsume M, Muto Y, Takizawa T, Terao J. In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J. Nutr.* 2001;**131**:2885-2891.

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

Camacho M, Lopez-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depend on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res.* 1998;**83**:353-365.

Carbonaro M, Grant G, Pusztai A. Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur J Nutr.* 2001;**40**:84-90.

Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 2001;**167**:2831-2838.

Chichirau A, Flueraru M, Chepelev LL, Wright JS, Willmore WG, Durst T, Hussain HH, Charron M. Mechanism of cytotoxicity of catechols and naphthalenediol in PC12-AC cells: the connection between extracellular autoxidation and molecular electronic structure. *Free Radic Biol Med* 2005;**38**:344-355.

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

Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavanoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998;**436**:71-75.

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

Donovan JL, Crespy V, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A, Remesy C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J Nutr* 2001;**131**:1753-1757.

Edgell CJS, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;**80**:3734-3737.

Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr*. 2004;**23**:197-204.

Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens*. 2003;**21**:2281-2286.

Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 2000;**130**:2765-2771.

Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 2001;**15**:257-259.

Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000;**97**:13275-13280.

Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmac Ther* 1992;**56**:131-190.

Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999;**47**:490-496.

Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr*. 2000;**130**:2086S-2092S.

Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* 2003;**290**:1030-1031.

Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol* 2005;**46**:1276-1283.

Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995;**62**:1276-1282.

Kagemann G, Henrich B, Kuhn M, Kleinert H, Schnorr O. Impact of *Mycoplasma hyorhinis* infection on L-arginine metabolism: differential regulation of the human and murine iNOS gene. *Biol Chem* 2005;**386**:1055-1063.

Kenny TP, Keen CL, Jones P, Kung HJ, Schmitz HH, Gershwin ME. Cocoa procyanidins inhibit proliferation and angiogenic signals in human dermal microvascular endothelial cells following stimulation by low-level H₂O₂. *Exp Biol Med* 2004;**229**:765-771.

Koga T, Meydani M. Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001;**73**:941-948.

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

Kraemer T, Prakosay I, Date RA, Sies H, Schewe T. Oxidative modification of low-density lipoprotein: lipid peroxidation by myeloperoxidase in the presence of nitrite. *Biol Chem* 2004;**385**:809-819.

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

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J Agric Food Chem*. 2003;**51**:7292–7295.

Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res* 2004;**38**:771-785.

Merhi-Soussi F, Dominguez Z, Macovschi O, Dubois M, Savany A, Lagarde M, Prigent AF. Human lymphocytes stimulate prostacyclin synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Involvement of endothelial cPLA₂. *J Leukoc Biol*. 2000;**68**:881-889.

Mizugaki M, Ishizawa F, Yamazaki T, Hishinuma T. Epigallocatechin gallate increase the prostacyclin production of bovine aortic endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;**62**:157-164.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;**65**:55-63.

Neuhaus T, Pabst S, Stier S, Weber AA, Schrör K, Sachinidis A, Vetter H, Ko YD. Inhibition of the vascular-endothelial growth factor-induced intracellular signaling and mitogenesis of human endothelial cells by epigallocatechin-3 gallate. *Eur J Pharmacol* 2004;**483**:223-227.

O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-o-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol* 2003;**65**:479-491.

Osakabe N, Yamagishi M, Natsume M, Yasuda A, Osawa T. Ingestion of proanthocyanidins derived from cacao inhibits diabetes-induced cataract formation in rats. *Exp Biol Med* 2004;**229**:33-39.

Polagruto JA, Schramm DD, Wang-Polagruto JF, Lee L, Keen CL. Effects of flavonoid-rich beverages on prostacyclin synthesis in humans and human aortic endothelial cells: association with *ex vivo* platelet function. *J Med Food* 2003;**6**:301-308.

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

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

Sadik CD, Sies H, Schewe T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* 2003;**65**:773-781.

Schewe T, Sadik CD, Klotz LO, Yoshimoto T, Kühn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001;**382**:1687-1696.

Schewe T. 15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol Chem* 2002;**383**:365-374.

Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001;**73**:36-40.

Schroeder P, Klotz LO, Buchczyk DP, Sadik CD, Schewe T, Sies H. Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reaction of peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**285**:782-787.

Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci* 2006;**103**:1024-1029.

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

Sies H, Heiss C, Steffen Y, Kelm M, Schewe T. The vascular biochemistry of cocoa flavanols. International Congress of Nutrition, Nutrition Safari for Innovative Solutions; Durban, South Africa; Karger, 2005.

Spencer JP. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr* 2003;**133**:3255S-3261S.

Steffen Y, Schewe T, Sies H. Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**331**:1277-1283.

Steffen Y, Schewe T, Sies H. Myeloperoxidase-mediated LDL oxidation and endothelial cell toxicity of oxidized LDL; attenuation by (-)-epicatechin. *Free Radic Res* 2006; (in press)

Steffen Y, Wiswedel I, Peter D, Schewe T, Sies H. Cytotoxicity of myeloperoxidase/nitrite-oxidized low-density lipoprotein toward endothelial cells is due to a high 7 β -hydroxycholesterol to 7-ketocholesterol ratio. *Free Radic Biol Med* 2006;**41**:1139-1150.

Ullrich V, Castle L, Weber P. Spectral evidence for the cytochrome P450 nature of prostacyclin synthetase. *Biochem Pharmacol* 1981;**30**:2033-2036.

Wade ML, Fitzpatrick FA. Nitric oxide modulates the activity of the hemoproteins prostaglandin I₂ synthase and thromboxane A₂ synthase. *Arch Biochem Biophys* 1997;**347**:174-180.

Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 2004;**36**:829-837.

Walle T, Walle UK, Halushka PV. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr* 2001;**131**:2648-2652.

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

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

Wiswedel I, Hirsch D, Kropf S, Gruening M, Pfister E, Schewe T, Sies H. Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F₂-isoprostane concentrations in humans. *Free Radic Biol Med* 2004;**37**:411-421.

Yamasaki S, Sawada S, Komatsu S, Kawahara T, Tsuda Y, Sato T, Toratani A, Kono Y, Higaki T, Imamura H, Tada Y, Akamatsu N, Tamagaki T, Tsuji H, Nakagawa M. Effects of bradykinin on prostaglandin I₂ synthesis in human vascular endothelial cells. *Hypertension* 2000;**36**:201-207.

Yokoyama C, Yabuki T, Inoue H, Tone Y, Hara S, Hatae T, Nagata M, Takahashi EI, Tanabe T. Human gene encoding prostacyclin synthase (PTGIS): genomic organization, chromosomal localization, and promoter activity. *Genomics*. 1996;**36**:296-304.

8. Anhang

8.1. 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.

(Cornelia Schütt)

Düsseldorf, den _____

8.2 Curriculum vitae

08.05.1973	Geburt in Rostock als Tochter von Klaus Schütt (Dipl.-Ing.FH für Schiffsmaschinenbau und -betriebstechnik) und Karin Schütt geb. Jeschke (Friseurmeisterin)
09/1979 – 07/1989	Polytechnische Oberschule, Rostock
11/1989 – 06/1993	Werner von Siemens Gymnasium, Gronau Allgemeine Hochschulreife
08/1993 – 06/1996	Ausbildung zur Chemielaborantin bei den Rhein. Kalksteinwerken Wülfrath
07/1996 – 09/1999	Tätigkeit als Chemielaborantin im AWA-Institut Wülfrath (Gesellschaft für angewandte Wasserchemie mbH)
10/1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
03/2002	Ärztliche Vorprüfung
04/2002 – 08/2004	Experimentelle Phase der Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005 – 08/2005	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf, Innere Medizin
08/2005 – 12/2005	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf, Chirurgie
12/2005 – 03/2006	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf, Pädiatrie
05/2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 09/2006	Assistenzärztin in der Viszeral- und Gefäßchirurgie des Helios Klinikums Wuppertal

8.3 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. **Helmut Sies** für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die Möglichkeit an seinem Institut zu forschen.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. **Tankred Schewe** für die exzellente Betreuung meiner Arbeit, für seine zahlreichen Ratschläge und Anregungen.

Den Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen.

Bei den Mitgliedern der „**Research Group Flavonoids**“ bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und die konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Im Besonderen möchte hier Frau **Sonja Gründel** gedenken, die durch ihren unerwarteten Tod eine große Lücke hinterließ.

Besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, die mir in jeder Situation emotional stets zur Seite standen.
