

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Molekulare Mechanismen der (-)-Epicatechin-Wirkung:**  
Bedeutung der eNOS und antioxidativer Proteine

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Friederike Julia Angela Wilhelmine Vössing

2017

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. Miriam Cortese-Krott

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

## Zusammenfassung

Es besteht zunehmende Evidenz dafür, dass Flavanole einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre System ausüben und der Konsum mit einer sinkenden Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist. Flavanole werden über die Nahrung aufgenommen und kommen u.a. in Kakao, Tee und Wein vor. Die vermuteten Mechanismen, die an der Vermittlung des protektiven Effektes der Flavanole beteiligt sind, sind noch nicht eindeutig geklärt. Bisherige Erkenntnisse zeigen an, dass eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit durch Beeinflussung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die Modulation des Redoxstatus der Endothelzellen in die Mechanismen involviert sind.

Das Flavanol (-)-Epicatechin ist dabei von besonderer Bedeutung, da es in flavanol-haltigen Lebensmitteln hoch konzentriert vorkommt und nach Aufnahme umfangreich metabolisiert wird. Die entstehenden (-)-Epicatechin-Metaboliten erreichen dabei höhere Plasmaspiegel als Metaboliten anderer Flavanole. Ein direkter Zusammenhang zwischen der eNOS-bedingten NO-Produktion in Endothelzellen und der Wirkung von (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten konnte bisher nicht gezeigt werden. Der redoxensitive Transkriptionsfaktor nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2) ist unter oxidativem Stress an der Modulation von antioxidativen Enzymen und Redoxproteinen beteiligt. Eine Induktion der transkriptionalen Aktivität von Nrf-2 kann durch oxidative und elektrophile Moleküle induziert werden, möglicherweise auch durch (-)-Epicatechin und seine Metaboliten.

Das Bestreben der vorliegenden Arbeit ist es die Wirkungsweisen und Effekte von (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten in-vitro mittels Zellkultur an humanen Endothelzellen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin und seine Metaboliten sowohl die Expression als auch die Aktivierung der eNOS erhöhen. Wobei sich im Western Blot die Erhöhung der eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung unter Stressbedingungen hervorgerufen durch Serumverarmung (Starving) verstärkt zeigte. Auch konnte durch (-)-Epicatechin eine schützende Wirkung gegenüber oxidativem Schaden nachgewiesen werden. (-)-Epicatechin und seine Metaboliten bewirkten unter Starving eine Hochregulation der Expression antioxidativer, teils Nrf-2-regulierter Enzyme (Hämoxygenase-1 (HO-1), Superoxiddismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathionperoxidase (GPx) und Enzyme der Glutathionsynthese (Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCLC), Glutamate-cysteine ligase, regulatory subunit (GCLM)). Nach (-)-Epicatechin-Behandlung konnte mittels Konfokalmikroskopie die Erhöhung der Translokation von Nrf-2 in den Zellkern gezeigt werden. Die Durchführung einer Nrf-2 Bindung an Antioxidant Responsive Elements (AREs) mittels TransAM ermöglichte nach

(-)-Epicatechin-Behandlung den Nachweis einer erhöhten Bindung von Nrf-2 an ARE. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin und seine Metaboliten durch Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit und Beeinflussung von antioxidativen Schutzmechanismen, insbesondere unter oxidativem Stress, positive Effekte auf das Endothel vermittelt. Die Aufdeckung der Effektvermittlung von (-)-Epicatechin kann dazu beitragen die protektiven Wirkungen von (-)-Epicatechin gezielt für die Aufrechterhaltung protektiver physiologischer Mechanismen anwenden zu können.

# Inhaltsverzeichnis

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Zusammenfassung</b>  | <b>II</b>   |
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>   | <b>IV</b>   |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1. Effekte von Flavanolen auf das kardiovaskuläre System                            | 1           |
| 1.2. Bedeutung von NO und oxidativem Stress bei der endothelialen Dysfunktion         | 3           |
| 1.3. Funktionsmechanismen der eNOS  | 5           |
| 1.4. Posttranskriptionale Modifikationen der eNOS                                     | 7           |
| 1.5. Molekulare Wirkungsweisen von (-)-Epicatechin                                    | 8           |
| 1.6. Bedeutung der (-)-Epicatechin-Metaboliten  | 9           |
| 1.7. Wirkungsweise des Transkriptionsfaktors Nrf-2                                    | 10          |
| 1.8. Beeinflussung von Redoxproteinen   | 12          |
| 1.9. Bedeutung von Glutathion bei oxidativem Stress                                   | 13          |
| 1.10. Ziel der Arbeit   | 14          |
| <b>2. Material und Methoden</b>   | <b>16</b>   |
| 2.1. Zellkultur und experimentelle Methoden   | 19          |
| 2.1.1. Medium und Zusätze für Zellkulturen  | 19          |
| 2.1.2. Kultivierung der HUVEC-Zellkultur  | 19          |
| 2.1.3. Herstellung eines Zellpellets  | 19          |
| 2.1.4. Bestimmung der Zellviabilität mittels Neutralrotfärbung                        | 20          |
| 2.1.5. Bestimmung der eNOS-Aktivität mittels Diaminofluorescein (DAF-FM)              | 20          |
| 2.1.6. Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion mittels Peroxid Assay | 20          |
| 2.2. Biochemische Methoden  | 21          |
| 2.2.1. GSH-Bestimmung   | 21          |
| 2.2.2. Proteinbestimmung mit DC Protein Assay   | 21          |
| 2.3. Western Blot   | 22          |
| 2.3.1. Low-temperature PAGE   | 22          |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.3.2.    | Behandlung der Metaboliten mit/ohne Starving  | 23        |
| 2.3.3.    | (-)-Epicatechin und Metaboliten: eNOS, pNOS, HO-1, SOD, CAT, GPx, GCLM, GCLC                            | 23        |
| 2.3.4.    | Kernextraktion  | 23        |
| 2.3.5.    | Western Blot mit Kernextrakten  | 24        |
| 2.4.      | Konfokalmikroskopie   | 24        |
| 2.4.1.    | Nrf-2 Anfärbung und Bestimmung der Nrf-2-Translokation mittels Konfokalmikroskopie                      | 24        |
| 2.5.      | Molekularbiologische Methoden   | 25        |
| 2.5.1.    | Bestimmung der Nrf-2-Bindungsaktivität  | 25        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>26</b> |
| 3.1.      | Expression der eNOS in verschiedenen Zellpassagen   | 26        |
| 3.2.      | Stimulation und Inhibition der eNOS   | 29        |
| 3.3.      | Protektive Effekte von (-)-Epicatechin auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Zellschädigung | 30        |
| 3.4.      | Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion nach (-)-Epicatechin-Behandlung                | 31        |
| 3.5.      | (-)-Epicatechin und seine Metaboliten erhöhen die eNOS-Expression                                       | 33        |
| 3.6.      | (-)-Epicatechin induziert die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern                                   | 37        |
| 3.7.      | (-)-Epicatechin beeinflusst die Nrf-2-Expression im Zellkern  | 39        |
| 3.8.      | (-)-Epicatechin erhöht unter Starving die Expression von HO-1, SOD, CAT und GPx                         | 41        |
| 3.9.      | Einfluss von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf die Glutamatcysteinylgase (GCL)-Expression                 | 45        |
| 3.10.     | (-)-Epicatechin hat keinen Einfluss auf das GSH/GSSG-Level  | 49        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>50</b> |
| 4.1.      | Endothelzellen und der Einfluss von NO  | 50        |
| 4.1.1.    | HUVEC-Zellen als in vitro-Modell zur Untersuchung von Effekten auf Endothelzellen                       | 50        |
| 4.1.2.    | Unterschiede in der eNOS-Expression zwischen den Passagen   | 51        |
| 4.1.3.    | Einfluss der Passagierung auf das Dimer/Monomer-Verhältnis  | 52        |
| 4.1.4.    | Stimulation und Inhibition der NO-Produktion  | 53        |
| 4.2.      | Effekte von (-)-Epicatechin   | 54        |
| 4.2.1.    | Toxizität von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf (-)-Epicatechin-vorbehandelte Endothelzellen            | 54        |
| 4.2.2.    | Unspezifische H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion im Medium nach (-)-Epicatechin-Behandlung       | 55        |
| 4.2.3.    | Einfluss von (-)-Epicatechin auf eNOS und pSer-1177-eNOS  | 56        |
| 4.2.4.    | Einfluss von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf eNOS und pSer-1177-eNOS                                    | 57        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.5.    | Starving und die Beeinflussung der (-)-Epicatechin- und Metabolitenwirkung                | 58        |
| 4.3.      | Effekte von (-)-Epicatechin auf die Transkriptionsfaktoren Nrf-1 und Nrf-2                | 59        |
| 4.3.1.    | (-)-Epicatechin bewirkt die Nrf-2 Translokation in den Zellkern                           | 59        |
| 4.3.2.    | (-)-Epicatechin vermittelt eine Verminderung der Nrf-2-/Nrf-1-Expression                  | 59        |
| 4.3.3.    | Beeinflussung der ARE-Genexpression durch (-)-Epicatechin                                 | 60        |
| 4.4.      | Beeinflussung des Redoxstatus durch (-)-Epicatechin und seine Metaboliten                 | 61        |
| 4.4.1.    | (-)-Epicatechin verändert die Expression von Redoxproteinen                               | 61        |
| 4.4.2.    | (-)-Epicatechin-Metaboliten haben Einfluss auf die Glutamatcysteinligase (GCL)-Expression | 62        |
| 4.4.3.    | Effekte zwischen (-)-Epicatechin und Glutathion   | 63        |
| <b>5.</b> | <b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>  | <b>65</b> |
|           | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>67</b> |
|           | <b>Danksagung</b>   | <b>81</b> |
|           | <b>Eidesstattliche Versicherung</b>   | <b>82</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Strukturformel Flavanole.....  | 1  |
| Abbildung 2: Effekte von (-)-Epicatechin auf das Endothel .....   | 2  |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mechanismus der eNOS-Aktivierung bzw. des eNOS-Uncoupling....                       | 5  |
| Abbildung 4: Bildung von Peroxynitrit .....   | 6  |
| Abbildung 5: Modell zur Regulation des Keap-1/Nrf-2-Signalwegs .....  | 11 |
| Abbildung 6: Synthese von Glutathion (GSH) .....  | 13 |
| Abbildung 7: Oxidation und Reduktion von Glutathion (GSH).....  | 14 |
| Abbildung 8: eNOS-Expression als Marker für die Stabilität von HUVEC-Zellen.....  | 27 |
| Abbildung 9: Dimer/Monomer-Verhältnis unterschiedlicher Passagen.....   | 28 |
| Abbildung 10: Bestimmung der NO-Level in HUVEC-Zellen mittels DAF.....  | 29 |
| Abbildung 11: Wachstumseffekte von (-)-Epicatechin .....  | 30 |
| Abbildung 12: Zellviabilität von (-)-Epicatechin-behandelten HUVEC-Zellen unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Einfluss ..... | 31 |
| Abbildung 13: TBHQ erhöhte die unspezifische H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion .....                                  | 32 |
| Abbildung 14: (-)-Epicatechin induziert keine unspezifische H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion im Medium .....         | 32 |
| Abbildung 15: (-)-Epicatechin erhöht die eNOS-Expression .....  | 35 |
| Abbildung 16: (-)-Epicatechin und seine Metaboliten erhöhen die eNOS-Expression .....   | 36 |
| Abbildung 17: (-)-Epicatechin und seine Metaboliten erhöhen die eNOS-Expression (Starving).....                               | 37 |
| Abbildung 18: (-)-Epicatechin induziert die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern.....                                      | 38 |
| Abbildung 19: (-)-Epicatechin bewirkt eine Runterregulation der Nrf-2 Expression .....  | 40 |
| Abbildung 20: (-)-Epicatechin beeinflusst die Nrf-2-Bindung an ARE.....   | 41 |
| Abbildung 21: (-)-Epicatechin führt zu keiner Erhöhung der Expression verschiedener Redoxproteine .....                       | 42 |
| Abbildung 22: (-)-Epicatechin erhöht die Expression verschiedener Redoxproteine (Starving) .....                              | 44 |
| Abbildung 23: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Runterregulation der GCLC-Expression.....                       | 45 |
| Abbildung 24: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Runterregulation der GCLM-Expression.....                       | 46 |
| Abbildung 25: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Erhöhung der GCLC-Expression (Starving) .....                   | 47 |
| Abbildung 26: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Erhöhung der GCLM-Expression (Starving) .....                   | 48 |
| Abbildung 27: (-)-Epicatechin hat keinen Einfluss auf das GSH/GSSG-Level in HUVEC-Zellen .....                                | 49 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Chemikalien .....           | 16 |
| Tabelle 2: Verwendete Kits .....       | 17 |
| Tabelle 3: Geräte.....                 | 18 |
| Tabelle 4: Software .....              | 18 |
| Tabelle 5: Eingesetzte Antikörper..... | 22 |

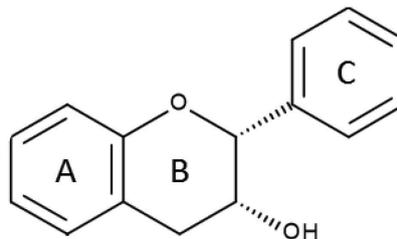
## Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung        |  |                               |  |
|------------------|--|-------------------------------|--|
| 3G               | Epicatechin-5-O-β-D-glucuronide          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                               |
| 3S               | Epicatechin-5-sulfate                    | HO-1                          | Hämoxygenase-1                                   |
| 5S               | 3'-O-Methylepicatechin-4'-sulfate        | HSP90                         | Heat shock protein 90kD                          |
| ACE              | Angiotensin Converting Enzyme            | HUVECS                        | Human umbilical vein endothelial cells           |
| AKT              | Proteinkinase B Gen                      | Keap-1                        | Kelch-like ECH-associated protein                |
| AMPK             | AMP-activated protein kinase             | KG                            | Körpergewicht                                    |
| ANOVA            | Analysis of variance                     | L-Arg                         | L-Arginin  |
| ARE              | Antioxidant responsive element           | LDL                           | Low Density Lipoprotein                          |
| ATP              | Adenosine-triphosphate                   | L-NAME                        | Nitro-L-Arginine-methyl ester hydrochlorid       |
| BH <sub>2</sub>  | Dihydrobiopterin                         | MAF-Protein                   | Multicopy associated filamentation protein       |
| BH <sub>4</sub>  | Tetrahydrobiopterin                      | max.                          | Maximum  |
| bzw.             | Beziehungsweise                          | min.                          | Minimum  |
| Ca <sup>2+</sup> | Calcium                                  | mRNA                          | Messenger RNA                                    |
| CaI              | Calcium-Ionophor                         | NADPH                         | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate      |
| CaM              | Calmodulin                               | NO                            | Nitric oxide                                     |
| cAMP             | Cyclic adensine monophosphate            | NR                            | Neutralrot                                       |
| CAT              | Catalase                                 | Nrf-2                         | Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2      |
| CAV1             | Caveolin 1                               | O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Superoxid-Anion                                  |
| cGMP             | Cyclic guanosine-monophosphate           | ONOO <sup>-</sup>             | Peroxyinitrit-Anion                              |
| CO               | Kohlenstoffmonoxid                       | p                             | Statistical probability value                    |
| d.h.             | Das heißt                                | PBS                           | Phosphate buffered saline                        |
| DMEM             | Dulbecco's Modified Eagle Medium         | PI3K                          | Phosphoinositid-3-Kinasen                        |
| DNA              | Deoxyribonucleic acid                    | PKA                           | Proteinkinase A                                  |
| EDTA             | Ethylendiaminetetraacetic acid           | PKC                           | Proteinkinase C                                  |
| EGCG             | Epigallocatechingallate                  | RNA                           | Ribonucleic acid                                 |
| eNOS             | Endothelial nitric oxide synthase        | ROS                           | Reactive oxygen species                          |
| Epi              | (-)-Epicatechin                          | Ser-                          | Serin  |
| EpRE             | Electrophile responsive element          | sMAF-Protein                  | Small multicopy associated filamentation protein |
| FAD              | Flavin-adenine-dinucleotide              | SOD                           | Superoxiddismutase                               |
| FCS              | Fetal calb serum                         | SRA                           | Sample reducing agent                            |
| FMN              | Flavin-monomonucleotide                  | TBHQ                          | Tert-Butylhydroquinone                           |
| GCL              | Glutamate cysteine ligase                | TBS                           | Tris buffered solution                           |
| GCLC             | GCL, catalytic subunit                   | Thy-                          | Threonin   |
| GCLM             | GCL, cysteine ligase, regulatory subunit | Tris                          | Tris(hydroxymethyl) aminomethane                 |
| GPx              | Glutathionperoxidase                     | Tris-HCl                      | Tris-hydrochloride                               |
| GSH              | Glutathion, reduziert                    | T-TBS                         | Tween-tris buffered solution                     |
| GSSG             | Glutathion-Disulfid, oxidiert            | u.a.                          | Unter anderem                                    |
| h                | Stunde                                   | VEGF                          | Vascular endothelium growth factor               |
| H <sub>2</sub> O | Wasser                                   | z.B.                          | Zum Beispiel                                     |

# 1. Einleitung

## 1.1. Effekte von Flavanolen auf das kardiovaskuläre System

Flavonoide sind in Pflanzen enthalten und umfassen eine große Gruppe polyphenolischer Verbindungen. Dabei lassen sich die Flavonoide in Flavone (Apigenin, Luteolin u.a.), Flavonole (Quercetin, Kaempferol, Myricetin, Fisetin u.a.), Flavanone (Hesperetin, Naringenin u.a.), Flavanonole (Taxifolin u.a.), Isoflavone (Genistein, Daidzein u.a.) und Flavanole (Catechin, Epigallocatechingallat, (-)-Epicatechin u.a.) unterteilen (Kumar et al. 2013). Flavonoide bestehen chemisch aus einem 15-Kohlenstoff-Gerüst und aus zwei Benzol-Ringen (A, C, Abbildung 1) verbunden durch einen heterozyklischen Pyranring (B, Abbildung 1). Die Bioverfügbarkeit, der Metabolismus und die biologische Aktivität der Flavonoide sind dabei abhängig von der strukturellen Klasse, dem Grad der Hydroxylierung, der Substitution und Konjugation von funktionellen Gruppen und dem Grad der Polymerisation (Heim et al. 2002, Kumar et al. 2013). Die Radikalfänger-Aktivität wird dabei beispielsweise grundlegend durch die Anzahl der phenolischen OH-Gruppen bestimmt (Johnson et al. 2000, Williams et al. 2004).

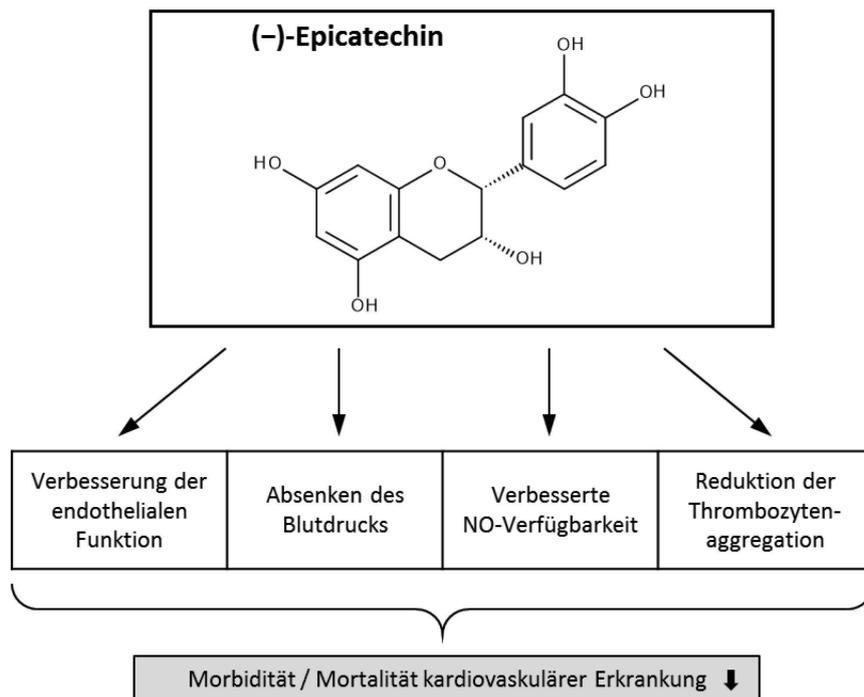


**Abbildung 1: Strukturformel Flavanole**

Entsprechend des Flavonoid-Grundgerüsts sind die Flavanole aus zwei Benzol-Ringen (A,C) verbunden durch einen Pyranring (B) aufgebaut.

Von Menschen und Tieren können Flavanole nicht synthetisiert werden (Koes et al. 2005) und müssen daher über die Nahrung aufgenommen werden, in der sie insbesondere in Tee, Wein, Kakao, Äpfeln, Pflaumen, Granatapfel und Beeren vorkommen (Neveu et al. 2010, Ottaviani et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass der Konsum von Flavanol-haltigen Nahrungsmitteln (Kakao, grüner Tee, Rotwein) einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre System vermittelt und die Wiederherstellung der endothelialen Funktion bewirkt (Schroeter et al. 2006, Heiss et al. 2007, Balzer et al. 2008, Hooper et al. 2008). Außerdem ist eine sinkende Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen mit dem Konsum von Flavanolen assoziiert (Heiss et al. 2010).

Der Mechanismus, der zur Senkung der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen führt, ist bisher noch nicht vollständig verstanden (Schroeter et al. 2006). Es wird angenommen, dass Flavanole wie das (-)-Epicatechin eine Wirkung auf das kardiovaskuläre System insbesondere über das Endothel vermitteln, indem sie endotheliale Funktionen verbessern und ein Absinken des Blutdrucks sowie eine verbesserte Stickstoffmonoxid (NO)-Verfügbarkeit bedingen (Schroeter et al. 2006, Ottaviani et al. 2011). Auch bewirken die Flavanole eine Reduktion der Thrombozytenaggregation (Ostertag et al. 2010) (Abbildung 2). Um die Rolle von Flavanolen in der Effektvermittlung auf Endothelzellen weiter charakterisieren zu können, wurden in dieser Arbeit in-vitro Experimente an endothelialen HUVEC-Zellen durchgeführt. Zur Validierung des HUVEC-Modells wurden zunächst geeignete Passagen anhand der endothelialen NO-Synthase (eNOS)-Expression, eNOS-Phosphorylierung und des Dimer/Monomer-Verhältnisses bestimmt sowie die eNOS-Aktivität in HUVEC-Zellen verifiziert.



**Abbildung 2: Effekte von (-)-Epicatechin auf das Endothel**

Das Flavanol (-)-Epicatechin, das leicht absorbiert und im Körper intensiv metabolisiert werden kann, scheint für die positiven Effekte der Flavanole verantwortlich zu sein (Schroeter et al. 2006, Ottaviani et al. 2011, Ottaviani et al. 2012). Aus diesem Grund wurde (-)-Epicatechin für die Experimente an Endothelzellen in dieser Arbeit ausgewählt. Die molekularen Mechanismen, die hinter der (-)-Epicatechinwirkung stehen, sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Da in der Literatur ähnliche Wirkungsweisen anhand u.a. der Flavonoide Quercetin (Johnson et al. 2000, Chow et al.

2005, Ramyaa et al. 2013) und Epigallocatechingallat (Johnson et al. 2000, Wang et al. 2015) umfangreich untersucht wurden, wurde diese als Vergleichssubstanzen zu (-)-Epicatechin herangezogen. Dennoch ist zu beachten, dass trotz einer geringfügigen Strukturänderung von Quercetin und Epigallocatechingallat im Vergleich zu (-)-Epicatechin, große Unterschiede in der molekularen Wirkungsweise und der Bioaktivität zwischen den beiden Substanzen bestehen können.

Bei den Wirkmechanismen von (-)-Epicatechin nehmen vermutlich die Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit und die Modulation des Redoxstatus eine zentrale Rolle ein. Steffen et al. konnten eine (-)-Epicatechin-vermittelte NO-Erhöpfung in Endothelzellen durch Inhibition der NADPH-Oxidase zeigen (Steffen et al. 2007). Eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit durch direkte Aktivierung der eNOS könnte einen weiteren Mechanismus darstellen und ist Teil der thematischen Ausrichtung dieser Arbeit. Über die antioxidativen Effekte von (-)-Epicatechin ist bisher bekannt, dass darin sowohl der Schutz von Zellen gegenüber oxidiertem LDL (Schewe et al. 2008) und 7-beta-OH-Cholesterin (Steffen et al. 2005, Steffen et al. 2006, Steffen et al. 2007) als auch die Beeinflussung der Aktivität der prooxidativen NADPH-Oxidase involviert sind (Steffen et al. 2007, Schewe et al. 2008). Da die Beeinflussung des Redoxstatus der Gefäßzellen durch (-)-Epicatechin wesentlich an der Wirkung beteiligt zu sein scheint, wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Fragestellung nach dem Einfluss von (-)-Epicatechin auf verschiedene Redoxproteine nachgegangen.

## **1.2. Bedeutung von NO und oxidativem Stress bei der endothelialen Dysfunktion**

Die Endothelzellen spielen eine bedeutende Rolle in der Blutdruckregulation, der Kontrolle der Hämostase sowie der Kontrolle und Bildung bioaktiver Moleküle. Sie dienen dabei als Target für endogene Moleküle und sind an Entzündungsreaktionen und Immunantworten beteiligt. Einen wichtigen Regulator des Gefäßtonus und des Blutdrucks stellt Stickstoffmonoxid (NO) dar (Ignarro 2002). Palmer et al. konnten zeigen, dass die NO-Synthase III oder auch endotheliale Nitric oxide Synthase (eNOS) für die NO-Produktion in Endothelzellen verantwortlich ist (Palmer et al. 1988). Viele antiatherogene Funktionen, die antiinflammatorische, antithrombotische, antiproliferative und antioxidative Effekte umfassen, werden durch NO vermittelt (Ignarro 2002). NO, dem eine bedeutende Rolle in der Bestimmung und Unterstützung der endothelialen Funktion zukommt (Rassaf et al. 2006, Sessa 2009), ist vorwiegend in den Caveolae der Plasmamembran lokalisiert (Hecker et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Palmitoylierung für die Lokalisation von eNOS in den Caveolae notwendig ist und hierüber die Frequenz und das Ausmaß der NO-Freisetzung reguliert werden kann (Liu et al. 1996). Bei Patienten mit Diabetes mellitus wurde eine verminderte Anzahl von endothelialen Caveolae festgestellt (Cassuto et al. 2014).

Neben Diabetikern zeigen auch Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und Risikofaktoren wie Hypertension, Hypercholesterinämie und Nikotinkonsum eine endotheliale Dysfunktion d.h. die Unfähigkeit des Endothels adäquate Mengen an bioaktivem NO zu generieren und eine NO-vermittelte Vasodilatation zu bewirken (Forstermann et al. 2012). Ein Rückgang der NO-Bioverfügbarkeit bewirkt eine chronische Dysfunktion des Endothels mit einer gestörten Homöostase größerer Gefäße, einer Intima-Verdichtung, dem Verlust der Gefäßelastizität sowie der Thrombusbildung. (Sessa 2009). Als Ursachen hierfür können ein Abfall der eNOS-Expression (Wilcox et al. 1997), ein Mangel an Substraten oder Kofaktoren (Pou et al. 1992), Veränderungen der zellulären Signalwirkung mit Beeinflussung der eNOS-Aktivität (Shimokawa et al. 1991) sowie eine beschleunigte NO-Elimination durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich sein (Harrison 1997).

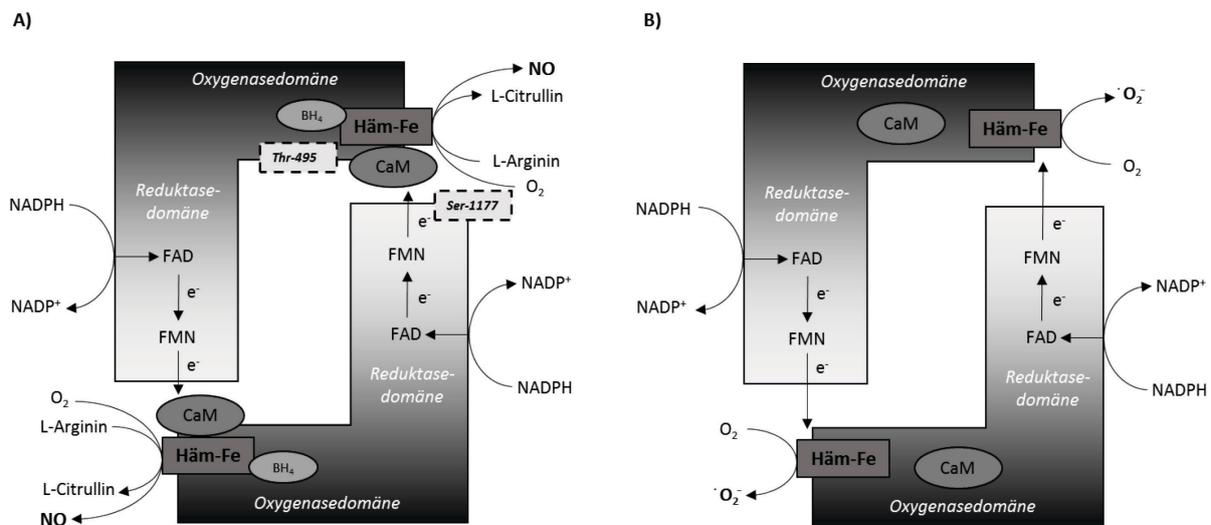
Eine ansteigende Produktion von ROS mit Anstieg des vaskulären oxidativen Stresses tragen zu den Mechanismen der endothelialen Dysfunktion bei (Forstermann 2008) und sind mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen assoziiert (Cai et al. 2000, Forstermann et al. 2012). Bei oxidativem Stress ist das Gleichgewicht zwischen endogenen ROS und Antioxidantien zugunsten der ROS verschoben. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroperoxid, Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) sowie Hydroxyl- und Peroxylradikale werden u.a. zu den ROS gezählt (Forstermann 2008). Verschiedene Enzyme wie die NADPH-Oxidase (Warnholtz et al. 1999, Li et al. 2001), die Xanthin-Oxidase (Ohara et al. 1993, White et al. 1996), Enzyme der mitochondrialen Atmungskette (Turrens 2003) und die uncoupled eNOS (Vasquez-Vivar et al. 1998) sind im Endothel an der Entstehung von ROS beteiligt. Die übermäßige Produktion von ROS induziert Prozesse, die biologische Makromoleküle, wie DNA, Protein, Kohlenhydrate und Lipide oxidieren. Es existiert übereinstimmende Evidenz dafür, dass oxidativer Stress als Hauptinitiator der endothelialen Zellschädigung für die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und Funktionsstörungen verantwortlich ist (Dernbach et al. 2004, Higashi et al. 2009).

Da sowohl die verminderte NO-Produktion als auch die Bildung von ROS in Zusammenhang mit oxidativem Stress wesentliche für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion verantwortlich sind, besteht besonderes Interesse daran Beeinflussungen dieser zellulären Systeme bei der Entschlüsselung der kardioprotektiven Wirkung von (-)-Epicatechin zu analysieren. Da oxidativer Stress die Funktionsfähigkeit der eNOS beeinflusst, ist es wichtig das Vorkommen einer unspezifischen ROS-Bildung nach Zugabe von Behandlungssubstanzen zu eruieren. Um dies ergründen zu können, wurde (-)-Epicatechin auf eine mögliche unspezifische  $H_2O_2$ -Produktion untersucht. Außerdem wurde bestimmt, ob (-)-Epicatechin eine schützende Wirkung gegenüber

ansteigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen vermittelt. Dies ist von entscheidender Bedeutung, um die beobachteten Effekte nachfolgender Experimente mit (-)-Epicatechin interpretieren zu können.

### 1.3. Funktionsmechanismen der eNOS

Das Uncoupling der eNOS führt zu einem dysfunktionalen Enzym, das entweder durch einen gestörten Elektronentransfer zwischen Reduktase- und Oxygenasedomäne oder die Auftrennung der eNOS in ihre zwei Monomere verursacht wird, wodurch ebenfalls kein Elektronenfluss zustande kommt. Die eNOS-Monomere sind katalytisch inaktiv und können weder L-Arginin noch Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) binden (Ghosh et al. 1997).  $\text{BH}_4$  und Häm sind aber bei der NO-Produktion essentiell an der Dimerisierung beteiligt und werden für den Elektronentransfer benötigt (Andrew et al. 1999, Balligand et al. 2009)(Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mechanismus der eNOS-Aktivierung bzw. des eNOS-Uncoupling**

A) Unter normalen Bedingungen, coupled eNOS (aktiv), B) U.a. bei  $\text{BH}_4$ -Mangel, uncoupled eNOS (inaktiv).

A) Die NO-Synthese besteht aus zwei identischen Monomeren und produziert enzymatisch aus L-Arginin NO. In jedem Monomer bindet die amino-terminale Oxygenasedomäne eine prosthetische Häm-Gruppe, Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ), Sauerstoff und das Substrat L-Arginin. Eine Peptidsequenz mit einer Calmodulin-Bindungsstelle verbindet die Oxygenasedomäne mit der carboxy-terminalen Reduktasedomäne mit Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH. Diese Peptidsequenz kontrolliert den Elektronentransfer von der Reduktase zur entgegengesetzten Oxygenasedomäne über das Dimer. Es kommt zum schrittweisen Elektronentransfer ausgelöst durch NADPH-Bindung an die Reduktasedomäne. Elektronen werden von NADPH zu FAD und dann zu FMN transferiert. Die Elektronen werden auf das Häm der Oxygenasedomäne übertragen, sodass das Häm-gebundene Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zu Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reagiert, das Sauerstoff aktiv binden kann. In der Oxygenasedomäne wird L-Arginin zu L-Citrullin und NO oxidiert. Nur als Dimer ist die eNOS aktiv (Andrew et al. 1999, Balligand et al. 2009).

B) U.a. bei Mangel an  $\text{BH}_4$  ist der Elektronentransfer von der Reduktasedomäne zur Oxygenasedomäne gestört. Die eNOS wird von der L-Arginin Oxidation entkoppelt und produziert Superoxide anstelle von NO (Andrew et al. 1999, Balligand et al. 2009). Die Abbildung ist angelehnt an Forstermann et al. (Forstermann et al. 2012).

Es gibt eine Vielzahl von potentiellen Mechanismen, die zu einem Uncoupling der NOS führen. Die größte Evidenz besteht für einen BH<sub>4</sub>-Mangel als Mechanismus des Uncoupling (Bendall et al. 2005, Bevers et al. 2006). Durch BH<sub>4</sub>-Anlagerung an L-Arginin während der Dimerisierung mit Elektronenfluss zur Oxygenasedomäne wird die Produktion von Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) gehemmt (Forstermann 2010). Das Uncoupling der eNOS bewirkt, dass der Elektronentransfer zwischen den Häm-Gruppen innerhalb der eNOS gestört ist. Es kommt zu einer Bildung O<sub>2</sub><sup>-</sup> anstelle von NO und somit zu einer verminderten NO-Produktion und Dysregulation der Sauerstoffreduktion (Gharavi et al. 2006). Unter ansteigendem oxidativen oder nitrosativen Stress kommt es bei gleichzeitiger Produktion der Oxygenasedomäne von NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup> auch zur Bildung von Peroxynitrit.



**Abbildung 4: Bildung von Peroxynitrit**

Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>).

Peroxynitrit bewirkt einen weiteren dramatischen Anstieg von oxidativem Stress und fördert weiteres eNOS-Uncoupling (Cai et al. 2000, Werner et al. 2003, Pacher et al. 2007). Es wird vermutet, dass Peroxynitrit BH<sub>4</sub> zu dem katalytisch-mangelhaften BH<sub>2</sub> oxidieren kann und dies zu einem weiteren Uncoupling der eNOS mit Ungleichgewicht im BH<sub>4</sub>/BH<sub>2</sub>-Verhältnis führen kann (Laursen et al. 2001, Channon 2004). Landmesser et al. konnten zeigen, dass die NADPH-Oxidase eine Hauptquelle der Peroxynitrit-Entstehung darstellt (Landmesser et al. 2003). Als starkes Oxidanz schädigt Peroxynitrit die Proteinfunktion, vermittelt zelluläre Dysfunktion und induziert die Apoptose (Poderoso 2009).

Aber auch von der eNOS produzierte O<sub>2</sub><sup>-</sup> bewirken oxidativen Stress und endotheliale Dysfunktion, die mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Hypercholesterinämie, Atherosklerose, Hypertension, Diabetes und Herzversagen assoziiert sind (Cosentino et al. 1998, Cai et al. 2000, Ozaki et al. 2002). Bei Diabetes mellitus und nach einem Myokardinfarkt wurden Veränderungen des Dimer/Monomer-Verhältnisses der eNOS beobachtet (Cai et al. 2005, Taverne et al. 2012). Da sich über das Dimer/Monomer-Verhältnis Erkenntnisse über den Funktionszustand der eNOS ableiten lassen, wurde dieses Verhältnis in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen HUVEC-Passagen mittels Western Blot ermittelt. Allerdings können hierüber keine Aussagen über die Funktionstüchtigkeit des Enzyms d.h. über die bei Elektronenfluss innerhalb der eNOS erfolgte NO-Produktion, getätigt

werden. In weiterführenden Versuchen wurde daher die Aktivität der eNOS in HUVEC-Zellen durch Bestimmung der NO-Produktion verifiziert.

#### **1.4. Posttranskriptionale Modifikationen der eNOS**

Die endotheliale NOS kann posttranskriptional durch verschiedene Mechanismen wie z.B. Phosphorylierung, O-glykosidische Glykosylierung, S-Nitrosylierung, Lipid-Modifikation und direkte Protein-Protein Interaktion in ihrer Aktivität beeinflusst werden (Balligand et al. 2009). Es ist bekannt, dass die Regulation der eNOS-Aktivität u.a. über die Expression von Heat Shock Protein 90 (HSP90) und Caveolin-1 (CAV1) vermittelt werden kann (Fleming et al. 1999). HSP 90 fungiert als allosterischer Modulator, indem er das Enzym aktiviert (Garcia-Cardena et al. 1998) und die Dimerisierung der eNOS bewirkt (Pritchard et al. 2001, Song et al. 2002). Auch kann die in den Caveolae lokalisierte eNOS mit dem in der Plasmamembran der Caveolae vorkommenden CAV1, der ein Inhibitor der eNOS-Aktivität darstellt, interagieren (Drab et al. 2001). Auf transkriptionaler Ebene kann die eNOS ebenfalls reguliert werden, wobei allerdings die wichtigste Modifikation posttranskriptional durch Phosphorylierung erfolgt (Forstermann et al. 1998).

Durch posttranskriptionale Phosphorylierung der eNOS an Ser-1177 (Menschen)/-1179 (Rind) (Dimmeler et al. 1999, McCabe et al. 2000), Ser-635, Ser-617 (Michell et al. 2002) und Thr-83 (Fulton et al. 2005) ist eine Aktivitätserhöhung des Enzyms in der Literatur beschrieben. Eine Inhibition der eNOS-Aktivität wird durch eine Phosphorylierung an Ser-116, Thr-495 (Chen et al. 1999, Li et al. 2007) und Tyr 657 (Fisslthaler et al. 2008) verursacht.

Die Akt-(Proteinkinase B) abhängige aktivierende Phosphorylierung an Ser-1177 verursacht durch Scherstress, Östrogene, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Insulin oder Bradykinin aktiviert die eNOS und bewirkt eine 2-3-fache Erhöhung der NO-Produktion (Dimmeler et al. 1999, Fleming et al. 2003). Eine  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Bindung und Ser-1177 Phosphorylierung bewirken eine Aufhebung der Repression der NO-Synthese durch Verdrängung des carboxy-terminalen Endes mit Entsperrung der FMN-Bindungsdomain (Garcin et al. 2004). Dies fördert den Elektronentransfer zur Reduktasedomäne, bewirkt eine höhere Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber niedrigen Calciumkonzentrationen und stellt einen zusätzlichen Mechanismus der eNOS-Aktivierung dar (McCabe et al. 2000, Fleming et al. 2003) (Abbildung 3, A). Lin et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung der eNOS an Thr-495 als Mechanismus des eNOS-Uncoupling fungiert (Lin et al. 2003). Die Phosphorylierung an Thr-495 durch Proteinkinase C (PKC) und AMP-aktivierte Proteinkinasen (AMPK) verringert dabei die Bindung von Calmodulin an eNOS und erniedrigt auf diese Weise die Aktivität des Enzyms (Fleming et al. 2001) (Abbildung 3, A).

Da durch posttranskriptionale Phosphorylierung die Aktivität der eNOS modifiziert werden kann und dies einen entscheidenden Regulationsmechanismus darstellt, wurde in dieser Arbeit der Phosphorylierungsstatus der eNOS an Ser-1177 analysiert. HUVECS-Zellen sowohl von unterschiedlicher Passagen als auch nach Behandlung mit (-)-Epicatechin bzw. (-)-Epicatechin-Metaboliten wurden auf die Expression dieser aktivierenden Phosphorylierung an Ser-1177 untersucht. Das Ziel ist es Erkenntnisse über den Aktivitätszustand des eNOS in den unterschiedlichen Passagen sowie die Beeinflussung durch (-)-Epicatechin und seiner Metaboliten zu generieren.

### **1.5. Molekulare Wirkungsweisen von (-)-Epicatechin**

Die genauen Mechanismen wie Epicatechin die erhöhte NO-Bioverfügbarkeit bewirkt, die vermutlich mit der Vermittlung des positiven Effektes auf das kardiovaskuläre System verbunden ist, sind noch nicht vollständig geklärt. Durch Behandlung mit (-)-Epicatechin ist eine Anhebung des Steady-State Level von NO in vaskulären Endothelzellen beschrieben (Steffen et al. 2007). In der Literatur wird eine Unterteilung der (-)-Epicatechin-Wirkung in Kurz- und Langzeiteffekte vorgenommen (Schewe et al. 2008). Es wird davon ausgegangen, dass als kurzfristige Wirkung die Anhebung der NO-Level durch verminderte NO-Elimination in den Endothelzellen herbeigeführt wird. Ein Mechanismus könnte dabei sein, dass HUVEC-Zellen fähig sind (-)-Epicatechin zu seinem Metaboliten 3'-O-Methylepicatechin zu methylieren (Steffen et al. 2008), der als Inhibitor der prooxidativen NADPH-Oxidase wirkt (Steffen et al. 2007). Im Gefäßsystem ist die NADPH-Oxidase Hauptquelle für die Generierung von  $O_2^-$ , welche NO abfangen und zu Peroxynitrit reagieren kann (Herranz et al. 2012) (Abbildung 4). Durch Hemmung der NADPH-Oxidase kommt es somit zu einer ansteigenden NO-Bioverfügbarkeit ohne dass die Rate der NO-Synthese beeinflusst wird (Schewe et al. 2008). Als Langzeiteffekt bei andauernder (-)-Epicatechin-Exposition wird vermutlich eine erhöhte eNOS-Aktivität mit ansteigender NO-Produktion durch Veränderungen der Genexpression und Proteinexpression hervorgerufen (Schewe et al. 2008). Anter et al. konnten diesbezüglich eine Aktivierung der eNOS durch Polyphenole im schwarzen Tee zeigen (Anter et al. 2004).

Um weiterführende Erkenntnisse über die Beeinflussung der eNOS als mögliches Target von (-)-Epicatechin und seiner Metaboliten zu erlangen, wurden deren Effekte auf die eNOS-Expression auf Proteinniveau mittels Western Blot analysiert. Dabei besteht die zentrale Fragestellung darin, ob die mit dem kardioprotektiven Effekt assoziierte erhöhte NO-Bioverfügbarkeit durch (-)-Epicatechin und seine Metaboliten über die Erhöhung der eNOS-Expression vermittelt wird. Außerdem soll geklärt werden, ob diese Effekte (-)-Epicatechin und/oder seinen Metaboliten zu zuschreiben sind und welche Konzentrationen die größten Effekte zeigen.

## 1.6. Bedeutung der (-)-Epicatechin-Metaboliten

Um die protektive Wirkung von Flavanolen verstehen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung Erkenntnisse über das Vorkommen und die Wirkung der Metaboliten zu erlangen (Roura et al. 2005). Es wird vermutet, dass insbesondere die gebildeten Metaboliten das Blutsystem und die Zielorgane erreichen und sich ihre Wirkung von den in der Nahrung enthaltenen (-)-Epicatechin unterscheidet (Roura et al. 2005, Actis-Goretta et al. 2012). Die Identifizierung und Quantifizierung von zirkulierenden Metaboliten ist nötig, um ihre Rolle in der Vermittlung der biologischen Effekten, die mit dem Konsum von (-)-Epicatechin verbunden sind, differenzieren zu können (Actis-Goretta et al. 2012).

Durch intensive Metabolisierung von (-)-Epicatechin initial während des Transfers durch den Dünndarm und schließlich durch die Leber entstehen eine Vielfalt von Metaboliten und Konjugaten. Prozesse nach Absorption im Dünndarm sind dabei z.B. Deglykosylierung, Glucuronidierung sowie O-Methylierung (Day et al. 1998, Spencer et al. 1999, Kuhnle et al. 2000). Kim et al. berichteten, dass durch die intestinalen anaeroben Bakterien enzymatisch Glykoside zu ihren Aglykosiden metabolisiert werden können (Kim et al. 1996). Neben Veränderungen im Dünndarm kann auch die Metabolisierung im Darm zu umfassenden Modifikationen wie Hydrolyse, Oxidation und Ringspaltung zur Bildung von sekundären phenolischen Metaboliten führen (Rechner et al. 2004). Da (-)-Epicatechin leicht absorbiert wird und (-)-Epicatechin-Metaboliten schnell nach Verzehr von Kakao gebildet werden (Ottaviani et al. 2012), liegt (-)-Epicatechin fast ausschließlich in seiner metabolisierten Form im Blut vor (Schnorr et al. 2008). Während (-)-Epicatechin-Metaboliten nach Konsum von Flavanol-reichen Nahrungsmitteln in hohem nanomolaren bis niedrigeren mikromolaren Bereich im Plasma gefunden werden (Ottaviani et al. 2011), liegt die Konzentration von (-)-Epicatechin im niedrigen nanomolaren bis nicht-nachweisbarem Bereich (Roura et al. 2005, Ottaviani et al. 2012, Rodriguez-Mateos et al. 2012).

(-)-Epicatechin-Metaboliten sind in-vivo bioaktive Moleküle, wobei eine Korrelation zwischen den Metaboliten im Plasma und der endothel-abhängigen Vasodilatation bereits beobachtet werden konnte (Schroeter et al. 2006). Dabei ist bekannt, dass ein Großteil der zirkulierenden Bestandteil die im Blut gefunden werden, monomerische (-)-Epicatechin-Bestandteile sind, die methyliert, glukuronidiert oder sulfatiert sind (Schroeter et al. 2006, Ottaviani et al. 2011). In zahlreichen experimentellen Studien wurde die Entstehung von Metaboliten nach Konsum von Flavanol-haltigen Lebensmitteln untersucht. Nach Verzehr von (-)-Epicatechin bzw. (-)-Epicatechin-haltigen Nahrungsmitteln waren sowohl O-methylierte als auch glukuronidierte und sulfatierte Konjugate im Urin nachweisbar (Lee et al. 1995, Okushio et al. 1999, Roura et al. 2005). Im Plasma konnten nach

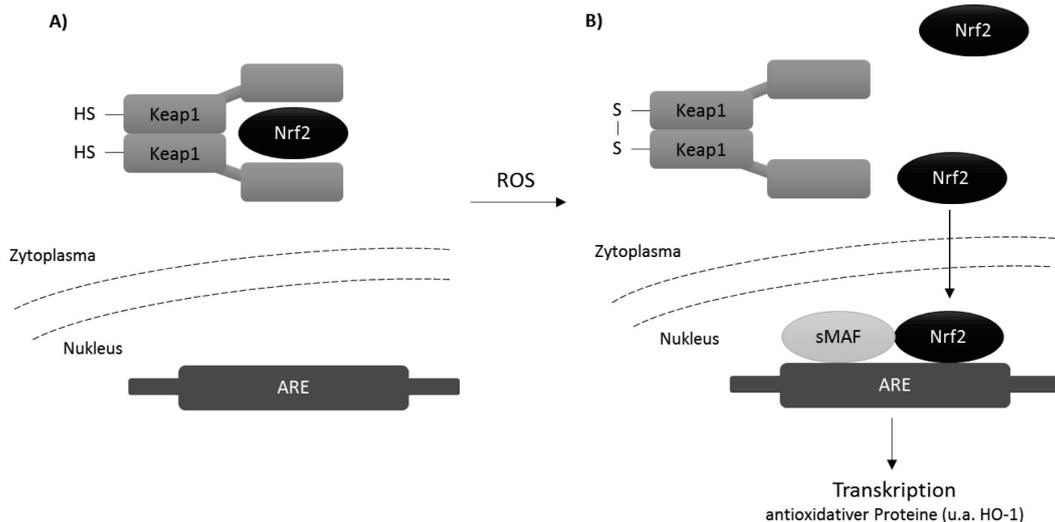
Aufnahme von (-)-Epicatechin-haltiger Lösung als Metaboliten insbesondere Glucuronide detektiert werden (Harada et al. 1999, Roura et al. 2005). Ansteigende 3-O-Methylcatechin-sulfate und glucuronidierte Metaboliten wurden nach Konsum von Catechin-reichem Rotwein im Plasma beobachtet (Donovan et al. 1999). Die relevantesten Metaboliten im Plasma stellen dabei vermutlich (-)-Epicatechin-3- $\beta$ -D-glucuronid, (-)-Epicatechin 3'-sulfat und O-methyl-Epicatechin-sulfat dar (Actis-Goretta et al. 2012, Ottaviani et al. 2012). Unterschiede in der Aktivität sind unter den Metaboliten auch bereits bekannt (Roura et al. 2005). Nanjo et al. berichteten, dass Modifikationen von (-)-Epicatechin einen Einfluss auf die Fähigkeit als Radikalfänger haben (Nanjo et al. 1996). Harada et al. wiesen bei (-)-Epicatechin-5-O- $\beta$ -glucuronid und (+)-Catechin-5-O- $\beta$ -glucuronid die Fähigkeit nach Radikale abzufangen, wohingegen die O-methylierten Metaboliten ein sehr geringes antioxidatives Potential besaßen (Harada et al. 1999). Spencer et al. konnten in kortikalen Nervenzellen und dermalen Fibroblasten zeigen, dass 3'-O-methyliertes (-)-Epicatechin im Gegensatz zu glucuronidiertem (-)-Epicatechin, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hervorgerufene Aktivierung von Caspase-3, verhindert (Spencer et al. 2001). In der Literatur ist beschrieben, dass die Glykosylierung die apoptotische Aktivität von Flavonoiden dämpft (Chen et al. 2003). Bei Beurteilung der Aktivität sind jedoch auch andere Nahrungsbestandteile wie z.B. Maltit oder Saccharose von Bedeutung, da diese eine Beeinflussung der Absorption von Flavanolen und der Menge an (-)-Epicatechin-Metaboliten bewirken können (Rodriguez-Mateos et al. 2012).

Die Effekte von (-)-Epicatechin bzw. den (-)-Epicatechin-Metaboliten Epicatechin-5-O- $\beta$ -D-glucuronide (3G), Epicatechin-5-sulfate (3S) und 3'-O-Methylepicatechin-4'-sulfate (5S) auf die Expression der eNOS sowie auf die Redoxproteinen HO-1, SOD, CAT, GPx und Enzymen der Glutathionsynthese (Glutamate cysteine ligase (GCLC, GCLM)) sind bislang nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Effekte analysiert, um zu klären, ob (-)-Epicatechin und/oder seinen Metaboliten eine Beeinflussung der eNOS bzw. des Redoxstatus zu zuschreiben ist und welche Konzentrationen die größten Effekte vermitteln. Ziel dabei ist es Hinweise über Signalwege der kardioprotektiven Wirkungsmechanismen dieser Substanzen zu erlangen und diese mit den Effekten unter oxidativem Stress (Starving) zu vergleichen.

### **1.7. Wirkungsweise des Transkriptionsfaktors Nrf-2**

Der nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf-2) ist ein Basic leucine zipper Transkriptionsfaktor, der ein unverzichtbarer Regulator der konstitutiven Antioxidant Responsive Element (ARE)-abhängige Genexpression verschiedener antioxidativer und Phase-II-Enzyme darstellt (Itoh et al. 1997, Nguyen et al. 2003). Hierdurch wird eine Aktivierung protektiver Proteine bewirkt, die fähig sind oxidativen Stress und oxidative Schädigung zu verhindern, zu deaktivieren und zu reparieren (Kaspar et al.

2009). Die transkriptionale Aktivität des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors Nrf-2 kann durch oxidative und elektrophile Moleküle, wie reaktiver Sauerstoff, Stickstoffspezies, Aldehyde und Metalle induziert werden (Buckley et al. 2008, Zhu et al. 2008, Baird et al. 2011) (Abbildung 5). Es ist denkbar, dass auch Flavanoide wie das (-)-Epicatechin Einfluss auf die Aktivität von Nrf-2 ausüben, indem sie beispielsweise die Interaktion zwischen Keap-1 und Nrf-2 modifizieren (Myhrstad et al. 2002). Der engverwandte Transkriptionsfaktor Nrf-1, der in verschiedenen Isoformen (p120, p95, p65) vorliegen kann, wirkt insbesondere in seiner kurzen Isoform (p65) als Inhibitor des Nrf-2/ARE-Signalwegs (Chepelev et al. 2013). Die Isoform p65 ist hierbei fähig mit Nrf-2 um die Interaktion mit kleinen MAF-Proteinen und Bindung an ARE zu konkurrieren und liegt reich im Zellkern vor (Wang et al. 2007) (Abbildung 5, B). Die 120 kDa Form existiert unter normalen Bedingungen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, wobei durch Inhibition des Proteasoms Nrf-1 in den Zellkern transloziert (Steffen et al. 2010). Eine verbesserte Empfindlichkeit zu Oxidantien mit reduziertem Glutathion-Level konnten Kwong et al. bei Nrf-1-Mangel beobachten (Kwong et al. 1999). Letztlich kann die Nrf-2-vermittelte Aktivierung von ARE-abhängigen Reportergenen durch Nrf-1 unterdrückt werden und scheint die Modulation und Feinabstimmung der oxidativen Stressantwort auf verschiedene physiologische Bedingungen darzustellen (Wang et al. 2007).



**Abbildung 5: Modell zur Regulation des Keap-1/Nrf-2-Signalwegs**

A) Unter normalen/unstimulierenden Bedingungen interagiert Nrf-2 mit dem zytosolischen Repressorprotein Keap-1 (Kelch ECH associating protein) und limitiert die Nrf-2 vermittelte Gen-Expression (Itoh et al. 1999). B) In Zellen, die oxidativem oder xenobiotischem Stress ausgesetzt sind, werden Cysteinreste von Keap-1 oxidiert oder kovalent modifiziert, sodass sich Nrf-2 aus der Bindung lösen kann und frei wird (Heiss et al. 2009). Nrf-2 kann in den Zellkern translozieren, wo Nrf-2 mit einem kleinen MAF-Protein (sMAF) heterodimerisiert und an die ARE-Region auf der DNA binden kann (Motohashi et al. 2004). Durch ARE-abhängige Transkription kommt es zur Aktivierung von Phase II- und antioxidative Enzyme, wie z.B. NAD(P)Hquinon Oxidoreduktase, Glutathion-S-Transferase, Glutathionperoxidase und Hämoxigenase I (Itoh et al. 1999, Ishii et al. 2000, Nguyen et al. 2003, Ishii et al. 2004, Kensler et al. 2007). Die Abbildung ist angelehnt an Bryan et al. (Bryan et al. 2013).

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Nrf-2 zu einer Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies, zu einer ansteigenden NO-Bioverfügbarkeit und zu einer vorübergehenden Verringerung des eNOS-Protein Levels in HUVEC-Zellen führt (Heiss et al. 2009). Der NO-Anstieg nach Nrf-2-Aktivierung ist dabei vermutlich durch die Reduktion von ROS begründet (Heiss et al. 2009). Es ist beschrieben, dass NO und Peroxynitrit eine Erhöhung der nukleären Akkumulation von Nrf-2 bewirken können (Itoh et al. 1999, Ishii et al. 2000, Nguyen et al. 2003, Ishii et al. 2004). Eine Aktivierung von Nrf-2 scheint zudem durch herabgesetzte BH<sub>4</sub>-Level hervorgerufen zu werden, wodurch das Risiko des eNOS Uncoupling reduziert und die vaskuläre Homöostase in redox-gestressten Zellen reguliert wird (Heiss et al. 2009). In kultivierten Nervenzellen konnte durch (-)-Epicatechin bereits eine Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf-2 gezeigt werden (Shah et al. 2010). Die Wirkung von (-)-Epicatechin auf Nrf-2 in Endothelzellen ist bisher kaum untersucht. Die Effekte von (-)-Epicatechin auf die Nrf-2- und Nrf-1-Proteinexpression sowie die Nrf-2 Translokation wurden in dieser Arbeit untersucht, um Erkenntnisse darüber zu generieren, ob die Erhöhung der Proteinexpression sowie die Induktion der Nrf-2-Translokation zelluläre Mechanismen darstellen könnten, mit denen (-)-Epicatechin Einfluss auf Transkriptionsfaktoren nimmt. Die Nrf-2-Bindung an ARE wurde ermittelt, um der Fragestellung nachzugehen, ob (-)-Epicatechin diese Bindung induzieren und damit Effekte auf Ebene der Genexpression antioxidativer Enzyme ausüben kann.

### **1.8. Beeinflussung von Redoxproteinen**

In den Zellen existieren eine Reihe von antioxidativen Schutzmechanismen, die vor oxidativer Schädigung schützen und zu denen die Enzyme Hämoxygenase-1 (HO-1), Superoxiddismutase (SOD), Catalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPx) gezählt werden (Forstermann 2008).

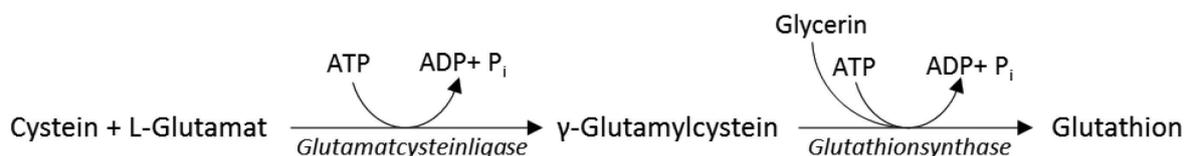
HO-1 katalysiert den ersten Schritt im Häm-Abbau, reduziert indirekt oxidativen Stress und schützt vor vaskulärem Remodeling sowie der Entstehung von Atherosklerose (Stocker et al. 2006). Der angenommene Mechanismus der Schutzwirkung von HO-1 beinhaltet den Abbau des prooxidativen Häm über Biliverdin zu dem potent antioxidativ-wirksamen Bilirubin (Wagener et al. 2003, Mancuso 2004, Angermayr et al. 2006). Die Wirkung von Biliverdin kann auch über eine direkte Inhibition der NADPH-Oxidase bewirkt werden (Jiang et al. 2006). Das zusätzlich bei der Häm-Spaltung entstehende Kohlenstoffmonoxid (CO) hat wie NO zudem antiproliferative, antiinflammatorische, antikoagulatorische und vasodilatatorische Eigenschaften (Morita 2005, Mann et al. 2007). Die Reaktion von Superoxid zu Sauerstoff und Hydrogenperoxid wird durch SOD vermittelt. Im kardiovaskulären System wird damit die Superoxid-Konzentration verringert und die vaskulären NO-Level erhalten (Jung et al. 2007). CAT vermittelt den Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser und Sauerstoff

und bewirkt somit die Reduktion von oxidativem Stress. Dabei ist bekannt, dass eine Überexpression der CAT protektive kardiovaskuläre Effekte ausübt, die sich klinisch in einer Hemmung der Angiotensin-II-induzierten Aortenwand-Hypertrophie (Zhang et al. 2005) und einer verzögerten Atherosklerose-Entstehung manifestieren (Yang et al. 2004). Die biochemische Funktion der GPx besteht in der Reduktion von Lipidhydroperoxid und von freiem Hydrogenperoxid. Bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen ist dabei die Aktivität der GPx in Erythrozyten umgekehrt mit dem Risiko von kardialen Ereignissen assoziiert (Blankenberg et al. 2003).

Da sich die (-)-Epicatechineffekte vermutlich auch auf eine Beeinflussung des Redoxstatus zurückführen lassen, wurden in der Arbeit der Fragestellung einer Modulation der antioxidativen Enzyme HO-1, SOD, CAT und GPx durch (-)-Epicatechin und/oder seiner Metaboliten nachgegangen. Ziel dabei ist es weiterführende Erkenntnisse zum Wirkmechanismus zu generieren und diese mit den Ergebnissen unter oxidativem Stress verursacht durch Starving zu vergleichen.

### 1.9. Bedeutung von Glutathion bei oxidativem Stress

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien und wird bei ansteigenden oxidativen Belastungen zu seiner Disulfid-Form (GSSG) oxidiert (Janssen-Heininger et al. 2013). Über die Oxidation von GSH, die das Abfangen von freien Radikalen und ROS ermöglicht, wird die antioxidative Aktivität von GSH vermittelt (Sies 1999). An der Synthese und dem Metabolismus von GSH sind mehrere Enzyme beteiligt, die den GSH-vermittelten antioxidativen Schutzmechanismus in Endothelzellen ermöglichen. Die Glutamacysteinligase (GCL) und GSH-Synthetase vermitteln die De-novo-Synthese von GSH (Sies 1993, Sies 1999), wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Synthese durch die GCL katalysiert wird, die aus einer katalytischer (GCLC) und regulatorischer Untereinheit (GCLM) besteht (Franklin et al. 2009).

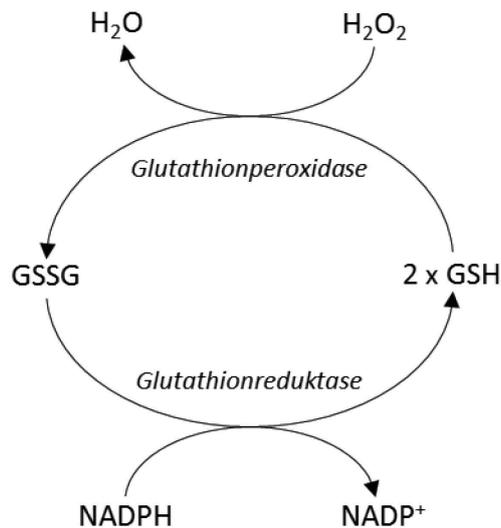


**Abbildung 6: Synthese von Glutathion (GSH)**

Cystein und L-Glutamat werden von der Glutamacysteinligase (GCL) unter ATP-Verbrauch zu  $\gamma$ -Glutamylcystein metabolisiert.  $\gamma$ -Glutamylcystein und Glycerin werden unter ATP-Verbrauch durch die Gluthathionsynthase zu Glutathion synthetisiert.

Die Glutathionperoxidase (GPx), die Glutathionreduktase und die Glutathion-S-Transferase können Glutathion (GSH) unter Verwendung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und NADPH metabolisieren (Sies 1993, Sies 1999). Das Glutathion kann dabei mittels GPx zu seiner Disulfid-Form (GSSG) oxidiert werden, wobei die

Glutathionreduktase das oxidierte GSSG unter Verbrauch von NADPH wieder zu GSH reduzieren kann (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Oxidation und Reduktion von Glutathion (GSH)**

Die Glutathionperoxidase reduziert Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu Wasser ( $H_2O$ ), wobei Glutathion (GSH) zu seiner Disulfid-Form (GSSG) oxidiert wird. Die Glutathionreduktase kann das oxidierte GSSG unter Verbrauch von NADPH wieder zu GSH reduzieren.

Der Umfang der Oxidation von GSH wird oft als ein Maß für oxidativen Stress verwendet und kann deutlich variieren (Janssen-Heininger et al. 2013). Während das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion im Zytosol 100:1 beträgt, liegt das Verhältnis GSH/GSSG im oxidativ geprägten endoplasmatischen Retikulum bei 3:1 (Bulleid et al. 2011). Wang et al. konnte zeigen, dass das GSH-System protektiv gegen die LDL-vermittelte Beschädigung von Makrophagen wirkt (Wang et al. 2006). Dem redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf-2 kommt eine entscheidende Bedeutung in der Regulation des GSH-Systems zu (Zhu et al. 2008). Bisher ist eine Beeinflussung von Glutathion durch (-)-Epicatechin und/oder seiner Metaboliten nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, ob (-)-Epicatechin und/oder seine Metaboliten durch Modulation der geschwindigkeitsbestimmenden Glutamatcyteinligase (GCLC, GCLM) Effekte vermitteln und, ob oxidativer Stress hervorgerufen durch Starving die Wirkung verändert. Hiermit soll weiter ergründet werden, ob die antioxidative Effekte von (-)-Epicatechin und/oder seiner Metaboliten auch auf der Beeinflussung von Glutathion beruhen.

**1.10. Ziel der Arbeit**

Die Mechanismen, die zu einer Senkung der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen durch den Konsum Flavanol-haltiger Lebensmittel (Kakao, grüner Tee, Rotwein u.a) führen, sind nicht

vollständig entschlüsselt. Es wird vermutete, dass mögliche Mechanismen zum einen eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit durch Beeinflussung der eNOS und zum anderen die Modulation des Redoxstatus der Endothelzellen beinhalten können. Das im Kakao reichlich vorhandene Flavanol (-)-Epicatechin scheint bei der Effektvermittlung eine entscheidende Bedeutung einzunehmen. Die Signalwege über die (-)-Epicatechin die eNOS-Aktivierung in Endothelzellen bewirken kann, sind nicht in vollem Umfang aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass das von der eNOS produzierte NO ein wichtiger Regulator des Gefäßtonus und des Blutdrucks darstellt, der zudem viele antiatherogene Funktionen vermittelt. Eine mögliche Beeinflussung des Redoxstatus durch (-)-Epicatechin ist ebenfalls nicht umfassend erforscht. Hierbei wäre denkbar, dass (-)-Epicatechin oder seine entstehenden Metaboliten Einfluss auf den Transkriptionsfaktor Nrf-2 ausüben. Als Regulator des zellulären Redoxstatus bewirkt Nrf-2 die Modulation und Kontrolle der Expression antioxidativer Enzyme. Die Veränderung des oxidativen Status durch Beeinflussung von Redoxproteinen stellt einen weiteren Aspekt der Untersuchungen dar.

Die Effekte von (-)-Epicatechin und seiner Metaboliten auf endotheliale HUVEC-Zellen werden in der vorliegenden Arbeit thematisiert. Dabei bezieht sich eine zentrale Fragestellung darauf, ob durch diese Substanzen in-vitro Effekte auf die eNOS ausgeübt werden. Es sollen Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob und wie (-)-Epicatechin und seine Metaboliten Einfluss auf den Transkriptionsfaktor Nrf-2 nehmen. Zudem sollen die Effekte auf antioxidative Enzyme und auf das Glutathion-System durch (-)-Epicatechin und seine Metaboliten analysiert werden. Die Experimente sollen dabei auch ergründen, ob eine Serumverarmung (Starving) die (-)-Epicatechin- bzw. Metaboliten-Wirkung verändert. Um diese Zusammenhänge zu verstehen, wurden Western Blots nach (-)-Epicatechin- bzw. Metaboliten-Behandlung hinsichtlich der eNOS- und pSer-1177-eNOS-Expression analysiert. Außerdem wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Nrf-2 bei (-)-Epicatechin-behandelten Proben im Western Blot untersucht. Mittels Konfokalmikroskopie wurde die Translokation von Nrf-2 nach (-)-Epicatechin-Behandlung sichtbar gemacht, um Erkenntnisse über eine mögliche Beeinflussung durch (-)-Epicatechin zu generieren. Weiterführend wurden die Bindung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 an ARE analysiert, um Aussagen über eine mögliche Modulation durch (-)-Epicatechin zu gewinnen. Da auch Effekte von (-)-Epicatechin bzw. seiner Metaboliten auf den Redoxstatus angenommen werden, wurden Western Blots auf die Expression verschiedener Redoxproteine (HO-1, SOD, CAT, GPx) untersucht. Auch die Beeinflussung von Glutathion als wichtiges Antioxidanz wurde hinsichtlich der Effekte von (-)-Epicatechin auf die Glutathionsynthese sowie das Glutathionlevel ergründet. Die Experimente wurden dabei auch mit den (-)-Epicatechin- und Metaboliten-Effekten unter Starving verglichen.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 1: Chemikalien**

| Produktname   | Hersteller         | Hauptsitz               |
|---|--------------------|-------------------------|
| Aqua ad iniectabilia  | DeltaSelect        | München, Deutschland    |
| Aqua dest.  | Millipore          | Darmstadt, Deutschland  |
| Bicine  | Sigma              | St. Louis, USA          |
| Bis-Tris  | Sigma              | St. Louis, USA          |
| Bovine serum albumin (BSA)  | Sigma              | St. Louis, USA          |
| DAF-FM DA (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, authentic standard, HPLC-grade) | Sigma              | St. Louis, USA          |
| Dako Fluorescent Mounting Medium  | Dako               | Glostrup, Dänemark      |
| Desoxycholic sodium salt  | Sigma (Fluka)      | St. Louis, USA          |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | Sigma              | St. Louis, USA          |
| DMEM low Glukose  | Lonza              | Basel, Schweiz          |
| DMEM stable Glutamine   | PromoCell          | Heidelberg, Deutschland |
| EDTA (Ethyldiaminetetraessigsäure)  | Roth               | Karlsruhe, Deutschland  |
| Endothelial Cell Basal Medium, phenol red-free  | PromoCell          | Heidelberg, Deutschland |
| Endothelial Cell Growth Medium  | PromoCell          | Heidelberg, Deutschland |
| (-)-Epicatechin   | Sigma              | St. Louis, USA          |
| Ethanol   | Merck              | New, York, USA          |
| FBS (Fetal bovine serum)  | Lonza              | Basel, Schweiz          |
| Fibronektin   | Biochrom           | Berlin, Deutschland     |
| GSH (L-Glutathion, reduziert)   | Sigma              | St. Louis, USA          |
| Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)                                  | PAA                | Pasching, Österreich    |
| Hoechst   | Sigma              | St. Louis, USA          |
| HUVEC Zellen  | PromoCell          | Heidelberg, Deutschland |
| Isopropanol (2-Propanol)  | Merck              | New York, USA           |
| L-Alanyl-glutamine 100x (GlutaMax)  | Gibco Laboratories | Eggenstein, Deutschland |
| L-NAME (N-(G)-nitro-L-arginine methyl ester)  | Sigma              | St. Louis, USA          |
| MagicMark™ XP Western Protein Standard  | Invitrogen         | Carlsbad, USA           |
| Mercaptoethanol   | Sigma              | St. Louis, USA          |
| Methanol  | Merck              | New York, USA           |
| Milchpulver, Blotting grade   | Roth               | Karlsruhe, Deutschland  |
| Natriumchlorid (NaCl)   | Roth               | Karlsruhe, Deutschland  |
| Neutralrot  | Sigma              | St. Louis, USA          |
| Non Essential Amino Acids   | PAA                | Pasching, Österreich    |
| Nonidet P40 Substitute  | Sigma (Fluka)      | St. Louis, USA          |
| NuPage® Antioxidant   | Invitrogen         | Carlsbad, USA           |
| NuPage® LDS Sample Buffer   | Invitrogen         | Carlsbad, USA           |
| NuPage® MES Running Buffer  | Invitrogen         | Carlsbad, USA           |
| NuPage® Novex 10% Bis-Tris Mini Gel   | Invitrogen         | Carlsbad, USA           |
| NuPAGE® Novex 3-8% Tris-Acetate Mini Gel  | Invitrogen         | Carlsbad, USA           |
| NuPAGE® Novex 7% Tris-Acetate Mini Gel  | Invitrogen         | Carlsbad, USA           |

| Produktname  | Hersteller        | Hauptsitz               |
|--|-------------------|-------------------------|
| NuPage® Reducing Agent                               | Invitrogen        | Carlsbad, USA           |
| NuPage® Transfer Buffer                              | Invitrogen        | Carlsbad, USA           |
| NuPage® Tris-Acetate SDS Running Buffer              | Invitrogen        | Carlsbad, USA           |
| NuPage®MOPS SDS Running Buffer                       | Invitrogen        | Carlsbad, USA           |
| PBS (phosphate buffered saline)                      | PAA               | Pasching, Österreich    |
| Penicillin-Streptomycin                              | PAA               | Pasching, Österreich    |
| Ponceau S solution                                   | Roth              | Karlsruhe, Deutschland  |
| Protease-Phosphatase Inhibitor Cocktail              | Thermo Scientific | Waltham, USA            |
| Salzsäure (HCl)                                      | Fisher Scientific | Waltham, USA            |
| SDS (Dodecylsulfat*NaCl)                             | Roth              | Karlsruhe, Deutschland  |
| Sodium Pyruvat Solution                              | PAA               | Pasching, Österreich    |
| Sulfosalicylic acid hydrate (SSA)                    | Sigma             | St. Louis, USA          |
| Supplement Mix/Endothelial Cell Growth Medium        | PromoCell         | Heidelberg, Deutschland |
| Supplement Pack/Endothelial Cell Growth Medium (prf) | PromoCell         | Heidelberg, Deutschland |
| Tert-Butylhydrochinone (TBHQ)                        | Sigma             | St. Louis, USA          |
| Tricloressigsäure                                    | Merck             | Darmstadt, Deutschland  |
| Trishydrochlorid                                     | Roth              | Karlsruhe, Deutschland  |
| Trishydroxymethylenaminomethan (Tris Base)           | Merck             | New York, USA           |
| TritonX100   | Sigma             | St. Louis, USA          |
| Trypsin  | PAA               | Pasching, Österreich    |
| Tween 20   | Sigma             | St. Louis, USA          |
| Wasserstoffperoxid-Lösung 30% in H <sub>2</sub> O    | Sigma             | St. Louis, USA          |

**Tabelle 2: Verwendete Kits**

| Produktname  | Hersteller        | Hauptsitz            |
|--|-------------------|----------------------|
| DC Protein Assay Kits                                | Bio-Rad           | München, Deutschland |
| DetectX Fluorescent Detection Kit                    | ArborAssays       | Michigan, USA        |
| Nuclear Extract Kit                                  | Active Motif      | Carlsbad, USA        |
| Peroxid Assay  | Thermo Scientific | Waltham, USA         |
| PeroXOquant Qualitative Peroxide Assay Kit           | Thermo Scientific | Waltham, USA         |
| Super Signal® West Phemto Chemiluminescent Substrate | Piece             | Bonn, Deutschland    |
| Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate   | Piece             | Bonn, Deutschland    |
| TransAM Nrf-2  | Active Motif      | Carlsbad, USA        |

**Tabelle 3: Geräte**

| Produktname                              | Hersteller           | Hauptsitz                        |
|--|----------------------|----------------------------------|
| Centrifuge Mikro 200 R                   | Hettich              | Tuttlingen, Deutschland          |
| Centrifuge Rotina 38R                    | Hettich              | Tuttlingen, Deutschland          |
| Deckgläschen, Ø 22mm                     | Roth                 | Karlsruhe, Deutschland           |
| FLUASTAR Omega                           | BMG Labtech          | Ortenberg, Deutschland           |
| LSM 510 Confocal Laserscanning Mikroskop | Zeiss                | Oberkochen, Deutschland          |
| Mikroskop DM IL                          | Leica                | Wetzlar, Deutschland             |
| MS1 Minishaker                           | IKA                  | Staufen, Deutschland             |
| NuPage® Elektrophorese System            | Invitrogen           | Carlsbad, USA                    |
| Petrischalen, sterile Materialien        | Greiner Labortechnik | Frickenhausen, Deutschland       |
| Polymax 1040                             | Heidolph Instruments | Schwabach, Deutschland           |
| CP-225D-OCE                              | Sartorius            | Elk Grove, USA                   |
| Sonorex                                  | Brandelin            | Berlin-Lichterfelde, Deutschland |
| Thermo mixer 5436                        | Eppendorf            | Hamburg, Deutschland             |
| Vortex                                   | VWR International    | Radnor, USA                      |
| Xcell IITM Blot Module Kit               | Invitrogen           | Carlsbad, USA                    |
| XCell SureLock Tm                        | Invitrogen           | Carlsbad, USA                    |

**Tabelle 4: Software**

| Produktname                               | Hersteller     | Hauptsitz              |
|---|----------------|------------------------|
| Graph Pad Prism 5                         | AD Instruments | Dunedin, Neuseeland    |
| Image J                                   | Open source    | n.a.                   |
| Microsoft Office                          | Microsoft      | Albuquerque, USA       |
| OMEGA controll                            | BMG Labtech    | Ortenberg, Deutschland |
| OMEGA DataAnalysis (Software Platereader) | BMG Labtech    | Ortenberg, Deutschland |

**Ripa-Puffer**

Eine 10% SDS-Stammlösung wurde aus SDS ultra pure und 0,9% NaCl-Lösung hergestellt. In 50 ml PBS-Lösung wurden 1 ml 10% SDS-Stammlösung, 1 ml Nonidet P40 Substitute und 0,5 g S Deoxycholate hinzugefügt und mittels PBS-Lösung auf insgesamt 100 ml aufgefüllt.

## **2.1. Zellkultur und experimentelle Methoden**

### **2.1.1. Medium und Zusätze für Zellkulturen**

Das Endothelial Cell Growth Medium (später genannt: Endothelial Cell Growth Medium complete) wurde durch Zugabe von Supplement Mix Endothelial Cell Growth Medium sowie 5 ml Penicillin/Streptomycin hergestellt. Das Endothelial Cell Basal Medium, phenol red-free (später genannt: phenolrot-freies Medium mit inaktiviertem Serum) enthält den Supplement Mix Endothelial Cell Growth Medium sowie das bei 60°C für 30 Minuten inaktivierte FCS. Das DMEM low Glukose Medium wurde zum Starving (Serumverarmung) von HUVEC-Zellen verwendet. Das DMEM stable Glutamine Medium (später genannt: 10% FCS DMEM) wurde ausschließlich für Waschschrte verwendet und durch Zugabe von 50 ml FCS sowie 5 ml Penicillin/Streptomycin hergestellt.

### **2.1.2. Kultivierung der HUVEC-Zellkultur**

Für die Experimente wurden HUVEC-Zellkulturen bis Passage 5 verwendet. Die Petrischalen wurden vor Kultivierung mit Fibronektin (Endkonzentration: 15 µg/ml, 150 µg Fibronektin in 10 ml PBS) beschichtet. Die Zellen wurden durch eine Behandlung mit Trypsin (0,05% Trypsin/0,02% EDTA in isotonischer 0,9% NaCl) mit 2 ml Trypsin/Petrischale für 3 Minuten bei 37°C im Brutschrank losgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml 10% FCS DMEM gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 300 g (Rotina 38R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 10 Minuten und eine anschließende Resuspension in 1 ml Endothelial Growth Medium complete. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Kammer (0,0025 mm 2 x 0,1 mm Tiefe: Brand, Wertheim, Deutschland) mit einem Mikroskop (Leica DM IL, Wetzlar, Deutschland) bestimmt und in die Kulturschalen eingebracht. Die eingebrachte Zellzahl und die Art des verwendeten Kulturgefäßes sind in den einzelnen Beschreibungen der Experimente aufgeführt.

### **2.1.3. Herstellung eines Zellpellets**

Die Zellen wurden zum Loslösen mit Trypsin (0,05% Trypsin/0,02% EDTA in isotonischer 0,9% NaCl) mit 2 ml Trypsin/Petrischale für 3 Minuten bei 37°C im Brutschrank behandelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml 10% FCS DMEM gestoppt. Die Zellen wurden bei 4 °C mit 300 g (Rotina 38R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C mit 300 g (Mikro 200 R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 5 Minuten. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff bei -172°C eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.1.4. Bestimmung der Zellviabilität mittels Neutralrotfärbung**

Es wurden 24-well-Platten mit  $5 \times 10^4$  Zellen/well angelegt. Als Medium wurde phenolrot-freies Medium mit inaktiviertem Serum verwendet. Es erfolgte eine 24-stündige Kultivierung in Medium mit 0 -, 1 -, 10 - und 100  $\mu\text{M}$  (-)-Epicatechin. Anschließend erfolgte die Zugabe von Medium mit 0 -, 1 -, 10 -, 100 -, 200-, 600  $\mu\text{M}$  und 1 mM Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) für 24 Stunden. Die Zellen wurden für 60 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank mit Neutralrot Lösung (1:100 in 10% FCS DMEM) inkubiert. Es erfolgte das dreimalig Waschen mit PBS und anschließende Trocknen für 30 Minuten. Die Zellen wurden mit 0,05 M HCl in Isopropanol lysiert. 100  $\mu\text{l}$  Zelllysat/well wurden in eine 96-well-Platte überführt und bei einer Absorption von 540 nm im Microplate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen. Die Anzahl der lebenden Zellen ist in Prozent angegeben und errechnet gegen die unbehandelte Kontrolle.

#### **2.1.5. Bestimmung der eNOS-Aktivität mittels Diaminofluorescein (DAF-FM)**

Es wurden 96-well-Platten mit  $5 \times 10^4$  Zellen angelegt. Die Zellen wurden mit 100  $\mu\text{l}$  DAF-FM/well in 1 nM, 0,5 -, 5 -, 10 -, 20  $\mu\text{M}$  Konzentrationen für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit L-NAME ( $N^\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) 0 -, 50 -, 100 -, 500  $\mu\text{M}$  mit und ohne Zugabe eines Calcium-Ionophors (CaI 1  $\mu\text{M}$ ) behandelt und nach 0 Minuten, 30 Minuten und 2 Stunden bei einer Exzitation von 485 nm und Emission von 520 nm im Microplate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen. DAF-FM-DA diffundiert in die Zelle und wird von Esterasen hydrolysiert, wodurch DAF-FM entsteht, welches die Zellmembran nicht mehr passieren kann und intrazellulär akkumuliert. In der Anwesenheit von NO und Sauerstoff wird ein hoch-fluoreszierendes Triazol (DAF-FM-T) gebildet. Der genaue Mechanismus hierbei ist bisher noch unklar. Die ansteigende Fluoreszenz-Aktivität verglichen mit dem Background kann durch ein Fluoreszenz-Messgerät bestimmt werden (Cortese-Krott et al. 2012).

#### **2.1.6. Bestimmung der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion mittels Peroxid Assay**

Zur Bestimmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion wurde das PeroXOquant Qualitative Peroxide Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham USA) verwendet. HUVEC-Zellen wurden für 2 Stunden und 24 Stunden mit (-)-Epicatechin 1 -, 10 - und 100  $\mu\text{M}$  sowie 1  $\mu\text{M}$  TBHQ (Tert-Butylhydrochinone, Sigma, St. Louis, USA) behandelt. Das Working Reagent (WR) wurde aus 1 Teil Reagent A und 100 Teilen Reagent B hergestellt. Zur Bestimmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wurde eine Standardreihe mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von 10 -, 7,5 -, 5 -, 2,5 -, 1 -, 0,5 - und 0  $\mu\text{M}$  verwendet. Als Kontrolle wurde Endothel Cell Growth Medium mit den entsprechenden (-)-Epicatechin-Konzentrationen (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ) sowie 1  $\mu\text{M}$  TBHQ versetzt. In eine 96w-Platte wurden pro well je 20  $\mu\text{l}$  Standardreihe, Probe sowie behandeltes Kontrollmedium in Doppelbestimmung eingebracht und pro well je 200  $\mu\text{l}$

WR hinzugefügt. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stabilität nach Zugabe von WR wurde zuvor in einem Experiment bestimmt. Die 96w-Platten wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Die Absorption wurde bei 560 nm im Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Die Peroxid-Konzentration wurde anhand der Standardkurve mittels Linear regression fit based on Blank corrected-Werten errechnet.

## **2.2. Biochemische Methoden**

### **2.2.1. GSH-Bestimmung**

Für die GSH-Bestimmung wurde Zellpassage 3 und 4 verwendet. Die Zellen wurden 24 Stunden mit (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100 µM sowie TBHQ behandelt. Zur Herstellung eines Lysates wurden die Endothelzellen mit 150 µl eiskaltem HCl (0,01 M) mit einem Spatel losgelöst und im Ultraschallbad (Sonorex, Brandelin, Berlin-Lichterfelde, Deutschland) für 30 Sekunden sonifiziert. Es wurden Proben zur Proteinbestimmung entnommen. Das Proteinlysate wurde mit 20% 5-Sulfosalicylic acid (SSA, Sigma, St. Louis, USA) 1:4 verdünnt, gevortext und für 10 Minuten bei 4°C mit 13000 g zentrifugiert (Mikro 200 R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren und für die GSH-Bestimmung mit dem DetectX Fluorescent Detection Kit (Arbor Assays, Michigan, USA) nach der Versuchsanweisung verwendet. Das Kit verwendet ein nicht-fluoreszierendes Molekül, das kovalent an die freie Thiol-Gruppe von GSH bindet und somit ein hoch-fluoreszentes Molekül bildet. Zur Bestimmung der freien GSH-Konzentration wurde nach Zugabe von Thiostar Reagent und Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur die Fluoreszenz bei einer Emission von 520 nm und einer Exzitation von 355 nm in einem Plate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Die GSH-Konzentrationen der Proben wurden nach Korrektur der Verdünnung mit der Software des Plate Readers mittels 4-Parameter fit errechnet. Die Zugabe von Reaction Mixture wandelt alle GSSH in freies GSH um, sodass nach erneuter Inkubation von 15 Minuten die Fluoreszenz (Emission 520 nm, Exzitation 355 nm) der totalen GSH-Konzentration bestimmt werden kann. Das oxidierte Glutathion (GSSG) errechnet aus freiem GSH subtrahiert vom totalen GSH minus geteilt durch 2. Die Messwerte wurden proteinnormiert.

### **2.2.2. Proteinbestimmung mit DC Protein Assay**

Die Endothelzellen wurden mit PBS gewaschen und in jede Petrischale wurde auf einer 4°C kalten Eisenplatte 100 µl Ripa-Puffer (1% NP40, 0,5% Deoxycholate, 0,1 % SDS in PBS) mit 1% Protease/Phosphatase Inhibitor hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Spatel losgelöst und es erfolgte eine Behandlung für 30 Sekunden im Ultraschallbad (Sonorex von Brandelin, Berlin-Lichterfelde, Deutschland). Eine Zentrifugation (Mikro 200 R Zentrifuge von Hettich) bei 4°C für

10 Minuten bei 13000 g wurde anschließend durchgeführt. Der Zellüberstand wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die totale Proteinkonzentration wurde mit dem DC Protein Assay (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt. In eine 96-well-Platte wurden zusätzlich zur Standardreihe pro well je 5 µl des Proteinlysates pipettiert. In alle wells wurden 25 µl der vorbereiteten Lösung A und 200 µl der Lösung B hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde bei 740 nm im Microplate Reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der Standardreihe errechnet.

## 2.3. Western Blot

**Tabelle 5: Eingesetzte Antikörper**

| Antikörper-Kurzbezeichnung | Antikörper-Name  | ID#      | Hersteller                   |
|----------------------------|--|----------|------------------------------|
| α TUB                      | Anti-alpha Tubulin antibody (rabbit polyclonal)                    | 4074     | Abcam                        |
| CAT                        | Anti-Catalase antibody (rabbit, polyclonal)                        | 1877     | Abcam                        |
| eNOS                       | Polyclonal Rabbit Anti-eNOS/NOS Typ III                            | 610299   | BD Transduction Laboratories |
| GCLC                       | Anti-GCLC antibody (rabbit, polyclonal), katalytische Untereinheit | 80841    | Abcam                        |
| GCLM                       | Anti-GCLM antibody (rabbit, polyclonal)                            | 22754    | Santa Cruz                   |
| GPx                        | Anti-Glutathione Peroxidase 1 antibody (rabbit, polyclonal)        | 22604    | Abcam                        |
| HO-1                       | Anti-Heme Oxygenase 1 antibody (rabbit, polyclonal)                | 13243    | Abcam                        |
| LAM-1                      | Anti-Lamin A antibody [133A2] (mouse, monoclonal)                  | 8980     | Abcam                        |
| Nrf-1                      | Anti-Nrf-1 antibody (rabbit, polyclonal)                           | 33771    | Santa Cruz                   |
| Nrf-2                      | Anti-Nrf2 antibody [EP1808Y] (rabbit, monoclonal)                  | 62352    | Abcam                        |
| Nrf-2                      | Anti-Nrf-2 antibody (rabbit, polyclonal)                           | 13032    | Santa Cruz                   |
| PeNOS                      | Anti-Phospho-eNOS-Antibody (rabbit) (PSer-1177)                    | 9570L    | Cell Signaling               |
| SOD                        | Anti-Superoxide Dismutase 1 antibody                               | 13489    | Abcam                        |
| -                          | Fab Rabbit IgG (H&L) Antibody Peroxidase Conjugated                | 811-1302 | Rockland                     |
| -                          | Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG                               | A11012   | Invitrogen                   |

### 2.3.1. Low-temperature PAGE

Bei der Probenvorbereitung wurden HUVEC-Zelllysate nicht mit Sample reducing agent (SRA) versetzt. Als positive Kontrolle wurden mit SRA versetzte Lysate unbehandelter HUVEC-Zellen verwendet. Zelllysate mit je 30 µg Protein wurden elektrophoretisch in einem 3-8% TrisAcetat Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) bei 4°C für 3-4 Stunden bei 70 V aufgetrennt. Die Proteine wurden bei 30 V und Raumtemperatur für 1 Stunde auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Die verwendeten Antikörper (aufgeführt in Tab.) wurden in 0,1% Tween TBS Puffer mit 5% BSA verdünnt. Die Membran wurde als primärer Antikörper mit eNOS-Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. mit Anti-Phospho-eNOS-Antikörpern bei 4°C über Nacht angefärbt. Der sekundäre Antikörper

wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde lang inkubiert. Die immunreaktiven Banden wurden mittels Super Signal West Chemiluminescent System (Pierce, Bonn, Deutschland) nach Bedienungsanleitung detektiert und mittels der Software Image J ausgewertet.

### **2.3.2. Behandlung der Metaboliten mit/ohne Starving**

HUVEC-Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen/well auf 6-well-Platten kultiviert. In einem Versuchsansatz wurde ein Starving der Zellen für 30 Minuten in DMEM-Medium mit low Glukose durchgeführt. In dem anderen Versuchsansatz wurden die Zellen in gewöhnlichem Endothelial Cell Growth Medium complete kultiviert. Alle Zellen wurden für 24 Stunden mit (-)-Epicatechin bzw. den (-)-Epicatechin-Metaboliten (3S, 3G, 5S) behandelt.

### **2.3.3. (-)-Epicatechin und Metaboliten: eNOS, pNOS, HO-1, SOD, CAT, GPx, GCLM, GCLC**

HUVEC-Zelllysate mit je 30 µg Protein wurden elektrophoretisch in einem 3-8% TrisAcetat Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) bei Raumtemperatur für 1 Stunde bei 200 V aufgetrennt. Die Proteine wurden bei 30 V und Raumtemperatur für 1 Stunde auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Die verwendeten Antikörper (aufgeführt in Tab.) wurden in 0,1% Tween TBS Puffer mit 5% BSA verdünnt. Die Membran wurde als primärer Antikörper (eNOS, HO-1, SOD, CAT, GPx, GCLM, GCLC) für 1 Stunde bei Raumtemperatur bzw. mit Anti-Phospho-eNOS-Antikörpern bei 4°C über Nacht angefärbt. Der sekundäre Antikörper wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde lang inkubiert. Die immunreaktiven Banden wurden mittels Super Signal West Chemiluminescent System (Pierce, Bonn, Deutschland) nach Bedienungsanleitung detektiert und mittels der Software Image J ausgewertet.

### **2.3.4. Kernextraktion**

Es wurden HUVEC-Zellen der Passagen 3-5 verwendet. Die Kultivierung erfolgte auf 100 mm Petrischalen mit einer Zellzahl von  $8,8 \times 10^6$  Zellen in phenolrot-freiem Medium mit inaktiviertem Serum. Die Zellen wurden 2 Stunden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100 µM) sowie TBHQ 1 µM bei 37°C behandelt. Für die Kernextraktion wurde das Nuclear Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, USA) nach der Bedienungsanleitung verwendet. Die Zellen wurden in PBS/Phosphatase-Inhibitoren suspendiert und bei 500 rpm bei 4°C für 5 Minuten (Rotina 38R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Hypotonic Buffer resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 25 µl Detergent und vortexen bei 14000 g für 30 Sekunden bei 4°C zentrifugiert (Mikro 200 R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand (zytoplasmatische Fraktion) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das Kernpellet wurde in 50 µl Complete Lysis Buffer resuspendiert, für 10 Sekunden gevortext und auf Eis für 30 Minuten auf einem Plattenschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Nach erneutem 10-sekündigen vortexen erfolgte die Zentrifugation bei

14000 g für 10 Minuten bei 4°C (Mikro 200 R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand (Kernfraktion) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.3.5. Western Blot mit Kernextrakten**

Extrakte mit je 10 µg Protein wurden elektrophoretisch in einem 3 - 8% TrisAcetat Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) bei Raumtemperatur für 1 Stunde bei 200 V aufgetrennt. Die Proteine wurden bei 30 V und Raumtemperatur für 1 Stunde auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Die verwendeten Antikörper (aufgeführt in Tab.) wurden in 0,1% Tween TBS Puffer mit 5% BSA verdünnt. Die Membran wurde mit primären Antikörpern (Nrf-1, Nrf-2) für 1 Stunde bei Raumtemperatur angefärbt. Der sekundäre Antikörper wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde lang inkubiert. Als Kontrolle für die Kernfraktion wurde die Membran zudem mit Lamin A-Antikörpern angefärbt. Lamin A befindet sich im Zellkern und ist an der inneren Kernmembran verankert (Machiels et al. 1997). Die immunreaktiven Banden wurden mittels Super Signal West Chemiluminescent System (Pierce, Bonn, Deutschland) nach Bedienungsanleitung detektiert und mittels Image J ausgewertet.

## **2.4. Konfokalmikroskopie**

### **2.4.1. Nrf-2 Anfärbung und Bestimmung der Nrf-2-Translokation mittels Konfokalmikroskopie**

Die 6-well-Platten mit 22mm Ø-Deckgläschen wurden mit Fibronectin (Endkonzentration: 15 µg/ml, 150 µg Fibronectin in 10 ml PBS) beschichtet. HUVEC-Zellen ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/well) wurde für 24 Stunden mit 2,5 ml Endothelial Cell Growth Medium complete in den 6-well-Platten auf den Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 2 Stunden mit je 1,5 ml Endothelial Cell Growth medium complete sowie mit Medium mit verschiedenen (-)-Epicatechin-Konzentrationen (1 -, 10 -, 100 µM) sowie 100 µM TBHQ bei 37°C im Brutschrank behandelt. Die Zellen wurden mit PBS 2 x gewaschen und mit 2 ml 2% Para-Formaldehyde in PBS/well (pH 7,4) für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank fixiert. Nach 5 x Waschen mit 20 x TBS (Tris buffered saline (200 mM Tris, 2M HCL)) wurden eine Permeabilisierung durch 3 x Behandlung mit Triton-TBS (0,5% TritonX-100 in 1 x TBS) für 5 Minuten durchgeführt. Nach erneutem 3 x Waschen mit T-TBS für jeweils 5 Minuten erfolgte das Blocken durch Zugabe von 2 ml Blocking Buffer (5% BSA in T-TBS (0,1% Tween® in 1 x TBS))/well bei 4°C über Nacht. Es wurden 150 µl rabbit Anti-Nrf-2-Antikörper (#62352, Abcam, Cambridge, England) 1:100 verdünnt in Blocking Buffer (5% BSA/T-TBS) auf eine mit Parafilm-bespannte Eisenplatte aufgebracht und die Deckgläschen für 1 Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. In einer 6-well-Platte wurden die Deckgläschen 3 x für 10 Minuten in T-TBS gewaschen und mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper (Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, Carlsbad, USA) 1:500 verdünnt in Blocking Buffer 1 Stunde in der feuchten Kammer angefärbt. Die Deckgläschen wurden mit Hoechst (2,5 µg/ml) in T-TBS für 5 Minuten angefärbt. Nach

4 x Waschen mit T-TBS über 30 Minuten und 2 x Waschen mit TBS wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, Glostrup, Denmark) eingebettet. Die Präparate wurden unter dem Zeiss LSM 510 Confocal Laserscanning Mikroskop und einem Zeiss Plan Neofluar 63 x/1,3 oil DIC Objektiv analysiert. Um die Kernfärbung mit Hoechst anzuregen wurde ein UV Enterprise Laser benutzt. The Alexa 594 wurde mit einem HeNe 543 nm Laser unter Benutzung eines UV/488/543/633 nm Strahlenfilters bestimmt. Die Fluoreszenz wurde mit einem 540-630 nm Breitbandfilter aufgezeichnet. Die Fotos wurden unter fachkundiger technischer Unterstützung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Dr. Miriam Cortese-Krott (Kardiologisches Labor, Heinrich-Heine-Universität) durchgeführt.

## **2.5. Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1. Bestimmung der Nrf-2-Bindungsaktivität**

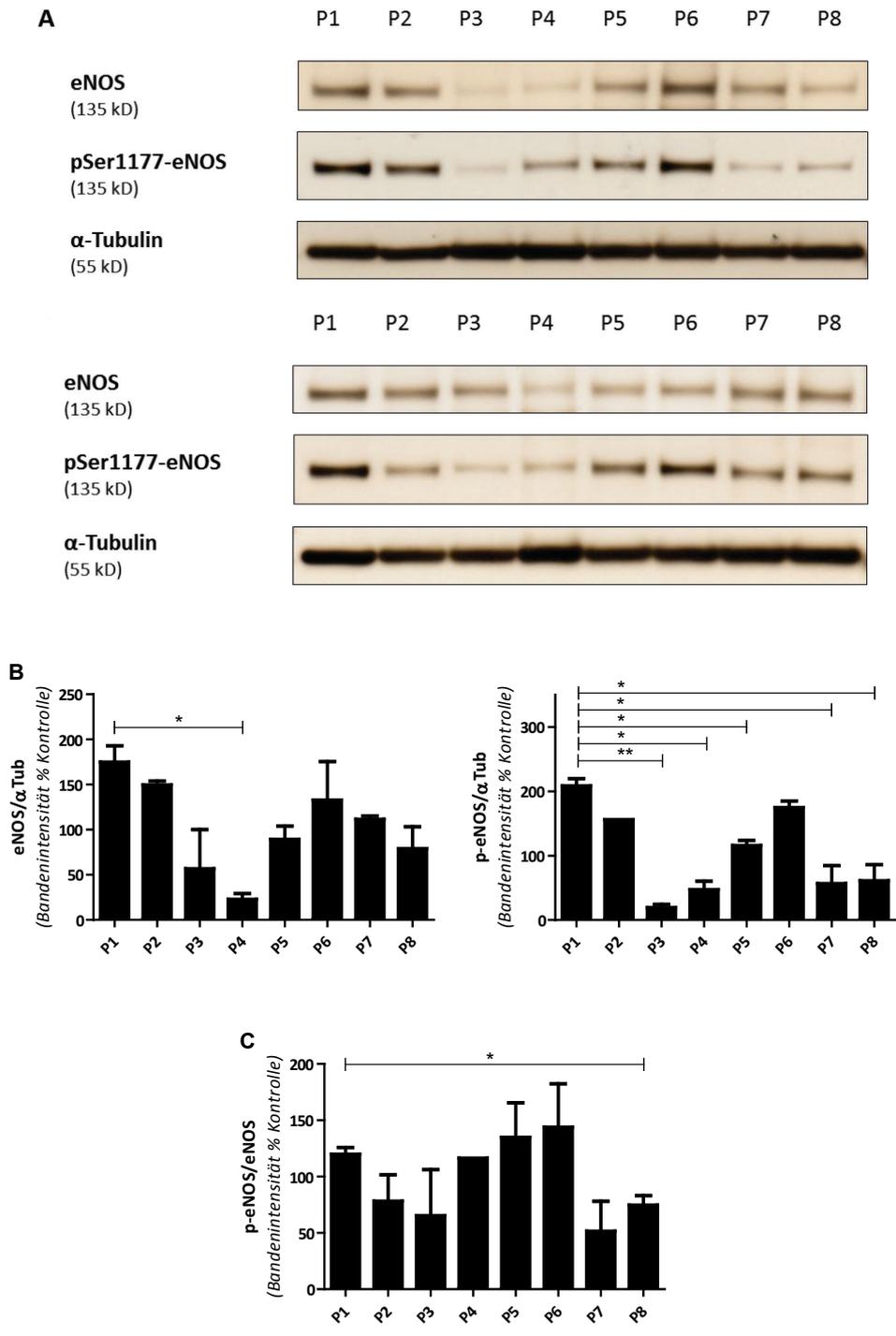
Hierzu wurden HUVEC-Zellen der Passagen 2-5 verwendet. Die Kultivierung erfolgte auf 100 mm Petrischalen mit einer Zellzahl von  $8,8 \times 10^6$  Zellen in phenolrot-freiem Medium mit inaktiviertem Serum. Die Zellen wurden 2 Stunden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu$ M) sowie TBHQ 1  $\mu$ M bei 37°C behandelt. Es wurde eine Kernextraktion mit den behandelten Zellen durchgeführt. Die Bindungsaktivität von Nrf-2 in der Kernfraktion wurde mittels ELISA-basiertem TransAM Nrf-2 Kit quantifiziert. Nrf-2 bindet spezifisch an Oligonukleotide, die die ARE-Sequenzen enthalten, und wird durch einen Antikörper gegen Nrf-2 detektiert. Der sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper und stellt ein Produkt bereit, welches mittels Spektrophotometrie quantifiziert werden kann. Für die Bestimmung der Nrf-2-Bindungsaktivität wurden ausschließlich die Kernfraktionen verwendet. Die Proben wurde mit einer Proteinkonzentration von 10  $\mu$ g/pro well verwendet und 1:10 in Complete Lysis Buffer (TransAM Kit, Active Motif, Calsbad, USA) verdünnt. Als Negativkontrolle wurden die Kernfraktionen der mit TBHQ behandelten Zellen verwendet. Nach Zugabe von Complete Binding Buffer (auch: TransAM Kit) wurde die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur bei 100 rpm auf einem Plattformschüttler (Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Die Behandlung mit dem primären Antikörper Nrf-2 (auch: TransAM Kit) erfolgte in einer Konzentration von 1:1000 für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der sekundäre HRP-konjugierte Antikörper (auch: TransAM Kit) wurde in der Konzentration von 1:1000 bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Zwischen den verschiedenen Schritten wurde jeweils 3 x Wash Buffer (auch: TransAM Kit) verwendet. Nach einer Inkubation von 2-15 Minuten mit Developing Solution (auch: TransAM Kit) und anschließender Zugabe der Stop Solution (auch: TransAM Kit) erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 450 nm mit einer Wellenlänge von 655 nm mittels Plate reader (FLUASTar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression der eNOS in verschiedenen Zellpassagen

Von HUVEC-Zellen der Passagen 1-8 wurden Western Blots bzw. Low-temperature PAGE durchgeführt, um anhand der eNOS-Expression Erkenntnisse über die Stabilität der eNOS zu erhalten. Diese Erkenntnisse sind unter der Annahme, dass die eNOS ein potenzielles Target von (-)-Epicatechin darstellt, entscheidend für die Analyse der (-)-Epicatechinwirkung. Die Entstehung von eNOS-Monomeren wurde durch Probedenaturierung, verursacht durch 10-minütige Erhitzung bei 70°C und Zugabe eines reduzierenden Agens induziert (Abbildung 8). Durch Verzicht eines reduzierenden Agens und fehlender Erhitzung kann in Low-temperature PAGE das Vorkommen der dimeren eNOS hervorgerufen werden (Abbildung 9). In den verschiedenen Zellpassagen wurde dabei auf Proteinniveau die Expression und Dimerisierung der eNOS sowie das Ausmaß der eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 in den beiden Untereinheiten untersucht. Sowohl die monomere als auch dimere eNOS wurden mit Anti-eNOS-Antikörpern und Anti-Phospho-eNOS-Antikörpern (pSer-1177) angefärbt, um Unterschiede in der Expression in den verschiedenen Passagen und zwischen den beiden Untereinheiten eruieren zu können. Das Ausmaß der aktivierenden Phosphorylierung an Ser-1177 ermöglicht Rückschlüsse über den potentiellen Aktivitätszustand der eNOS und über die damit verbundene NO-Produktion. Dies ist bedeutend, da eine erhöhte eNOS-Expression aufgrund des eNOS-Uncoupling nicht mit einer erhöhten NO-Bildung korreliert. Als Proteinladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin verwendet.

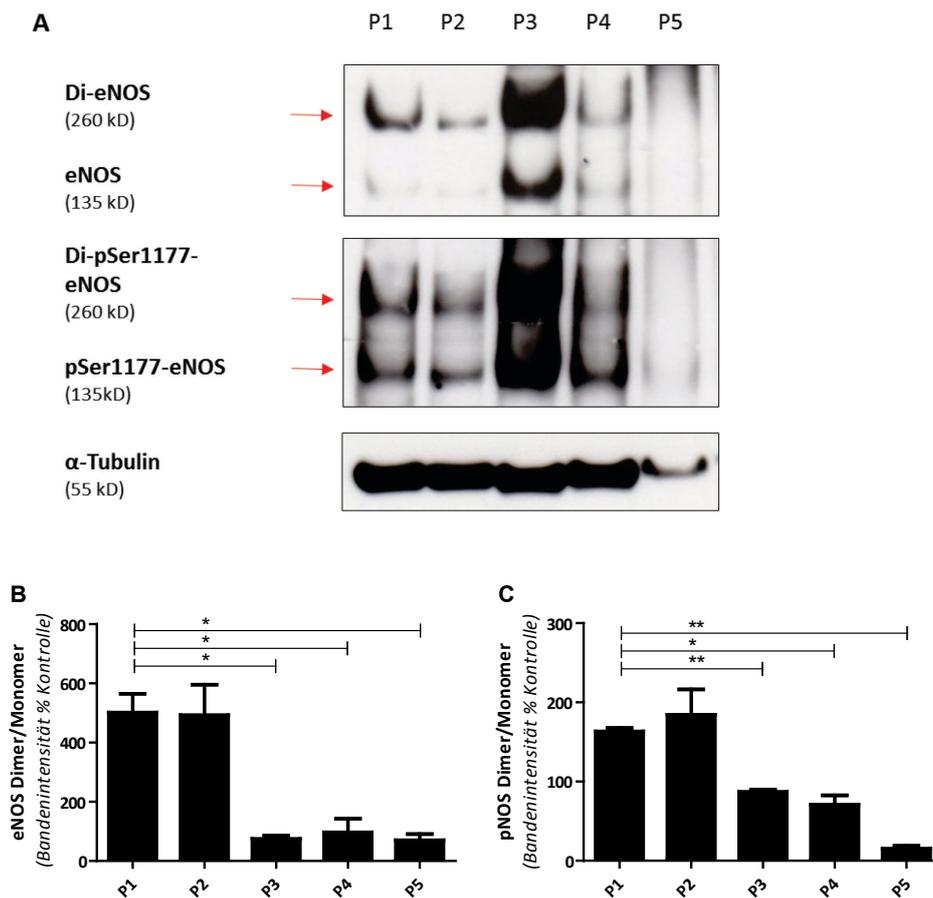
Die durchgeführten Western Blot-Analysen ergaben eine erhöhte eNOS-Expression in Passage 1, 2 und 6, wobei Passage 1 am stärksten, d.h. auf das 1,7-fache der Kontrolle, hochreguliert wird. Die Kontrolle ergibt sich dabei aus den Mittelwerten aller Passagen und liegt bei 100%. Die eNOS-Expression der Passagen 3 und 4 ist vermindert, insbesondere Passage 4 zeigt eine signifikante Runterregulation in Bezug auf Passage 1 auf knapp über 20% der Kontrolle. Die Passagen 5 und 7 befinden sich bezüglich der eNOS-Expression annähernd auf dem Niveau der Kontrolle. Bezüglich des eNOS-Phosphorylierungslevels an Ser-1177 ergibt sich, neben der Passage 2 und 6, insbesondere in Passage 1 eine Erhöhung auf das über 2-fache der Kontrolle. Eine Verminderung des Phosphorylierungslevels ist in den Passagen 3, 4, 7 und 8 feststellbar, mit der höchsten Erniedrigung in Passage 3. Die Passage 5 befindet sich bezüglich der Phosphorylierung erneut auf dem Niveau der Kontrolle. Ein erhöhtes Verhältnis von phosphorylierter zu unphosphorylierter eNOS ist insbesondere in Passage 1, 5 und 6 vorzufinden. Wohingegen dieses Verhältnis zwischen Passage 1 und 8 signifikant vermindert ist (Abbildung 8).



**Abbildung 8: eNOS-Expression als Marker für die Stabilität von HUVEC-Zellen**

Dargestellt sind Western Blots der Zellpassagen 1-8 (P1-P8) (10 Minuten auf 70°C erhitzt, mit SRA). Die Anfärbung der Membranen erfolgte mit Anti-eNOS Antikörper (1:1000) und Anti-Phospho-eNOS-Antikörpern (1:1000, 4°C über Nacht).  $\alpha$ -Tubulin wurde als Proteinladekontrolle verwendet (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des eNOS-Signals bzw. pSer-1177-eNOS-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) sowie des pSer-1177-eNOS-Signals zum eNOS-Signal (C) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. T-Test, P1 zu den anderen Passagen, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ .

In Low-temperature PAGE wurde durch Verzicht eines reduzierenden Agens und fehlender Erhitzung das Vorkommen der dimeren eNOS induziert. Densitometrische Analysen des Dimer/Monomer-Verhältnisses ergaben für die eNOS-Expression für Passage 1 und 2 eine deutliche Erhöhung auf das 5-fache der Kontrolle. Auch bezüglich des Phosphorylierungslevels zeigte sich in Passage 1 und 2 ein deutlich erhöhtes Dimer/Monomer-Verhältnis mit einer 1,6 - 1,8-fachen Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Die Passagen 3, 4 und 5 ergaben sowohl in Hinsicht auf das Dimer/Monomer-Verhältnis der eNOS als auch bei der Ser-1177-Phosphorylierung signifikant niedrigere Werte verglichen mit Passage 1 (Abbildung 9).



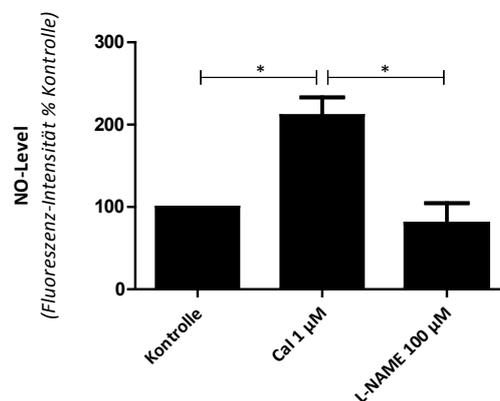
#### Abbildung 9: Dimer/Monomer-Verhältnis unterschiedlicher Passagen

Dargestellt sind Low-Temperature Western Blots der Zellpassagen 1-5 (P1-P5) (ohne Erhitzen, ohne SRA). Die Anfärbung der Membranen erfolgte mit Anti-eNOS Antikörper (1:1000) und Anti-Phospho-eNOS-Antikörpern (1:1000, 4°C über Nacht). α-Tubulin wurde als Proteinladekontrolle verwendet. eNOS und Di-eNOS bezeichnen die eNOS-Monomere und Homodimere (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des Di-eNOS bzw. eNOS-Signals und Di-pSer-1177-eNOS bzw. pSer-1177-eNOS-Signals zum α-Tubulin Signal durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. Die Kontrolle ergibt sich dabei aus den Mittelwerten aller Passagen und liegt bei 100%. Es erfolgte die quantitative Analyse des Dimer/Monomer Ratio von eNOS durch Bestimmung des Di-eNOS-Signals zum eNOS-Signal (B) sowie Di-pSer-1177-eNOS-Signals zum pSer-1177-eNOS-Signal (C). T-Test, P1 zu anderen Passagen, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ .

Zusammenfassend ergibt sich ein Bild mit Erhöhung der eNOS-Expression sowie des eNOS-Phosphorylierungslevels insbesondere bei HUVEC-Zellen mit niedrigen sowie höheren Passagierungen. Mit den durchgeführten Western Blot-Analysen von HUVEC-Zellen konnte eine Variabilität sowohl der eNOS-Expression als auch des Phosphorylierungslevels zwischen den Passagen 1-8 gezeigt werden (Abbildung 8). Das unterschiedliche Dimer/Monomer-Verhältnis zwischen den Passagen spiegelt ebenfalls das unterschiedliche Niveau der eNOS-Expression in den verschiedenen Passagen, mit vermehrtem Vorliegen der dimeren Form in Passage 1 und 2 wieder (Abbildung 9). Dies legt nahe, dass Änderungen in den Kulturbedingungen für die eNOS-Expression und -Aktivität von Bedeutung sind. In nachfolgenden Experimenten wurden diese Erkenntnisse genutzt, um die experimentellen Settings zur Untersuchung der (-)-Epicatechinwirkung zu definieren.

### 3.2. Stimulation und Inhibition der eNOS

Die Zellen wurden mit Diaminofluorescein (DAF-FM DA) vorbehandelt, um die eNOS-Aktivität in HUVEC-Zellen zu analysieren. Die Aktivität der eNOS kann dabei anhand der NO-Produktion mittels DAF-FM DA quantifiziert werden. Es wurden verschiedene Konzentrationen ausgewählt (DAF 1 nM, 0,5 -, 5 -, 10 -, 20  $\mu$ M), um die optimale DAF-Konzentration zu eruieren. In den Experimenten zeigten sich bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M DAF die größten Unterschiede, sodass diese Konzentration im Folgenden weiterverwendet wurde. Behandelt wurde mit dem NOS-Inhibitor L-NAME 50 -, 100 - und 500  $\mu$ M sowie mit einem stimulierenden Calcium-Ionophor, um eine Inhibier- sowie Stimulierbarkeit der eNOS zu zeigen.



**Abbildung 10: Bestimmung der NO-Level in HUVEC-Zellen mittels DAF**

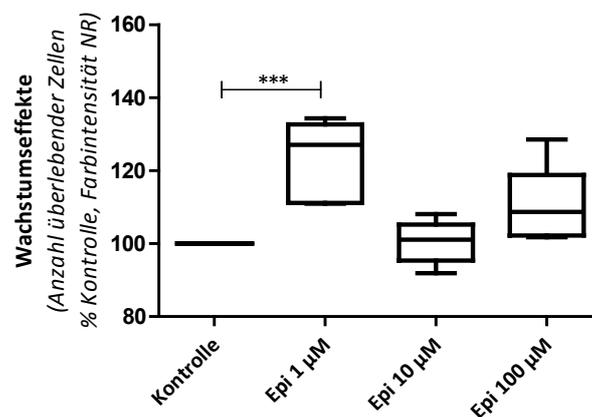
Die Zellen wurden 30 Minuten mit DAF-FM DA (1 nM, 0,5 -, 5 -, 10 -, 20  $\mu$ M) vorinkubiert und mit L-NAME (50 -, 100 -, 500  $\mu$ M) bzw. Calcium-Ionophore (Cal 1  $\mu$ M) behandelt. Die Fluoreszenz wurde bei Exzitation 485 nm und Emission 520 nm gemessen. Die Zellviabilität ist ausgedrückt als Prozent der lebenden Zellen gegen die mit  $H_2O_2$ -unbehandelten Zellen. Dargestellt ist die Fluoreszenz in % normiert auf das DAF-Signal. 1-way ANOVA, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ .

Durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  L-NAME zeigt sich eine Abnahme der Fluoreszenz um 20% im Vergleich zum DAF-Signal. Diese Abnahme der Fluoreszenz zeigt eine Inhibition der eNOS an. Die Behandlung mit L-NAME 50 - und 500  $\mu\text{M}$  zeigte hingegen keine signifikante Abnahme der Fluoreszenz. Nach Zugabe eines Calcium-Ionophors lässt sich eine signifikante Erhöhung des Fluoreszenz-Signals auf das 2-fache des DAF-Signals nachweisen, welches eine Stimulation der eNOS anzeigt (Abbildung 10).

Abschließend zeigen diese Ergebnisse, dass die eNOS in den analysierten HUVEC-Passagen aktiv ist und die vorhandene Aktivität durch Inhibitoren und Stimulatoren moduliert werden kann.

### 3.3. Protektive Effekte von (-)-Epicatechin auf die $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Zellschädigung

Endothelzellen wurden auf 24-w-Platten für 24 Stunden mit (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$  vorbehandelt, um mögliche schützende bzw. toxische Effekte von (-)-Epicatechin auf die Zellen untersuchen zu können. Die Behandlung mit aufsteigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (1 -, 10 -, 100 -, 200 -, 600 -, 1000  $\mu\text{M}$ ) wurde für 24 Stunden durchgeführt, um einen durch oxidativen Stress hervorgerufenen Zellschaden zu induzieren. Um die antioxidativen und proliferativen Effekte von (-)-Epicatechin charakterisieren zu können, wurde die Zellviabilität mittels Neutralrot (NR) bestimmt.



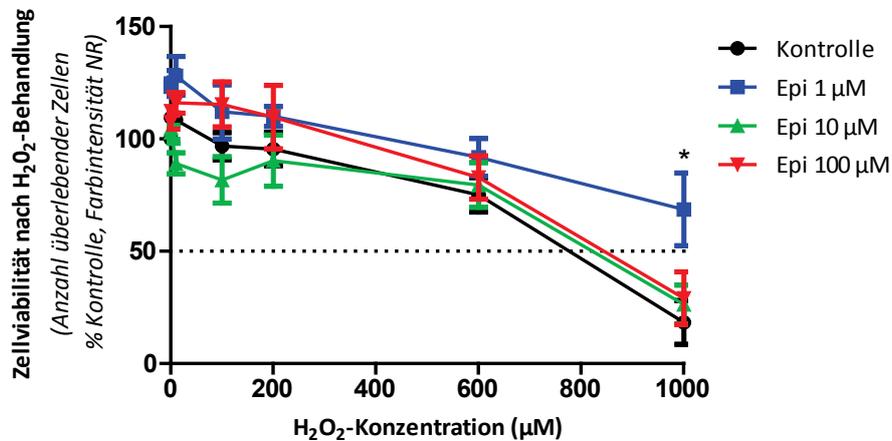
**Abbildung 11: Wachstumseffekte von (-)-Epicatechin**

Dargestellt ist die Anzahl überlebender Zellen in % nach 24-stündiger (-)-Epicatechin-Behandlung (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ). Die Zellzahlen wurden mittels Neutralrotfärbung bei 540 nm photometrisch bestimmt und sind in Prozent zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin-Vorbehandlung angegeben. 1way ANOVA, \*\*\*=  $p < 0,0001$ ,  $n=7$ .

Ohne Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigten sich bei (-)-Epicatechin-behandelten Zellen Effekte auf das Wachstum der Zellen. (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  zeigte dabei signifikante Wachstumseffekte mit einer Erhöhung der Zellzahl auf über 20% der Kontrolle, aber auch mit 100  $\mu\text{M}$  (-)-Epicatechin-behandelte Zellen wiesen erhöhte Zellzahlen auf (Abbildung 11).

In den Toxizitätskurven zeigte (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  einen Schutz gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Exposition, der sich in einem längeren Überleben der Zellen bei ansteigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen deutlich machte.

Bei unbehandelten Zellen zeigte sich eine toxische Wirkung beginnend bei 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mit einer halb maximalen letalen Dosis (LD<sub>50</sub>) von 800  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Durch Vorbehandlung der Zellen mit (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  konnte die Zellviabilität signifikant auf eine LD<sub>50</sub> von über 1000  $\mu\text{M}$  erhöht werden (Abbildung 12).



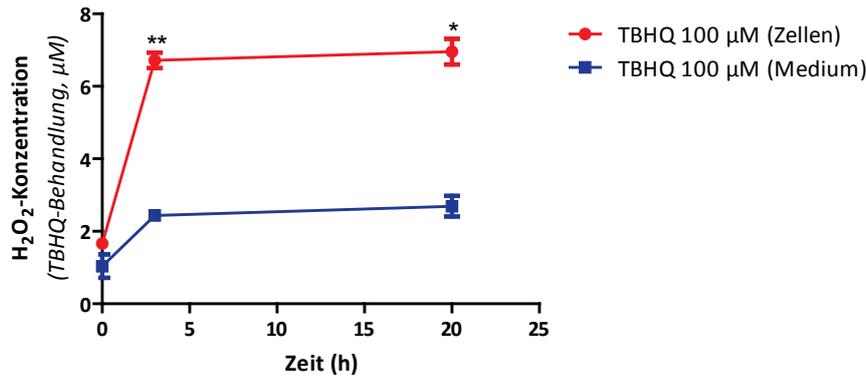
**Abbildung 12: Zellviabilität von (-)-Epicatechin-behandelten HUVEC-Zellen unter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einfluss**

Dargestellt sind Toxizitätskurven, bei denen die Zellviabilitäten von HUVEC-Zellen gegen aufsteigende  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen aufgetragen sind. Die Zellviabilitäten wurde nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung (24 h) mittels Neutralrotfärbung bei 540 nm bestimmt. Die Zellviabilität ist in Prozent zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin-Vorbehandlung angegeben. 1way ANOVA, \* =  $p < 0,05$ ,  $n=7$ .

Die Ergebnisse legen folglich nahe, dass (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  das Wachstum der Zellen anregt und eine schützende Wirkung gegen oxidativen Stress vermittelt.

### 3.4. Bestimmung der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion nach (-)-Epicatechin-Behandlung

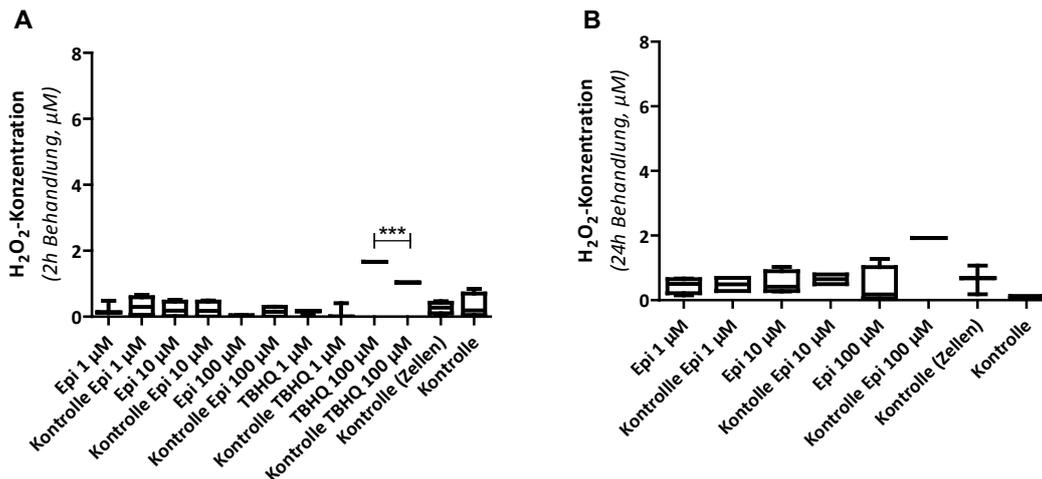
Das Experiment begründet sich aus den Beobachtungen von Halliwell et. al., welche zeigten, dass Epigallocatechin, Catechin, Quercetin und Epigallocatechingallate mit herkömmlichen Zellkulturmedien interagieren und so erhebliche Mengen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzieren können (Halliwell et al. 2000). Die Zellen wurden 2 bzw. 24 Stunden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ) bzw. tert-Butylhydrochinone (TBHQ) (1 -, 100  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Medium ohne Zellen wurde mit den entsprechenden (-)-Epicatechin bzw. TBHQ-Konzentrationen für die gleiche Inkubationszeit versetzt. Zum Nachweis einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion wurde TBHQ 100  $\mu\text{M}$  als Positivkontrolle verwendet. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion wurde im Medium mit und ohne Zellen verglichen, um eine mögliche unspezifische  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung zu untersuchen. Dabei sind Erkenntnisse über eine unspezifische  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung entscheidend, um antioxidative Effekte kontrollieren und von Effekten des (-)-Epicatechins differenzieren zu können.



**Abbildung 13: TBHQ erhöhte die unspezifische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion**

Dargestellt sind die photometrisch bestimmten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen nach 2-stündiger Behandlung mit 100 µM TBHQ im Medium mit und ohne Zellen nach 0, 3 und 20 Stunden. Die Absorption wurde im Photometer bei 560 nm bestimmt. Es wurden Linear regression fit based on Blank corrected-Werte verwendet. T-Test zwischen Behandlung und jeweiligen Kontrolle, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,005.

Bei Behandlung mit TBHQ ließen sich nach 3 und 20 Stunden im Medium mit Zellen signifikant erhöhte Mengen an produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zu Medium ohne Zellen nachweisen. Dabei waren die gemessenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen bis auf das 3-fache im Vergleich zur Kontrolle ohne Zellen erhöht. Die Mengen an produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigten sich bei den Messungen nach 3 und 20 Stunden auf einem konstanten Niveau (Abbildung 13).



**Abbildung 14: (-)-Epicatechin induziert keine unspezifische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion im Medium**

Dargestellt sind die photometrisch bestimmten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (µM) nach (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100 µM) bzw. TBHQ (1 -, 100 µM)-Behandlung mit und ohne Zellen. A) Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 2 Stunden Inkubation mit (-)-Epicatechin bzw. TBHQ, B) Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach 24 Stunden Inkubation mit (-)-Epicatechin bzw. TBHQ. Die Absorption wurde im Photometer bei 560 nm bestimmt. Es wurden Linear regression fit based on Blank corrected-Werte verwendet. T-Test zwischen Behandlung und jeweiligen Kontrolle, \*\*\* = p < 0,001, n=3.

Nach (-)-Epicatechin-Behandlung für 2 und 24 Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung zwischen Medium ohne Zellen und Medium mit Zellen festgestellt werden. Auch TBHQ 1 µM zeigte in Anwesenheit von Zellen keinen Effekt auf die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lediglich

TBHQ 100  $\mu\text{M}$  zeigte eine signifikante Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung im Medium mit Zellen (Abbildung 14).

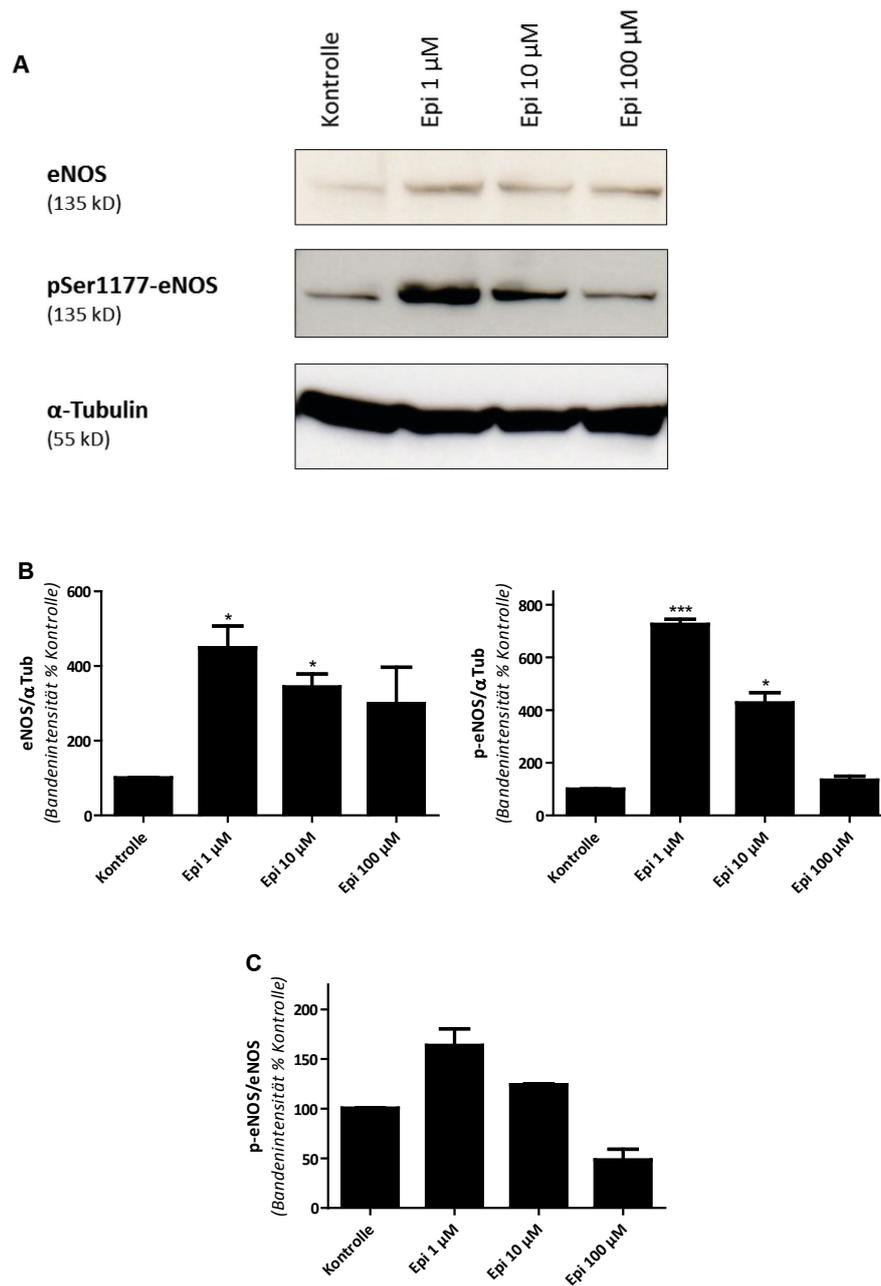
### **3.5. (-)-Epicatechin und seine Metaboliten erhöhen die eNOS-Expression**

Die HUVEC-Zellen wurden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ) bzw. den (-)-Epicatechin-Metaboliten (5S, 3G, 3S) für 24 Stunden behandelt. Hierbei wurden verschiedene Behandlungsprotokolle angewendet. Zum einen wurden Zellen mit Verarmung des Serums (Starving), zum anderen mit herkömmlichen Endothelial Cell Growth Medium complete kultiviert. Dabei ist bekannt, dass Starving Stressbedingungen verursacht, die zur Aktivierung anderer Signalwege führen können. Um Aussagen über die eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung treffen zu können, wurden die vorbehandelten Proben mit Anti-eNOS- und pSer-1177-eNOS-Antikörpern angefärbt.

In Western Blots konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin 1 -, 10 - und 100  $\mu\text{M}$  auf Proteinniveau einer Erhöhung der eNOS-Expression sowie eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 bewirken. Dabei übt (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  den größten Effekt auf die eNOS-Expression aus und bewirkt eine signifikante, über 4-fache Erhöhung der Expression. Aber auch (-)-Epicatechin 10 - und 100  $\mu\text{M}$  bewirken eine über 3-fache Hochregulation der eNOS-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Bei der eNOS-Phosphorylierung, die als Parameter für eine erhöhte NO-Produktion anzusehen ist, zeigt (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  sogar eine hoch signifikante, 7-fache Erhöhung der Expression verglichen mit der Kontrolle. (-)-Epicatechin 10  $\mu\text{M}$  bewirkt eine Hochregulation der Ser-1177-Phosphorylierung auf das 4-fache, wohingegen (-)-Epicatechin 100  $\mu\text{M}$  annähernd auf dem Niveau der Kontrolle bleibt. Das Verhältnis phosphorylierte/unphosphorylierte eNOS wird neben (-)-Epicatechin 10  $\mu\text{M}$ , aber vor allem durch (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  beeinflusst (Abbildung 15).

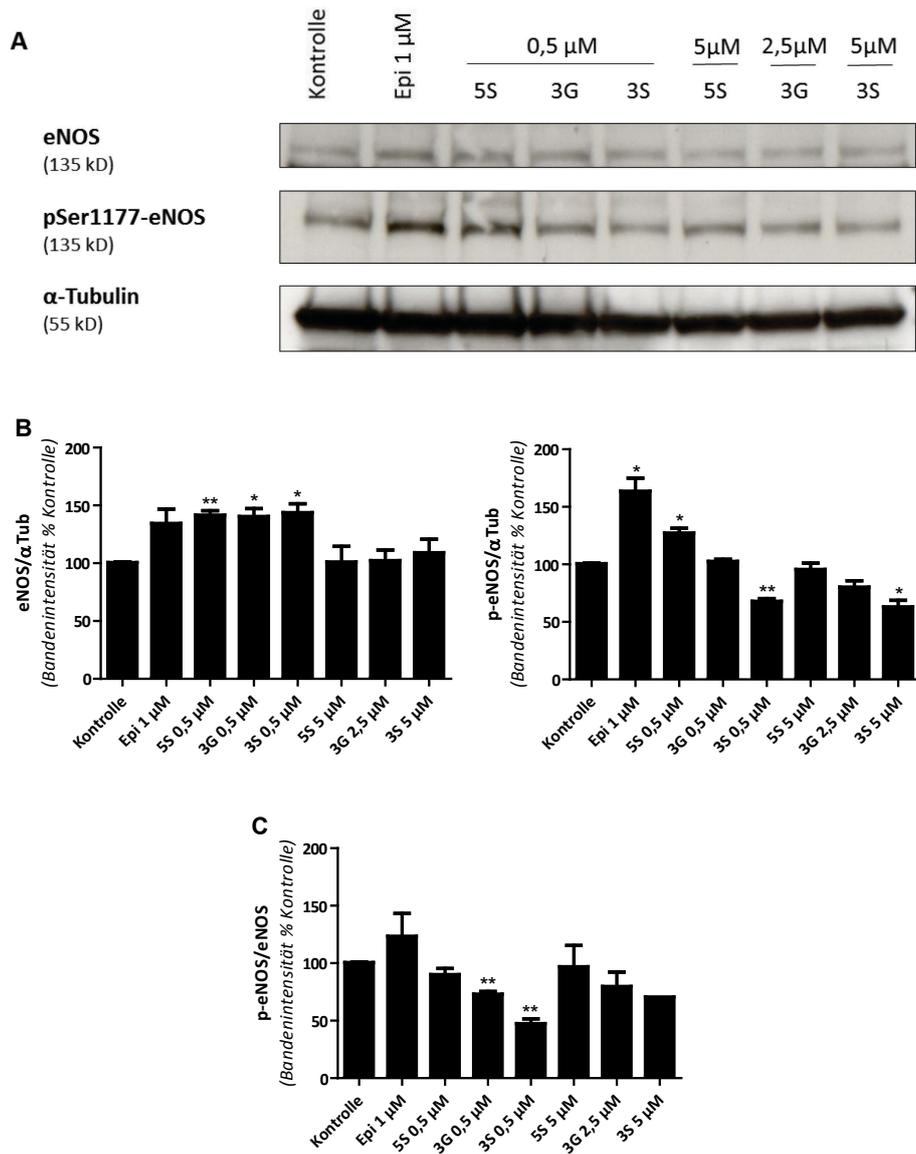
In Western Blots unter Kultivierung mit Endothelial Cell Growth Medium complete bewirken neben (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  auch die (-)-Epicatechin-Metabolite 5S, 3G und 3S in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  eine signifikante Hochregulation der eNOS-Expression auf das 1,5-fache. (-)-Epicatechin-Metaboliten in höheren Konzentrationen (2,5 -, 5  $\mu\text{M}$ ) haben auf die eNOS jedoch keinen signifikanten Einfluss im Sinne einer Hochregulation und befinden sich auf dem Niveau der Kontrolle. Signifikante Effekte auf eine Erhöhung der Ser-1177-Phosphorylierung sind lediglich von (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  und 5S 0,5  $\mu\text{M}$  vermittelt. Wohingegen 3S 0,5  $\mu\text{M}$  und 3S 5  $\mu\text{M}$  eine Herabregulation der Ser-1177-Phosphorylierung bewirken. Das Verhältnis zwischen phosphorylierter/unphosphorylierter NOS wird unter Kultivierung mit Endothelial Cell Growth Medium complete durch 3G 0,5  $\mu\text{M}$  und 3S 0,5  $\mu\text{M}$  signifikant herunterreguliert (Abbildung 16).

Unter Starving rufen neben (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$ , den (-)-Epicatechin-Metaboliten 5S, 3G und 3S in Konzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$ , auch die (-)-Epicatechin-Metaboliten in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine Erhöhung der eNOS-Expression hervor. Die größten Effekte werden, mit einer über 4-fachen Erhöhung der eNOS-Expression, von den Metaboliten 5S 0,5  $\mu\text{M}$ , 3S 0,5  $\mu\text{M}$  und 5S 5  $\mu\text{M}$  vermittelt. Eine starke Hochregulation der Phosphorylierung wird unter Starving vor allem von 3S 0,5  $\mu\text{M}$  auf annähernd das 10-fache der Kontrolle sowie von (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  und den Metaboliten 5S, 3G, 3S in beiden Konzentrationen (0,5 -, 5  $\mu\text{M}$ ) bewirkt. Die Hochregulation der Phosphorylierung ist dabei jedoch durch die niedrigeren Konzentrationen (0,5  $\mu\text{M}$ ) der Metaboliten ausgeprägter als durch die höheren Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$ ). Unter Starving-Bedingungen zeigt sich zudem bei (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten eine Zunahme des Verhältnisses zwischen phosphorylierter/unphosphorylierter eNOS, welches im Vergleich erneut bei den geringeren Konzentrationen (0,5  $\mu\text{M}$ ) höher ausfällt als bei höheren Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$ ) (Abbildung 17). Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin und seine Metaboliten in HUVEC-Zellen, insbesondere unter Starving, sowohl eine Erhöhung der eNOS-Expression als auch eine Zunahme der eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 bewirken.



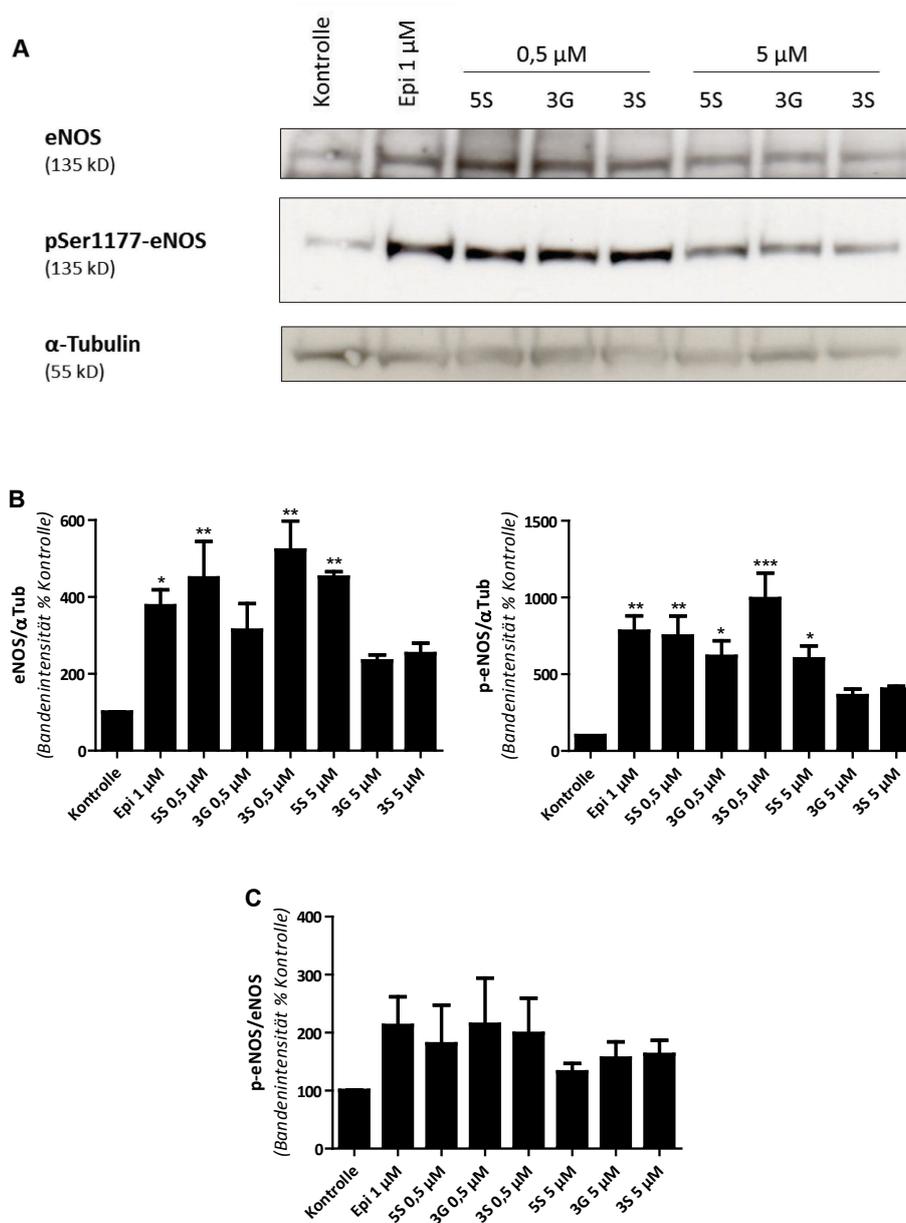
**Abbildung 15: (-)-Epicatechin erhöht die eNOS-Expression**

Dargestellt sind Western Blots mit HUVEC-Zellen, die mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu$ M) für 24 Stunden behandelt wurden. Es erfolgte die Anfärbung mittels Anti-eNOS-Antikörpern (1:1000) und mit Anti-Phospho-eNOS Antikörper (1:1000, 4°C über Nacht).  $\alpha$ -Tubulin wurde als Proteinladekontrolle verwendet (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des eNOS-Signal bzw. pSer-1177-eNOS-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) sowie des pSer-1177-eNOS-Signals zum eNOS-Signal (C) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. T-Test, 1way ANOVA, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .



**Abbildung 16: (-)-Epicatechin und seine Metaboliten erhöhen die eNOS-Expression**

Dargestellt sind Western Blots mit HUVEC-Zellen (ohne Starving). Es erfolgte eine Behandlung mit (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M bzw. (-)-Epicatechin-Metaboliten (5S 0,5 -, 3S 0,5 -, 3S 5 -, 3G 0,5 -, 3G 2,5  $\mu$ M) für 24 Stunden. Es erfolgte die Anfärbung mittels Anti-eNOS-Antikörpern (1:1000) und mit Anti-Phospho-eNOS Antikörpern (1:1000, 4°C über Nacht).  $\alpha$ -Tubulin wurde als Proteinladekontrolle verwendet (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des eNOS-Signal bzw. pSer-1177-eNOS-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) sowie des pSer-1177-eNOS-Signals zum eNOS-Signal (C) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. T-Test, 1way ANOVA, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ .



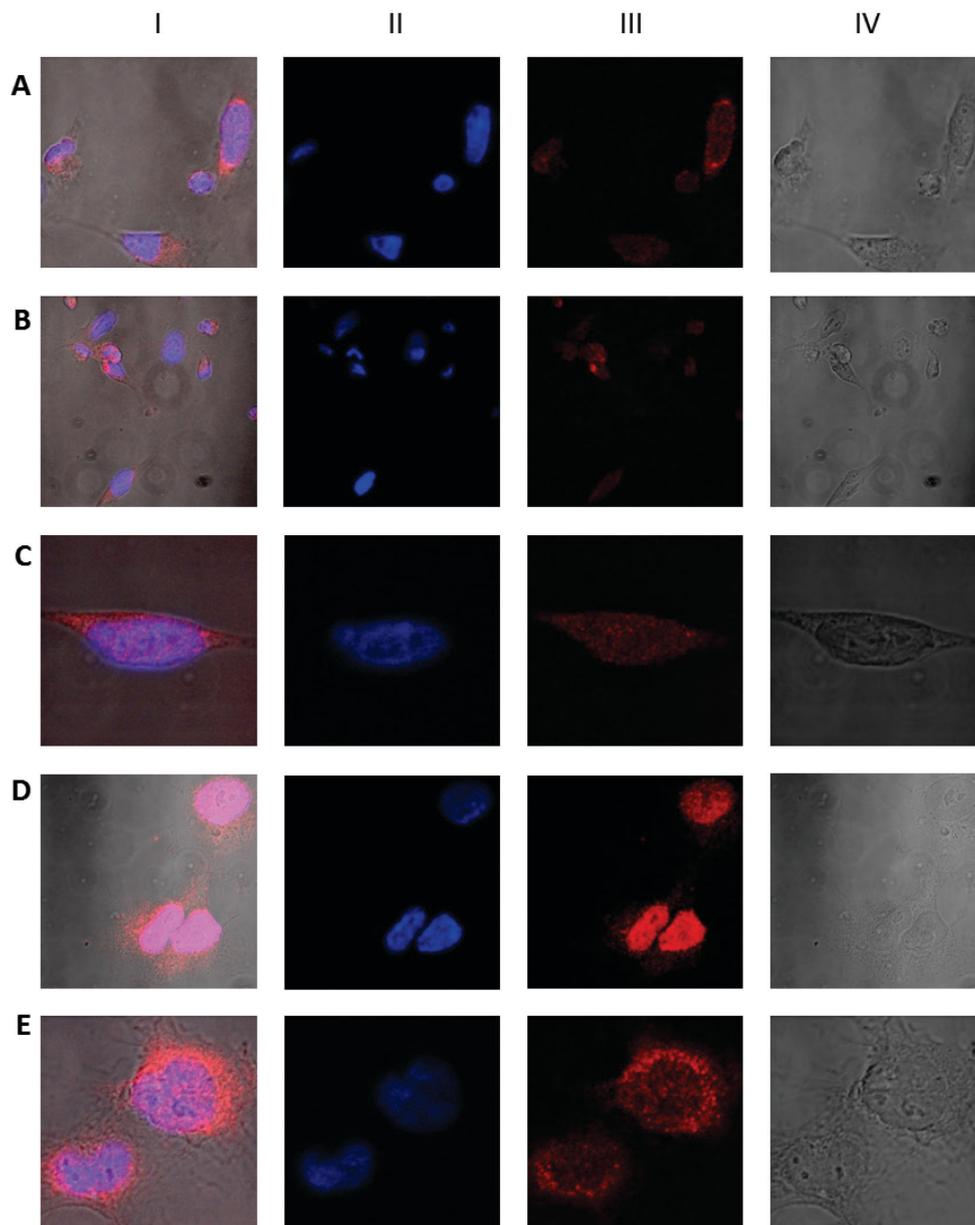
**Abbildung 17: (-)-Epicatechin und seine Metaboliten erhöhen die eNOS-Expression (Starving)**

Dargestellt sind Western Blots mit HUVEC-Zellen nach 30-minütigem Starving mit DMEM-Medium Low Glucose. Behandelt wurde mit Epicatechin 1  $\mu$ M bzw. (-)-Epicatechin-Metaboliten (5S 0,5 -, 3G 0,5 -, 3S 0,5 - und 5  $\mu$ M) für 24 Stunden. Es erfolgte die Anfärbung mittels Anti-eNOS-Antikorpfern (1:1000) und Anti-Phospho-eNOS Antikörper (1:1000, 4°C über Nacht).  $\alpha$ -Tubulin wurde als Proteinladekontrolle verwendet (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des eNOS-Signals bzw. pSer-1177-eNOS-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) sowie des pSer-1177-eNOS-Signals zum eNOS-Signal (C) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. T-Test, 1way ANOVA, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.6. (-)-Epicatechin induziert die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern

Mittels konfokalem Laser-Scanning Mikroskop wurde Nrf-2 nach (-)-Epicatechin- bzw. TBHQ-Behandlung mittels eines Fluoreszenz-Antikörper (Alexa Fluor 594, Invitrogen) sichtbar gemacht, um die Lokalisation von Nrf-2 nach beschriebener Behandlung beurteilen zu können. Die Kerne der

Zellen wurden mit Hoechst angefärbt, um die Kernlokation und die richtige Schnittebene zu ermitteln.



**Abbildung 18: (-)-Epicatechin induziert die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern**

HUVEC-Zellen wurden auf 22mm Ø Deckgläschen 24 Stunden kultiviert und für 2 Stunden bei 37°C mit A) (-)-Epicatechin 1 µM, B) (-)-Epicatechin 10 µM, C) (-)-Epicatechin 100 µM, D) TBHQ 100 µM als Positivkontrolle behandelt. E) Kontrolle (unbehandelte HUVEC-Zellen). Die Zellen wurden mit Anti-Nrf-2 Antikörpern (1:100) gefärbt und mit einem Fluoreszenz-Antikörper (Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, 1:500) sichtbar gemacht. Der Zellkern wurde mit Hoechst angefärbt und die Lokalisation von Nrf-2 mittels eines Zeiss LSM 510 Confocal Laserscanning Mikroskop untersucht.

Unter I-IV sind die verschiedenen Fluoreszenz-Kanäle abgebildet:

A) Behandelte Zellen mit (-)-Epicatechin 1 µM zeigen ein starkes Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma. B) Behandelte Zellen mit 10 µM (-)-Epicatechin zeigen ein homogenes Fluoreszenz-Signal zwischen Zytoplasma und Zellkern. C) Behandelte Zellen mit 100 µM (-)-Epicatechin zeigen eine homogene Fluoreszenz-Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern; es lässt sich eine charakteristische Färbung erkennen. D) Behandelte Zellen mit 100 µM TBHQ zeigen ein intensives Nrf-2-Fluoreszenz-Signal im Zellkern. E) Kontroll-Zellen zeigen eine intensive Anreicherung von Nrf-2 im Zytoplasma mit Entstehung eines optischen "Loches" im Bereich des Zellkerns.

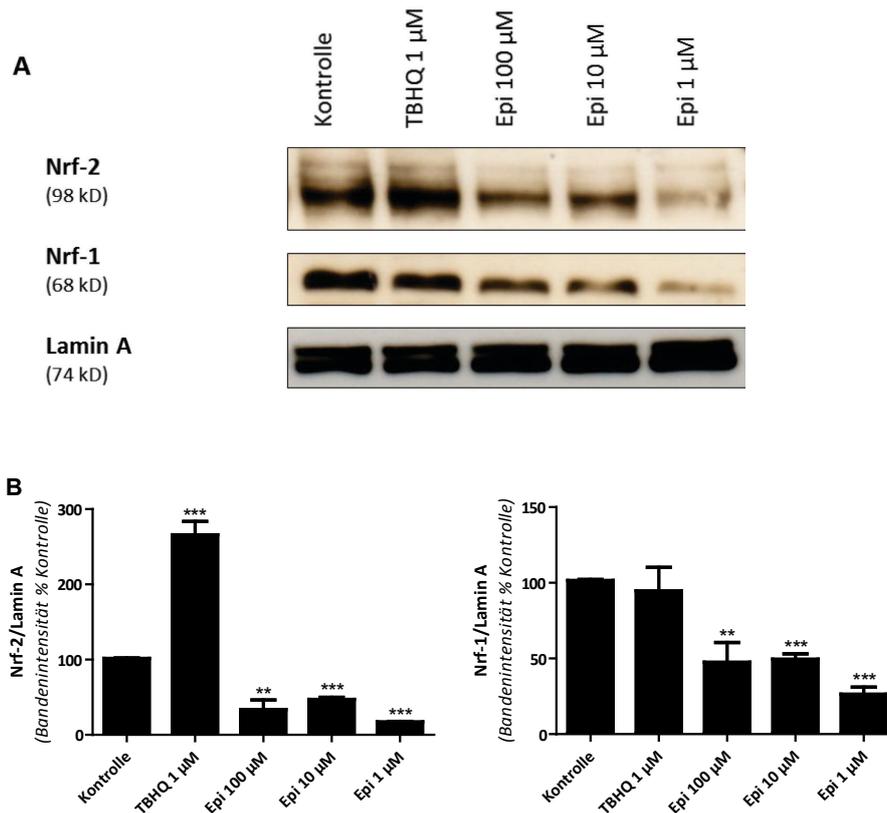
Nach (-)-Epicatechin-Behandlung insbesondere mit 100  $\mu\text{M}$ , aber auch mit 10  $\mu\text{M}$ , zeigt sich eine Zunahme des Fluoreszenz-Signals im Zellkern mit homogener Fluoreszenz-Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern (B, C). Bei Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  (-)-Epicatechin wurde hingegen, bei inhomogener Fluoreszenz-Verteilung zwischen Zytoplasma und Zellkern, ein stärkeres Fluoreszenz-Signal im Zytoplasma detektiert (A). Die verwendete Positivkontrolle TBHQ 100  $\mu\text{M}$  zeigt eine intensive Akkumulation des Fluoreszenz-Signals von Nrf-2 im Zellkern (D), die die Fluoreszenz-Anreicherung nach (-)-Epicatechin-Behandlung übersteigt. Die Kontrolle mit unbehandelten Zellen weist eine ausgeprägte Anreicherung von Nrf-2 im Zytoplasma auf, die zur optischen Entstehung eines „Loches“ im Bereich des Zellkerns beiträgt (E) (Abbildung 18). Zusammenfassend ergeben die Resultate eine Induktion der Translokation von Nrf-2 in den Zellkern durch 10 - und 100  $\mu\text{M}$  (-)-Epicatechin.

### **3.7. (-)-Epicatechin beeinflusst die Nrf-2-Expression im Zellkern**

Es wurden Kernextrakte aus (-)-Epicatechin-behandelten Zellen gewonnen, um auf Proteinebene die Expression der Transkriptionsfaktoren Nrf-2 und Nrf-1 mittels Western Blots quantifizieren zu können. Das Kernprotein Lamin A dient dabei als Marker für das Vorliegen von Kernextrakten sowie als Kontrolle, dass quantitativ vergleichbar Mengen Kernextrakt vorliegen.

Bei (-)-Epicatechin-Vorbehandlung (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich eine signifikante Runterregulation der Nrf-2-Expression auf Proteinebene. Die Nrf-2-Expression wird dabei am stärksten von (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  (>80%) runterreguliert. (-)-Epicatechin 10 - und 100  $\mu\text{M}$  bewirkt eine Runterregulation von etwa 50%. Hingegen wird auf Proteinebene von TBHQ 1  $\mu\text{M}$  eine vermehrte Nrf-2-Expression mit einer 2-fachen Steigerung im Vergleich zur Kontrolle vermittelt.

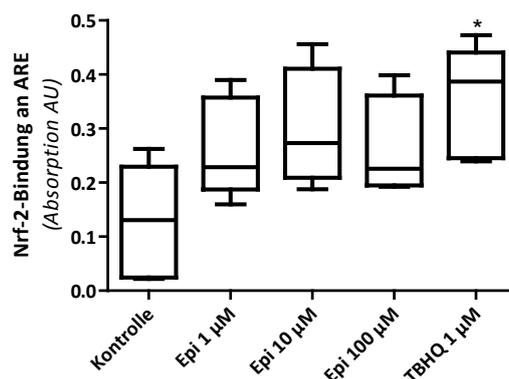
Eine verminderte Nrf-1-Expression zeigt sich auch bei (-)-Epicatechin-behandelten Proben, wobei die stärkste Runterregulation von Nrf-1 ebenfalls durch Vorbehandlung mit (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  erfolgt. (-)-Epicatechin 10 - und 100  $\mu\text{M}$  bewirken eine Nrf-1-Runterregulation von annähernd 50% im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zu Nrf-2 bewirkt TBHQ 1  $\mu\text{M}$  bei Nrf-1 keine erhöhte Expression, sondern beeinflusst Nrf-1 eher im Sinne einer leichten Runterregulation (Abbildung 19).



#### Abbildung 19: (-)-Epicatechin bewirkt eine Runterregulation der Nrf-2 Expression

Die Zellen wurden 2 Stunden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu$ M) bzw. TBHQ (1  $\mu$ M) als Positivkontrolle in phenolrot-freiem Behandlungsmedium mit inaktiviertem Serum inkubiert. Die Zellen wurden in eine Zytoplasma- und eine Kernfraktion aufgetrennt. Die Proben wurden in einer Proteinkonzentration von 15  $\mu$ g Kernextrakt in ein NOVEXTrisAcetat Mini Gel aufgetragen. Die Antikörper-Färbung erfolgte mit Anti-Nrf-2- (1:100) und Anti-Nrf-1- (1:100) Antikörpern. Als Ladekontrolle der Kernfraktion wurde das Kernprotein Lamin A (1:200) angefärbt (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des Nrf-2-Signals bzw. Nrf-1-Signals zum Lamin A-Signal (B) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. T-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Um mögliche (-)-Epicatechin-bedingte Unterschiede der Nrf-2-Bindung an Antioxidant Response Elements (ARE) eruieren zu können, wurden die Kernextrakte mittels TransAm Assay Kit analysiert (Abbildung 20).



**Abbildung 20: (-)-Epicatechin beeinflusst die Nrf-2-Bindung an ARE**

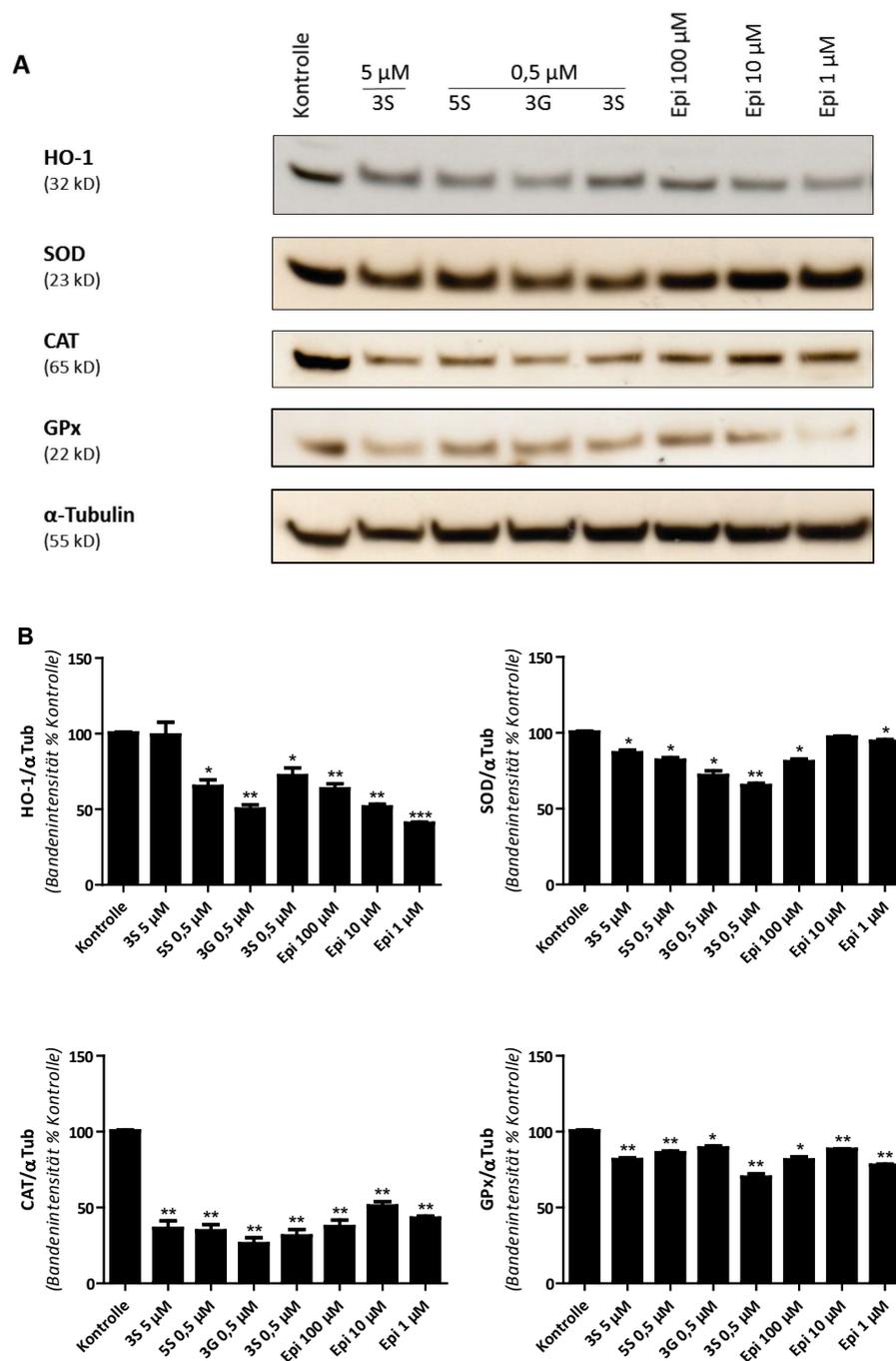
Die Zellen wurden 2 Stunden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100 µM) bzw. TBHQ (1 µM) in phenolrot-freiem Behandlungsmedium mit inaktiviertem Serum inkubiert. Die Zellen wurden in eine Zytoplasma- und eine Kernfraktion aufgetrennt. Zur Bestimmung der Bindungsaktivität von Nrf-2 wurden Kernextrakte mit einer Proteinkonzentration von 10 µg/pro well verwendet. Als Positivkontrolle wurde die Kernfraktion, der mit TBHQ-behandelten Zellen verwendet. In der Kernfraktion wurde die Nrf-2-Bindungsaktivität an ARE mittels TransAM Nrf-2 Kit quantifiziert bei einer Absorption von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 655 nm mittels Spektralphotometer quantifiziert. 1way ANOVA, \*= p < 0,05, n=5.

Die Experimente ergaben, dass (-)-Epicatechin die Nrf-2-Bindung an ARE erhöht, wobei (-)-Epicatechin 10 µM den größten Effekt zeigte und annähernd das Niveau der Positivkontrolle TBHQ erreichte, gefolgt von (-)-Epicatechin 1 - und 100 µM. Die Positivkontrolle TBHQ 1 µM erhöht signifikant die Bindung von Nrf-2 an ARE (Abbildung 20).

Demzufolge konnte in den vorliegenden Ergebnissen auf Proteinebene keine erhöhte Expression von Nrf-2 und Nrf-1 nachgewiesen werden. Wobei jedoch auf DNA-Ebene nach (-)-Epicatechin-Behandlung eine vermehrte Nrf-2-Bindung an ARE und eine Beeinflussung und Aktivierung des Nrf-2-Signalwegs gezeigt werden konnte.

### 3.8. (-)-Epicatechin erhöht unter Starving die Expression von HO-1, SOD, CAT und GPx

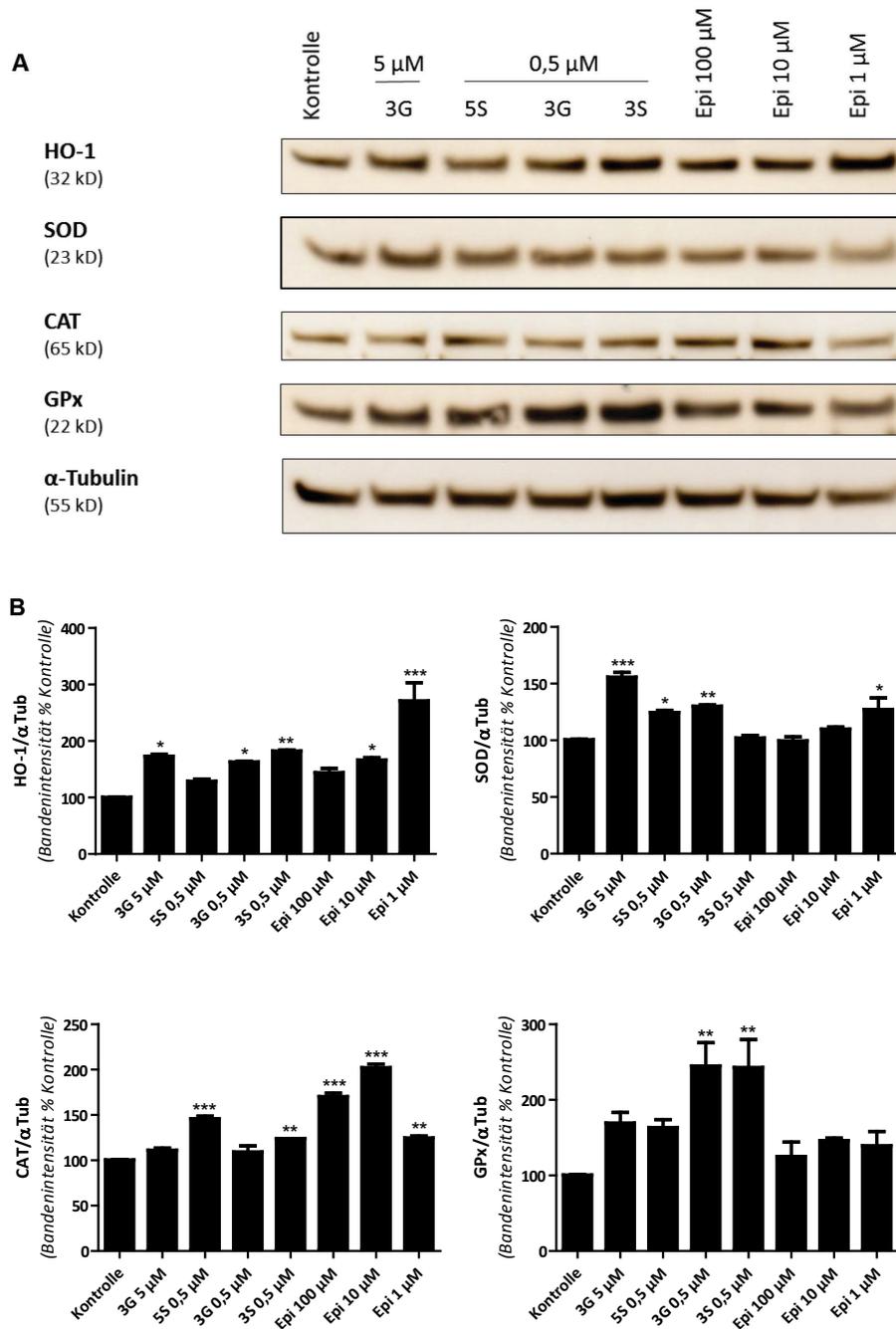
Bei (-)-Epicatechin- bzw. Metaboliten-behandelten Proben wurden verschiedene Redoxproteine (HO-1, SOD, CAT, GPx) mittels Western Blot dargestellt, um Aussagen bezüglich der Beeinflussung von (-)-Epicatechin und seiner Metaboliten auf die Schutzmechanismen von HUVEC-Zellen zu erhalten. Unter Kultivierung mit Endothelial Cell Growth Medium complete zeigten (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100 µM sowie die Metabolite 5S, 3G und 3S keine erhöhte Expression der Redoxproteine. Insbesondere CAT zeigte eine signifikante Runterregulation durch die (-)-Epicatechin-Metaboliten deutlich unterhalb von 50% der Kontrolle. Aber auch bei HO-1, insbesondere durch (-)-Epicatechin 1 µM, sowie bei der SOD, insbesondere durch 3S 0,5 µM, sowie bei der GPx, insbesondere durch 3S 0,5 µM, zeigten eine signifikante Verminderung der Proteinexpression (Abbildung 21).



**Abbildung 21: (-)-Epicatechin führt zu keiner Erhöhung der Expression verschiedener Redoxproteine**

Die Zellen wurden 24 Stunden ohne Starving mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu$ M) bzw. den Metaboliten 5S, 3G, 3S behandelt. Die Western Blot Membranen wurden HO-1 (1:1000), SOD (1:5000), CAT (1:5000), GPx (1:300) angefärbt (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des HO-1 Signals bzw. SOD- Signals bzw. CAT-Signals bzw. GPx-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. Auswertung: 1way ANOVA, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Unter Stressbedingungen hervorgerufen durch Starving, zeigte (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  die größte Steigerung der HO-1-Expression auf annähernd das 3-fache der Kontrolle, aber auch (-)-Epicatechin 10 - und 100  $\mu\text{M}$  sowie die verwendeten (-)-Epicatechin-Metaboliten erhöhten die Expression der HO-1. Bei der SOD ist die Hochregulation v.a. durch 3G 5  $\mu\text{M}$  hoch signifikant auf das 1,5-fache, aber auch durch 3G 0,5  $\mu\text{M}$ , 5S 0,5  $\mu\text{M}$  und (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  vermittelt. Die Expression der SOD nach Behandlung mit 3S 0,5  $\mu\text{M}$  sowie (-)-Epicatechin 100  $\mu\text{M}$  bleibt annähernd auf dem Niveau der Kontrolle. Eine signifikante Beeinflussung der CAT-Expression im Sinne einer Erhöhung wird am stärksten, d.h. um das 2-fache der Kontrolle, durch (-)-Epicatechin 10  $\mu\text{M}$ , sowie nachfolgend von (-)-Epicatechin 100  $\mu\text{M}$  und 5S 0,5  $\mu\text{M}$  hervorgerufen. Die (-)-Epicatechin-Metaboliten haben auf Proteinebene insgesamt einen geringeren Effekt auf die Hochregulation der CAT-Expression, wobei maximal eine 1,5-fache Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle erreicht wird. GPx wird insbesondere von den Metaboliten 3G 0,5  $\mu\text{M}$  sowie 3S 0,5  $\mu\text{M}$  in ihrer Expression signifikant auf das über 2-fache der Kontrolle hochreguliert. Aber auch die übrigen untersuchten Metaboliten sowie (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$  vermitteln unter Starving-Bedingungen eine Erhöhung der GPx-Expression in der Größenordnung einer 1,5-fachen Erhöhung (Abbildung 22).



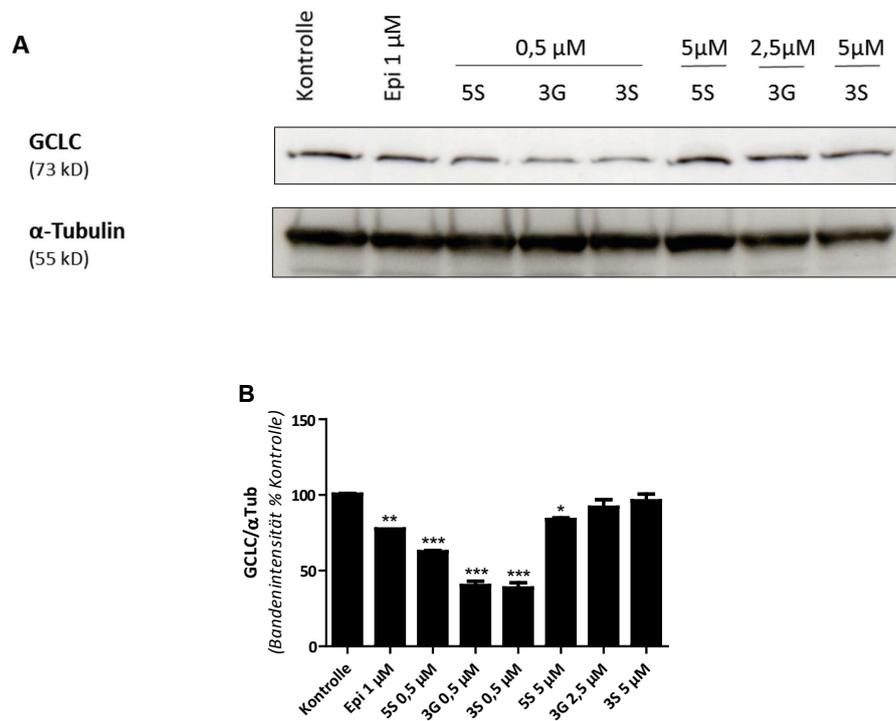
**Abbildung 22: (-)-Epicatechin erhöht die Expression verschiedener Redoxproteine (Starving)**

Die Zellen wurden 24 Stunden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ) bzw. den Metaboliten 5S, 3G, 3S behandelt. Es erfolgte das Starving der Zellen (30 Minuten in DMEM-Medium mit Low Glukose). Die Western Blot Membranen wurden mit HO-1 (1:1000), SOD (1:5000), CAT (1:5000), GPx (1:300) angefärbt (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des HO-1 Signals bzw. SOD- Signals bzw. CAT-Signals bzw. GPx-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. Auswertung: 1way ANOVA, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass unter Starving die Expression von antioxidativen Enzymen (HO-1, SOD, CAT, GPx) sowohl von (-)-Epicatechin als auch von seinen Metaboliten hochreguliert wird. Ohne Starving sind diese Effekte von (-)-Epicatechin sowie den (-)-Epicatechin-Metaboliten auf die genannten antioxidativen Enzyme nicht nachweisbar.

### 3.9. Einfluss von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf die Glutamacysteinligase (GCL)-Expression

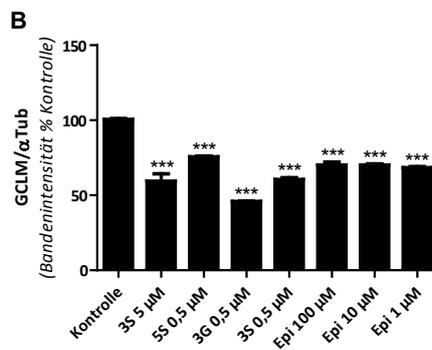
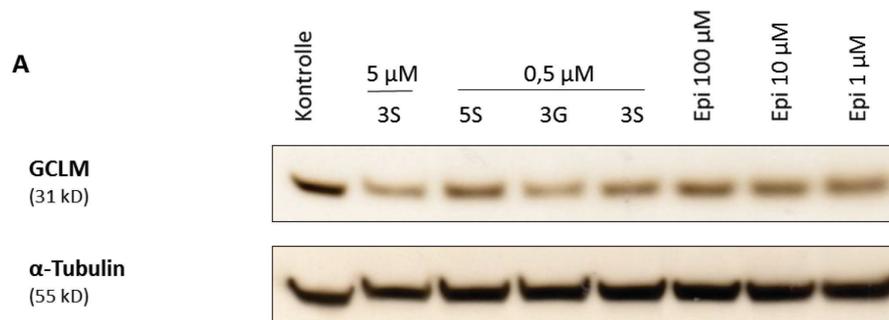
Western Blots mit (-)-Epicatechin- und Metaboliten-behandelten (5S, 3G, 3S) Proben wurden angefertigt, um die Aussagen über deren Beeinflussung auf die zwei Untereinheiten der GCL machen zu können.



#### Abbildung 23: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Runterregulation der GCLC-Expression

Die Zellen wurden über 24 Stunden ohne Starving mit (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu$ M bzw. mit den Metaboliten 5S, 3G, 3S behandelt. Dargestellt sind Western Blots, die mit GCLC-Antikörpern (1:200) angefärbt wurden (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des GCLC-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. 1way ANOVA, T-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

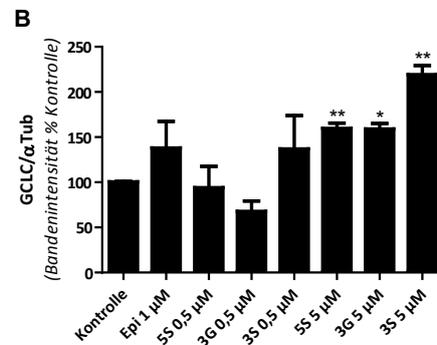
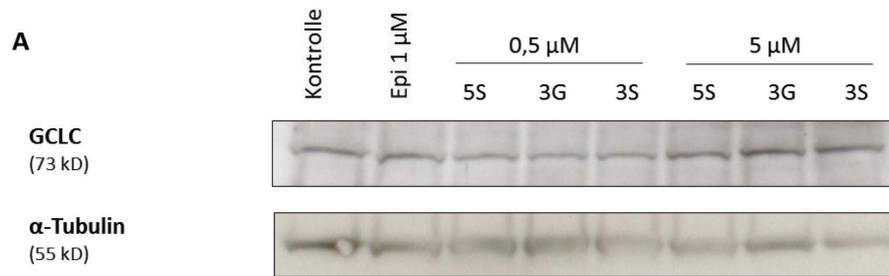
Unter Kultivierung mit Endothelial Cell Growth Medium complete kommt es bei der Expression der katalytischen Untereinheit (GCLC) nach (-)-Epicatechin- bzw. Metaboliten-Behandlung, insbesondere bei 3G 0,5  $\mu$ M und 3S 0,5  $\mu$ M, aber auch bei 5S 0,5  $\mu$ M, 5S 5  $\mu$ M und (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M zu einer signifikanten Runterregulation der Expression. Die (-)-Epicatechin-Metaboliten in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M vermittelt dabei einen größeren Effekt als die (-)-Epicatechin-Metaboliten in einer Konzentration von 5  $\mu$ M (Abbildung 23).



**Abbildung 24: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Runterregulation der GCLM-Expression**

Die Zellen wurden über 24 Stunden ohne Starving mit (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu$ M bzw. mit den Metaboliten 5S, 3G, 3S behandelt. Dargestellt sind Western Blots, die mit GCLM-Antikörpern (1:200) angefärbt wurden (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des GCLM-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. 1way ANOVA, T-Test, \*\*\*=  $p < 0,001$ .

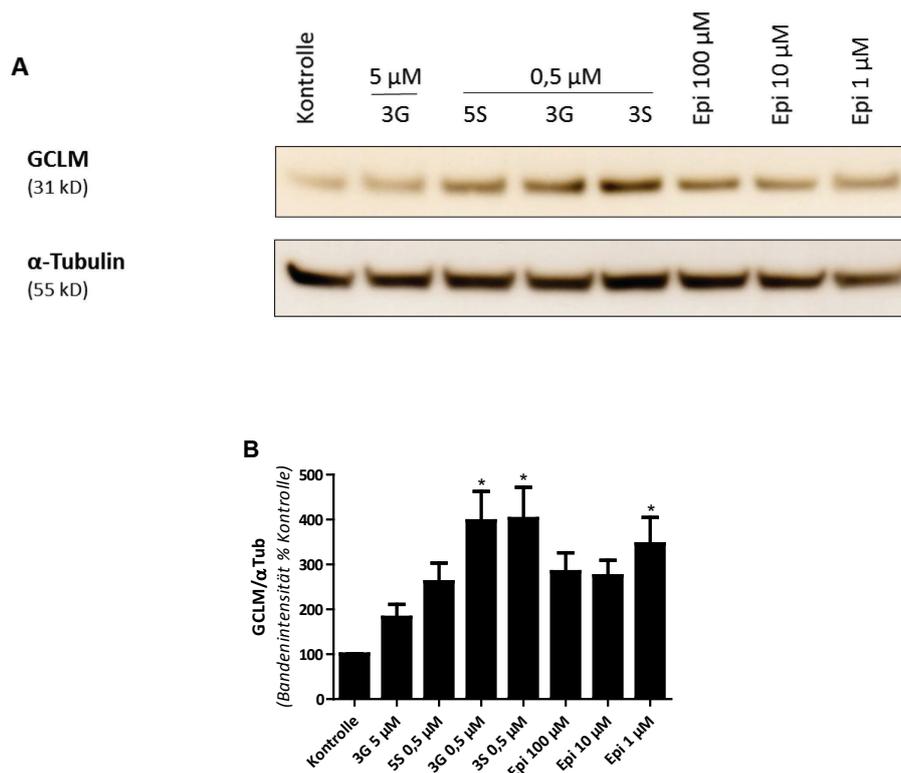
Die GCLM-Expression (regulatorische Untereinheit) wird unter Kultivierung mit Endothelial Cell Growth Medium complete durch die (-)-Epicatechin-Metaboliten (3G 0,5  $\mu$ M, 3S 5  $\mu$ M, 3S 0,5 $\mu$ M, 5S 0,5  $\mu$ M), aber auch durch (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu$ M signifikant herunterreguliert (Abbildung 24).



**Abbildung 25: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Erhöhung der GCLC-Expression (Starving)**

Die Zellen wurden über 24 Stunden mit (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu$ M bzw. mit den Metaboliten 5S, 3G, 3S behandelt. Es erfolgte das Starving der Zellen (30 Minuten in DMEM-Medium mit Low Glukose). Dargestellt sind Western Blots, die mit GCLC-Antikörpern (1:200) angefärbt wurden (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des GCLC-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. 1way ANOVA, T-Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ .

Unter Stressbedingungen hervorgerufen durch Starving zeigte sich bei den (-)-Epicatechin-Metaboliten (3S, 3G, 5S) in den Konzentrationen von 5  $\mu$ M eine Erhöhung der GCLC-Expression zwischen einer 1,5 bis über 2-fachen Erhöhung. Aber auch 3S 0,5  $\mu$ M und (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M bewirken eine erhöhte Expression. Der Metabolit 3G 0,5  $\mu$ M zeigt hingegen eine Erniedrigung der Expression, wohingegen 5S 0,5  $\mu$ M annähernd auf dem Niveau der Kontrolle bleibt (Abbildung 25).



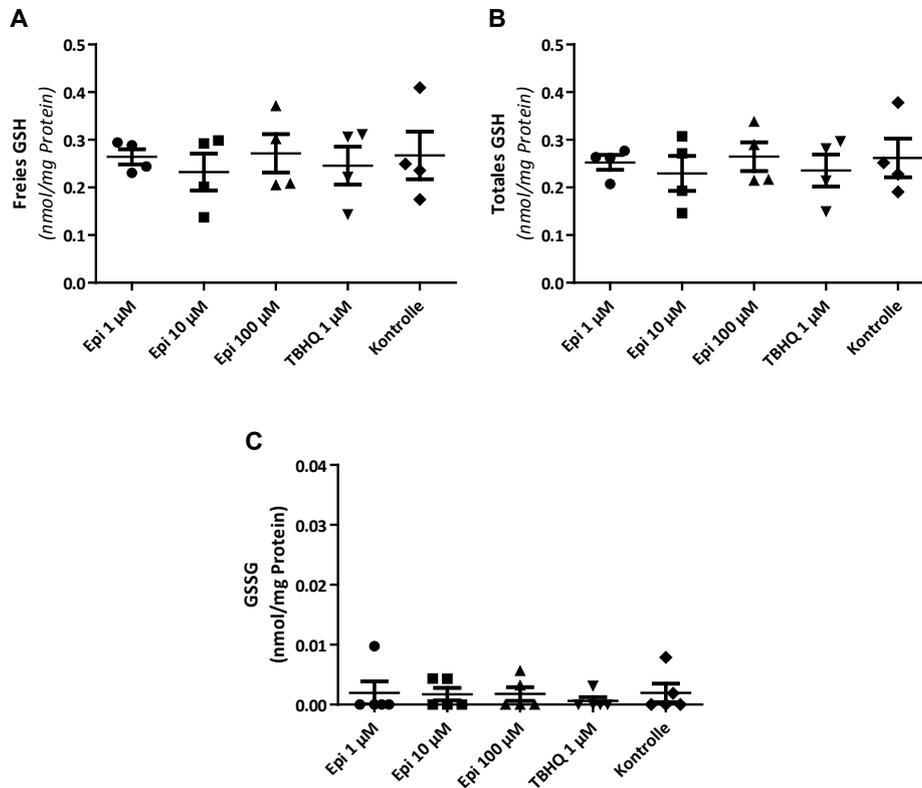
**Abbildung 26: (-)-Epicatechin bzw. -Metaboliten bewirken eine Erhöhung der GCLM-Expression (Starving)**

Die Zellen wurden über 24 Stunden mit (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu$ M bzw. mit den Metaboliten 5S, 3G, 3S behandelt. Es erfolgte das Starving der Zellen (30 Minuten in DMEM-Medium mit Low Glukose). Dargestellt sind Western Blots, die mit GCLM-Antikörpern (1:200) angefärbt wurden (A). Densitometrische Analysen der Banden wurden durch Normierung des GCLM-Signals zum  $\alpha$ -Tubulin-Signal (B) durchgeführt und als % der Kontrolle angegeben. 1way ANOVA, T-Test, \*= p < 0,05.

Die Expression der regulatorischen Untereinheit (GCLM) wird unter Stressbedingungen insbesondere durch die Metaboliten 3G und 3S in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M signifikant teils bis auf das über 4-fache gesteigert. Auch (-)-Epicatechin 1 -, 10 -, 100  $\mu$ M bewirken eine über 2,5-fache Hochregulation der GCLM-Expression, wobei (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M den größten Effekt vermittelt. 3G 5  $\mu$ M dagegen übt den geringsten Effekt auf die Expressions-Erhöhung der regulatorischen Untereinheit der GCL (GCLM) aus (Abbildung 26). Zusammenfassend konnte erst unter Stressbedingungen verursacht durch Starving eine Hochregulation der GCLC- sowie GCLM-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 25, Abbildung 26), wobei die GCLC-Expression insbesondere durch Konzentrationen von 5  $\mu$ M gesteigert und die GCLM-Expression insbesondere bei niedrigen Konzentrationen (0,5  $\mu$ M) der (-)-Epicatechin-Metaboliten hochreguliert wurde.

### 3.10. (-)-Epicatechin hat keinen Einfluss auf das GSH/GSSG-Level

HUVEC-Zellen wurden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ) für 24 Stunden behandelt, um nach erfolgter Behandlung freies- und totales Glutathion sowie GSSG aus den Zelllysaten mittels enzymatischem Assay bestimmen zu können.



**Abbildung 27: (-)-Epicatechin hat keinen Einfluss auf das GSH/GSSG-Level in HUVEC-Zellen**

Zellen wurden für 24 Stunden in phenolrot-freiem Medium mit inaktiviertem Serum kultiviert und für weitere 24 Stunden mit (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu\text{M}$ ) bzw. mit TBHQ (1  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle behandelt. Mittels eines enzymatischen Assays wurde aus Zelllysaten freies- und totales GSH sowie GSSG fluorimetrisch bestimmt. Die Glutathion-Konzentrationen wurden basierend auf einer Standardkurve mittels 4-Parameter-Fit-Werten bestimmt und zur Proteinmenge normiert. Dargestellt sind die proteinnormierten Konzentrationen an freiem- (A), totalem GSH (B) sowie GSSG (C). 1way ANOVA,  $n=5$ .

(-)-Epicatechin verursachte in den Konzentrationen 1 -, 10 - und 100  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede im freien- und totalen Glutathion (GSH) sowie dem Glutathion-Disulfid (GSSG) (Abbildung 27). Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin in den untersuchten Konzentrationen keinen Einfluss auf das GSH/GSSH-Level in HUVEC-Zellen ausübt.

## **4. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungsweise und die Effekte von (-)-Epicatechin und seiner Metaboliten auf Endothelzellen in-vitro mittels Zellkultur untersucht. Es wird vermutet, dass die Effekte von (-)-Epicatechin zum einen auf einer verbesserten endothelialen Funktion durch erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, zum anderen auf Veränderungen im Redoxstatus der Zellen beruhen. Es wurden die Effekte von (-)-Epicatechin auf die eNOS, den redoxsensitiven Nrf-2-ARE-Signalweg sowie die Beeinflussung von (-)-Epicatechin auf Redoxproteinen analysiert. Da bekannt ist, dass (-)-Epicatechin im Plasma überwiegend in Form seiner Metaboliten vorliegt (Ottaviani et al. 2011), wurde zudem die Wirkung der (-)-Epicatechin-Metaboliten auf die eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 sowie den Redoxstatus untersucht. Dabei wurde insbesondere unter oxidativem Stress, ausgelöst durch Starving, die Wirkung von (-)-Epicatechin und seiner Metaboliten auf die eNOS-Expression sowie die Beeinflussung verschiedener Nrf-2-regulierter, antioxidativer Proteine (u.a. HO-1, GCLC, GCLM) betrachtet.

### **4.1. Endothelzellen und der Einfluss von NO**

#### **4.1.1. HUVEC-Zellen als in vitro-Modell zur Untersuchung von Effekten auf Endothelzellen**

Die Kultivierung von HUVEC-Zellen nach Jaffe et al. ermöglichte die Durchführung von in-vitro-Experimenten zur Untersuchung von Effekten auf Endothelzellen (Jaffe et al. 1973). HUVEC-Zellen repräsentieren dabei für Endothelzellen ein anerkanntes Modell zur Untersuchung dieser Effekte. Die metabolischen und physiopathologischen Eigenschaften der verschiedenen Endothelzelltypen im Körper können jedoch nicht vollständig durch das HUVEC-Modell abgebildet werden (Baudin et al. 2007). Zur Charakterisierung der eNOS wurden in dieser Arbeit die eNOS-Expression und -Aktivität sowie der eNOS-Phosphorylierungsstatus mittels kultivierter HUVEC-Zellen analysiert. Western Blots wurden angefertigt, um die eNOS-Expression mit der aktivierenden Phosphorylierung an Ser-1177 und die eNOS-Dimerisierung zwischen den Passagen beurteilen zu können. Über die Detektion der Ser-1177-Phosphorylierung lässt sich eine aktivierende posttranskriptionale Modifikation der eNOS sichtbar machen. Da eNOS-Monomere kein NO produzieren können, erlauben Erkenntnisse über das Vorliegen der Dimer-Form in den unterschiedlichen Passagen eine Abschätzung der Menge an potentiell funktionsfähiger eNOS. Beim Vorliegen von eNOS-Dimeren sind Erkenntnisse über einen Elektronenfluss innerhalb der eNOS, der zur NO-Produktion notwendig ist, jedoch nicht abzuleiten. Zur weiteren Validierung der Aktivität der eNOS im HUVEC-Zellmodell wurde die NO-Produktion fluorometrisch ermittelt.

#### **4.1.2. Unterschiede in der eNOS-Expression zwischen den Passagen**

Die Phosphorylierung an Ser-1177 stellt einen zusätzlichen wichtigen Mechanismus der eNOS-Aktivierung dar, der den Elektronenfluss zur Reduktasedomäne stimuliert und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des Enzyms erhöht (McCabe et al. 2000, Fleming et al. 2003). In den vorliegenden Experimenten konnte eine Variabilität der eNOS-Expression und des Phosphorylierungsstatus an Ser-1177 zwischen den Passagen 1-8 gezeigt werden. Es ergab sich eine vermehrte eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung insbesondere in den frühen Passagen (P1, P2) und teils späteren Passagen (u.a. P6). Die Passagen 3 und 4 wurden in der eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung herunterreguliert. In der Literatur ist bekannt, dass während der Kultivierung von HUVEC-Zellen zwischen den Passagen Unterschiede in Zellgröße, Aussehen und Proteingehalt bestehen (Nichols et al. 1987, Hasegawa et al. 1988). Auch die Anzahl der Passagierungen bei HUVEC-Zellen beeinflusst die Expression von Enzymen. Balyasnikova et al. konnten zeigen, dass die Aktivität und Expression von Angiotensin-converting-enzyme (ACE) während der HUVEC-Kultivierung von 90% auf 30% in Passage 7 herunterreguliert wird. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass zwischen benachbarten HUVEC-Zellen eine heterogene ACE-Aktivität vorliegt (Balyasnikova et al. 1998). Auch ist eine stark variierende Prostazyklin-Ausschüttung während der unterschiedlichen Passagen in HUVEC-Zellen bekannt (Goldsmith et al. 1984). Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Zellen in unterschiedlichen Passagen variierendem oxidativen Stress ausgesetzt sind. Balyasnikova et al. stellten fest, dass sich die Zelldichte zwischen primären Zellen und HUVEC-Zellen der Passage 7 bei konfluentem Wachstum auf das 4-fache steigert (Balyasnikova et al. 1998). Demzufolge kann vermutet werden, dass u.a. eine unterschiedliche Zelldichte mit einer differierenden Anzahl toter Zellen in den einzelnen Passagen eine Variabilität des oxidativen Stressses mit unterschiedlicher Enzymexpression verursachen kann.

Weitere mögliche Faktoren für die Variabilität unter den Passagen sind vermutlich Veränderungen der Zellkulturbedingungen im Laufe der Kultivierung oder Folgen einer additiven Trypsinierungs-Exposition im Laufe der Passagierungen. In der Literatur ist beschrieben, dass die Auswahl des Zellkulturmediums, sowie die Anwendung von Trypsin-EDTA Veränderung der morphologischen Charakteristika hervorruft (Bala et al. 2011). Bala et. al konnten zeigen, dass Zellen bei Kultivierung mit 20%-serumhaltigem-Medium begannen nach Passage 3 ihre morphologischen Charakteristika zu verlieren und nach Passage 6 die ersten Alterungsstufen auftraten. Unter Verwendung von Medium mit niedrigem Serum (2%) und viel Wachstums-Supplement traten jedoch keine Veränderungen bis zu Passage 10 auf (Bala et al. 2011). Stabile Wachstumsbedingungen bei Experimenten mit HUVEC-Zellen sind durch Verwendung von serumfreiem/-armen Medium in der Literatur beschrieben

(Hayashi et al. 1976, Bala et al. 2011). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde bei den Experimenten auch Medium mit inaktiviertem Serum eingesetzt.

Die Verwendung von ähnlichen Passagen kann ein höheres Maß an Vergleichbarkeit der Experimente gewährleisten. So ist in der Literatur beschrieben, dass Steffen et al. HUVEC-Zellen bevorzugt aus Passage 2-4 verwendeten (Steffen et al. 2008) und Heiss et al. experimentell konfluente HUVEC-Zellen, die nicht älter als Passage 3 waren, nutzten (Heiss et al. 2009). In den vorliegenden Experimenten wurden HUVEC-Zellen Passage 3-5 verwendet. Der Aspekt, dass bei den vorliegenden Experimenten c-pooled HUVEC-Zellen verwendet wurden, sollte ebenfalls berücksichtigt werden. C-pooled Zellen werden aus vielen verschiedenen Donoren gewonnen und unterliegen so bereits einem natürlichen Maß an Variabilität. Um die Eigenschaften der eNOS während einer zunehmenden Passagierung weiter ergründen und validieren zu können, bedarf es der Verwendung von Zellen eines Donors. Anhand dieser Experimente konnte festgestellt werden, dass die eNOS-Expression und die eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 zwischen den Passagen variiert; mit Erhöhung in frühen Passagen (P1, P2) und teils späteren Passagen (u.a. P6). Vorherrschende optimale Zellkulturbedingungen während der frühen Zellpassagen können vermutlich eine erhöhte eNOS-Expression mit Zunahme der aktivierenden Phosphorylierung bewirken. Die Effekte späterer Passagen lassen sich gegebenenfalls durch Adaptationsprozesse in Folge andauernder Stressbelastung erklären.

#### **4.1.3. Einfluss der Passagierung auf das Dimer/Monomer-Verhältnis**

Durch reduzierte Verfügbarkeit des Kofaktors  $BH_4$  sowie oxidativen Stress wird das Uncoupling der enzymatischen Aktivität der eNOS hervorgerufen. Als Folge kommt es zur Bildung großer Mengen Anionen-Radikale durch die eNOS, die damit den schädigenden Mechanismus aus exzessiver ROS-Produktion und NO-Abbau triggert. Der Mechanismus des Uncoupling verdeutlicht, dass eine hohe eNOS-Expression nicht zwangsläufig mit einer hohen NO-Produktion assoziiert ist (Forstermann 2008). Die Quantifizierung der eNOS-Dimerisierung ist deshalb ein bedeutender Aspekt bei der Beurteilung der eNOS-Aktivität und der NO-Produktion (Cai et al. 2002). Klatt et al. konnten mit einer Low-temperature PAGE ohne vorheriges Erhitzen der Proben neben nNOS-Monomeren die Bildung der dimeren nNOS nachweisen (Klatt et al. 1995). In den vorliegenden Experimenten wurde mittels Low-temperature PAGE die eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung der monomeren und dimeren eNOS in Passage 1-5 analysiert. Dabei zeigten sich im Western Blot die monomere Bande bei 135 kDa und die dimere eNOS-Bande bei 260 kDa. Dies ist konsistent mit Low-temperature PAGE mit humanen und bovinen Aortenendothelzellen (Cai et al. 2005, Chen et al. 2014).

Nagata et al. konnten nach Aldosteron-Behandlung in HUVEC-Zellen eine Verringerung der eNOS-Expression im Dimer/Monomer-Verhältnisses, trotz fehlender Unterschiede in der Expression im konventionellen Western Blot, detektieren (Nagata et al. 2006). Die Bestimmung des Dimer/Monomer-Verhältnisses ist bedeutend, da sich auch gezeigt hat, dass es bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Myokardinfarkten zu Veränderungen im Dimer/Monomer-Verhältnis der eNOS kommt (Cai et al. 2005, Taverne et al. 2012). Bendall et al. konnten zeigen, dass das eNOS Dimer/Monomer-Verhältnis als Marker des eNOS-Uncoupling dient (Bendall et al. 2005). Nach Auswertung der vorliegenden Western Blots von HUVEC-Zellen ergab sich für Passage 1 und 2 für eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung ein deutlich erhöhtes Dimer/Monomer-Verhältnis. Dieses zeigt das überwiegende Vorliegen der dimeren Form der eNOS an. Zudem konnten in dieser Arbeit das Vorkommen der Ser-1177-Phosphorylierung sowohl im Dimer als auch im Monomer detektiert werden, wobei Passage 1 und 2 die Phosphorylierung überwiegend im Dimer zeigten. Chen et al. konnten zeigen, dass die aktivierende Serin-Phosphorylierung in bovinen Aortenendothelzellen nur in eNOS-Dimeren nachzuweisen ist, wohingegen die inhibierende Thr-497-Phosphorylierung sowohl im Dimer als auch im Monomer beobachtet wurde (Chen et al. 2014).

Demzufolge ergaben die vorliegenden Experimente ein unterschiedliches Dimer/Monomer-Verhältnis zwischen den Passagen mit Vorkommen der aktivierenden Ser-1177-Phosphorylierung sowohl im Monomer als auch im Dimer. Die Passagen 1 und 2 zeigten insbesondere im Dimer eine Zunahme der Ser-1177-Phosphorylierung.

#### **4.1.4. Stimulation und Inhibition der NO-Produktion**

Die Detektion der NO-Produktion kann mittels DAF-FM DA erfolgen, wobei der Nachweis auf der Umwandlung von DAF-FM DA in die fluoreszierende Triazole DAF-FM T und DAF-2-T beruht (Kojima et al. 1998, Nakatsubo et al. 1998, Cortese-Krott et al. 2012). Durch diesen Detektionsmechanismus wurde in den vorliegenden Experimenten die NO-Produktion nach Behandlung mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME sowie einem stimulierenden Calcium-Ionophor bestimmt. Mit 0,5  $\mu$ M DAF-FM DA zeigten sich die Unterschiede in der NO-Produktion am deutlichsten. Eine Inhibition der eNOS in HUVEC-Zellen ergab sich bei 100  $\mu$ M L-NAME. In der Literatur ist die Hemmung der eNOS durch verschiedene L-NAME-Konzentrationen bekannt. Heiss et al. zeigten durch Verwendung von 200  $\mu$ M L-NAME eine Inhibition der eNOS-Aktivität in HUVEC-Zellen mittels eines modifizierten DAF 2-Assays (Heiss et al. 2009), wobei Pittarella et al. eine L-NAME-Konzentration von 1000  $\mu$ M zur Hemmung der eNOS in HUVEC-Zellen wählten (Pittarella et al. 2015). Weiterführende Experimente von Litterio et al. konnten zeigen, dass das in dieser Arbeit thematisierte (-)-Epicatechin den L-NAME vermittelten Abfall der eNOS-Aktivität verhindert (Litterio et al. 2012). Damit wird nahegelegt, dass

(-)-Epicatechin Einfluss auf Inhibitoren der eNOS ausübt. Dimmeler et al. beschrieben, dass sowohl eine Calcium-abhängige als auch eine Calcium-unabhängige eNOS-Aktivierung existiert (Dimmeler et al. 1999). Der hier verwendete Calcium-Ionophor, der bekanntlich einen Anstieg der zyttoplasmatischen Calciumionen-Konzentration bewirkt, steigerte in den vorliegenden Experimenten die eNOS-Aktivität auf das über 2-fache. Die Erhöhung der NO-Produktion nach Behandlung mit einem Calcium-Ionophor ist in der Literatur bereits bei tierischen Aortenzellen beschrieben (Minor et al. 1990) und basiert vermutlich auf einer Aktivierung der zytosolischen NO-Produktion durch freies Calcium (Mayer et al. 1989, Mulsch et al. 1989). Busse et al. konnten zudem nachweisen, dass die  $Ca^{2+}$ -abhängige Aktivierung der NO-Synthase in endothelialen Zellen durch Calmodulin vermittelt wird (Busse et al. 1990). Das intrazelluläre Calcium aktiviert dabei Calmodulin und bewirkt somit die Dimerbildung der eNOS (Fleming et al. 1999). Auch ist bekannt, dass die Blockade von  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanälen die NO-Produktion in HUVEC-Zellen senkt (Sheng et al. 2007). Mit diesen Experimenten konnte demnach gezeigt werden, dass die eNOS in den ausgewählten HUVEC-Passagen aktiv ist und die Aktivität von stimulierenden Substanzen und Inhibitoren moduliert werden kann. Demzufolge kann das HUVEC-Modell für die Untersuchung der Wirkung von (-)-Epicatechin auf die eNOS verwendet werden.

## **4.2. Effekte von (-)-Epicatechin**

### **4.2.1. Toxizität von $H_2O_2$ auf (-)-Epicatechin-vorbehandelte Endothelzellen**

Hohe  $H_2O_2$ -Konzentrationen sind toxisch für Endothelzellen und werden als Modell für oxidativen Stress verwendet (Halliwell et al. 2000, Long et al. 2000). Zur Charakterisierung der schützenden Effekte von (-)-Epicatechin wurden die HUVEC-Zellen steigenden  $H_2O_2$ -Konzentrationen ausgesetzt. In der durchgeführten 24-stündigen Behandlung mit  $H_2O_2$  ergab sich eine 50% letale Dosis ( $LD_{50}$ ) bei 800  $\mu M$   $H_2O_2$  für unbehandelte Zellen und für (-)-Epicatechin 10 - und 100  $\mu M$ -behandelte Zellen. HUVEC-Zellen mit einer (-)-Epicatechin-Behandlung von 1  $\mu M$  zeigten eine  $LD_{50}$  über 1000  $\mu M$ . Die Erhöhung des  $LD_{50}$ -Wertes ist dabei Ausdruck der schützenden Wirkung von (-)-Epicatechin 1  $\mu M$  gegenüber durch  $H_2O_2$  verursachten oxidativen Stress. Ohne (-)-Epicatechin-Behandlung ist bei Endothelzellen aus Rattenaorten nach 24-stündiger  $H_2O_2$ -Behandlung eine  $LD_{50}$  von 1000  $\mu M$  beschrieben (Cortese et al. 2008). Spencer et al. zeigten unter  $H_2O_2$ -Behandlung einen protektiven Effekt von (-)-Epicatechin und 3'-O-Methyl(-)-Epicatechin (5 - 30  $\mu M$ ) auf den Zelltod von Fibroblasten (Spencer et al. 2001). Auch das Flavanonol Dihydromyricetin (37,5 - 300  $\mu M$ ) schützt HUVEC-Zellen vor  $H_2O_2$ -induziertem oxidativem Schaden, wobei sich eine stufenweise Abnahme der Zellviabilität mit ansteigenden  $H_2O_2$ -Konzentrationen von 100 - bis 800  $\mu M$  und einem maximalen Zellschaden bei 800  $\mu M$  zeigt (Hou et al. 2015). Chow et al. konnten zeigen, dass niedrige Dosen des

Flavonols Quercetin einen zytoprotektiven Effekt in Makrophagen vermitteln. Dabei bewirkt Quercetin in einer Konzentration von unter 100  $\mu\text{M}$  einen signifikanten Abfall der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Peroxid-Produktion (Chow et al. 2005). Eine Inhibition der oxidativen DNA-Schädigung durch niedrige Quercetin-Konzentrationen konnte auch von Johnson et. al gezeigt werden, wobei höhere Konzentrationen DNA-Schädigungen durch prooxidative Aktivitäten induzierten (Johnson et al. 2000). Betrachtet man Quercetin als Vergleichssubstanz des (-)-Epicatechins, könnte der protektive Effekt von (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  konzentrationsbedingt hierüber erklärbar sein. Eine Induktion der eNOS Gen-Expression ist in der Literatur nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Exposition als kompensatorische Reaktion auf den vaskulären oxidativen Stress beschrieben (Cai et al. 2001). Somit scheint die schützende Wirkung über die Beeinflussung von NO einen denkbaren Mechanismus zur Erklärung der protektiven Effekte von (-)-Epicatechin darzustellen. Die in diesen Experimenten beobachteten Effekte von (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  auf das Wachstum der Zellen sind noch nicht in der Literatur erwähnt worden. Lediglich durch Reznichenko et al. ist beschrieben, dass das Flavanol Epigallocatechingallate eine Stimulation des neuronalen Wachstums bewirkt (Reznichenko et al. 2005). Zusammenfassend konnte mit den vorliegenden Experimenten gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  einen protektiven Effekt gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induziertem oxidativen Stress vermittelt.

#### **4.2.2. Unspezifische $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion im Medium nach (-)-Epicatechin-Behandlung**

Halliwell et. al konnten zeigen, dass die Zugabe von phenolhaltigen Komponenten wie (-)-Epigallocatechin, (-)-Epigallocatechingallate, (+)-Catechin und Quercetin mit Konzentrationen größer 10  $\mu\text{M}$  die schnelle Entstehung von signifikanten Mengen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Zellkulturmedien (Dulbecco's modified Eagles' medium [DMEM], RPMI, and McCoy's 5A medium) ohne Zellen induziert (Halliwell et al. 2000). Da unspezifische  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Formationen im Medium Effekte ausüben können, welche die spezifischen biochemischen Effekte der Flavanole verbergen, beeinflussen oder bewirken können (Long et al. 2000), wurden in den Versuchen nach (-)-Epicatechin-Behandlung (1-100  $\mu\text{M}$ ) die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von zellfreien und zellhaltigen Medien bestimmt. Dies ist nötig, um spätere antioxidative Effekte (-)-Epicatechin zuschreiben zu können. In den vorliegenden Experimenten konnte durch Zugabe von (-)-Epicatechin zu Endothelial Cell Growth Medium complete keine signifikante  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung in Ab- oder Anwesenheit von Zellen beobachtet werden. Als Positivkontrolle wurde TBHQ verwendet, das bekanntermaßen eine Aktivierung von Nrf-2 bewirkt (Lee et al. 2001, Kraft et al. 2004). Cummings et al. konnten zeigen, dass TBHQ die NADPH-Oxidase zur Produktion von Superoxiden stimuliert (Cummings et al. 1983). Eine übermäßige Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Hydroxyl-Radikalen durch TBHQ konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Kahl et al. 1989). Als weitere Aspekte sollten zusätzliche Störfaktoren bei der Interpretation der (-)-Epicatechinwirkung berücksichtigt werden, die die Wirkung beeinflussen können. In der Literatur ist beschrieben, dass

das vom Flavanol Epigallocatechin produzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch im Medium enthaltenes  $\alpha$ -Ketoglutarat und Pyruvat abgefangen werden kann (Long et al. 2009, Long et al. 2011). Anhand der vorliegenden Experimente konnte abschließend gezeigt werden, dass es nach (-)-Epicatechin-Behandlung zu keiner unspezifischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im Medium kommt.

#### **4.2.3. Einfluss von (-)-Epicatechin auf eNOS und pSer-1177-eNOS**

Es ist bekannt, dass (-)-Epicatechin-haltige Nahrungsmittel und Getränke einen positiven Effekt auf das kardiovaskuläre System mit Wiederherstellung der endothelialen Funktion durch ansteigende Bioverfügbarkeit von NO ausüben (Schroeter et al. 2006, Heiss et al. 2007, Balzer et al. 2008, Hooper et al. 2008). Zudem führen sie zu einer Verbesserung der Insulin-Sensitivität, einem Abfall des Blutdruckes (Murphy et al. 2003, Taubert et al. 2007, Desch et al. 2010), zur Stimulation der myokardialen Angiogenese (Ramirez-Sanchez et al. 2012) sowie der Reduktion der Thrombozytenaggregation (Busse et al. 1987). In dieser Arbeit wurden Western Blots durchgeführt, um Erkenntnisse zu erhalten, ob 1 -, 10 - und 100  $\mu$ M (-)-Epicatechin die eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 auf Proteinebene verändert. Hiermit soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob die Wirkung von (-)-Epicatechin auf Endothelzellen über die Beeinflussung der eNOS vermittelt wird. Bei Behandlung mit 1 -, 10 - und 100  $\mu$ M (-)-Epicatechin zeigte sich eine Erhöhung der eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177, wobei (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M den größten Effekt ausübt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen von Ramirez-Sanchez et al., die zeigen konnte, dass (-)-Epicatechin die eNOS-Phosphorylierung in humanen Koronarendothelzellen erhöhen und die eNOS-Aktivierung und NO-Produktion mittels dem PI3K/AKT/PKA und Ca<sup>2+</sup>/CaMKII-Signalweg induzieren kann (Ramirez-Sanchez et al. 2010). Ramirez-Sanchez et al. konnten nachweisen, dass (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M Calcium-unabhängig die Phosphorylierung von Ser-1177, Ser-633 und Ser-615 erhöht, nicht aber die Phosphorylierung an Thr-495 verändert (Ramirez-Sanchez et al. 2011). Die maximalen Effekte auf die NO-Produktion wurden in der Literatur (Ramirez-Sanchez et al. 2010) sowie auch in den vorliegenden Ergebnissen durch Behandlung mit (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M beschrieben. Auch Steffen et al. konnten verifizieren, dass es bei 24-stündiger Behandlung mit (-)-Epicatechin 10  $\mu$ M zu einer Erhöhung der NO-Produktion in Endothelzellen kommt. Die Erhöhung der NO-Produktion ist dabei auf eine Inhibition der NADPH-Oxidase zurückzuführen (Steffen et al. 2007), wodurch (-)-Epicatechin einen Kurzeiteffekt ausübt (Schewe et al. 2008). Auf mRNA-Ebene konnten Wallerath et al. zeigen, dass (-)-Epicatechin in Konzentrationen von 1 - 33  $\mu$ M keinen nennenswerten Effekt auf die eNOS mRNA-Expression in HUVEC-Zellen vermittelt (Wallerath et al. 2005), wobei deren Beeinflussung als Langzeiteffekt von (-)-Epicatechin beschrieben ist (Schewe et al. 2008). Folglich ergab sich in den vorliegenden Experimenten, dass (-)-Epicatechin 1 -, 10 - und 100  $\mu$ M die Expression der eNOS sowie die

eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 erhöhen. Die unmittelbare Beeinflussung der eNOS durch Regulation der Expression scheint einen entscheidenden Mechanismus in der Effektvermittlung von (-)-Epicatechin darzustellen.

#### **4.2.4. Einfluss von (-)-Epicatechin-Metaboliten auf eNOS und pSer-1177-eNOS**

Von besonderem Interesse ist (-)-Epicatechin, weil sich gezeigt hat, dass seine Metaboliten in-vivo bioaktive Moleküle sind (Schroeter et al. 2006), die höhere Plasmaspiegel erreichen als Metaboliten von anderen Flavanolen (Baba et al. 2001, Manach et al. 2004). Da an den (-)-Epicatechineffekten vermutlich die schnell gebildeten (-)-Epicatechin-Metaboliten wesentlich beteiligt sind (Ottaviani et al. 2012), wurden die Expression der eNOS sowie der eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 nach Behandlung mit den (-)-Epicatechin-Metaboliten (3G, 3S, 5S) mittels Western Blot analysiert. In den vorliegenden Experimenten bewirkten insbesondere (-)-Epicatechin 1  $\mu\text{M}$  sowie die niedrigen Konzentrationen (0,5  $\mu\text{M}$ ) der (-)-Epicatechin-Metaboliten (5S, 3G, 3S) unter Kultivierung mit Endothelial Cell Growth Medium complete eine Hochregulation der eNOS-Expression sowie eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177. Die (-)-Epicatechin-Metaboliten in höheren Konzentrationen (2,5 -, 5  $\mu\text{M}$ ) bewirkten unter diesen Bedingungen keine Hochregulation der eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung. Die Ergebnisse von Ramirez-Sanchez et al. bezüglich der (-)-Epicatechinwirkung wurden zuvor bereits erwähnt. Die Effekte der (-)-Epicatechin-Metaboliten 3G, 3S und 5S sind in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Bezüglich der konzentrationsabhängigen Wirkungen bei (-)-Epicatechin ist bekannt, dass Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  größere Effekte vermitteln als die höheren Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  (Ramirez-Sanchez et al. 2010). Wippel et al. konnten bei (-)-Epicatechin-Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$  eine Inhibition der eNOS-Aktivität feststellen (Wippel et al. 2004). Ähnliche konzentrationsinverse Effekte sind auch bei dem engverwandten Flavanol Epigallocatechingallat sowie dem Flavonol Quercetin beschrieben. Johnson et al. berichteten, dass niedrige Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) von Epigallocatechingallat und Quercetin die oxidativ bedingte DNA-Schädigung hemmen, wohingegen hohe Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) DNA-Schäden durch prooxidative Aktivität induzieren (Johnson et al. 2000). Chen et al. vermuteten diesbezüglich, dass niedrige Konzentrationen freie Radikale abfangen und so den oxidativen Schaden der zellulären DNA hemmen (Chen et al. 2003). In der Literatur ist auch beschrieben, dass Quercetin in Dosierungen höher als 100  $\mu\text{M}$  als zytotoxisches Agens wirken und die Apoptose induzieren kann (Granado-Serrano et al. 2006). Über ähnliche konzentrationsabhängige Effekte bei (-)-Epicatechin-Metaboliten gibt es keine derartigen Erkenntnisse.

Die hier vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die (-)-Epicatechin-Metaboliten (3G, 3S, 5S) in niedrigen Konzentrationen (0,5  $\mu\text{M}$ ) unter Kultivierung mit Endothelial Cell Growth Medium

complete eine Hochregulation der eNOS-Expression sowie der eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 bewirken. Die (-)-Epicatechin-Metaboliten in höheren Konzentrationen (2,5 -, 5  $\mu$ M) konnten dies jedoch nicht verursachen. Der ähnlich wie bei (-)-Epicatechin bestehende Effekt auf Proteinebene, dass niedrige Konzentrationen größere Effekte vermitteln, konnte auch für die (-)-Epicatechin-Metaboliten (3G, 3S, 5S) in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden. Zusammenfassend wird die Wirkung von (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten vermutlich konzentrationsabhängig vermittelt, wobei auf Proteinebene geringere Konzentration tendenziell größere Effekte ausüben.

#### **4.2.5. Starving und die Beeinflussung der (-)-Epicatechin- und Metabolitenwirkung**

Der oxidative Stress in Zellen wird beim Starving gesteigert (Kohno et al. 2012), wobei angenommen wird, dass protektive und antioxidative Mechanismen hochreguliert werden. Kohno et al. konnten in einer Fibroblasten-ähnlichen Zelllinie durch den Starving-bedingten Stress eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung induzieren (Kohno et al. 2012). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich unter Starving-Bedingungen die Effekte auf die eNOS-Expression und insbesondere die eNOS-Phosphorylierung an Ser-1177 deutlich ausgeprägter darstellen. Dabei kommt es auch nach Behandlung mit (-)-Epicatechin-Metaboliten höherer Konzentrationen (5  $\mu$ M) zu einer Hochregulation der eNOS-Expression und eNOS-Phosphorylierung. Bisher sind in der Literatur die Effekte von (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten unter Starving-Bedingungen kaum erforscht. Reznichenko et al. konnten unter Starving zeigen, dass das Flavanol Epigallocatechingallate den Untergang von Nervenzellen verhindert. Zudem verbesserte die 24-stündige Behandlung mit Epigallocatechingallate (0,1 -, 1  $\mu$ M) die Zellmorphologie und vermittelte neuronales Wachstum (Reznichenko et al. 2005). Unter Toxin-verursachten Stressbedingungen konnte nach Vorbehandlung mit dem Flavonol Quercetin der Abfall der stressbedingten Nitritproduktion beobachtet werden, wohingegen Quercetin ohne Stressbedingungen keinen Effekt auf die Nitritproduktion vermittelte (Ramya et al. 2013). Die durchgeführten Experimente erbrachten, dass (-)-Epicatechin und seine Metaboliten durch Starving-verursachten oxidativen Stress größere Effekte auf die NO-produzierende eNOS vermitteln als unter Normalbedingungen. Diese Erkenntnisse zeigen an, dass insbesondere unter oxidativem Stress die Wirkung von (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten entscheidende Mechanismen auslösen, die dem oxidativem Stress entgegenwirken. Vermutlich wird dabei die protektive Wirkung auf die Endothelzellen auch über eine Modulation der NO-Produktion bewirkt.

### **4.3. Effekte von (-)-Epicatechin auf die Transkriptionsfaktoren Nrf-1 und Nrf-2**

#### **4.3.1. (-)-Epicatechin bewirkt die Nrf-2 Translokation in den Zellkern**

Der redoxensitive Transkriptionsfaktor Nrf-2 ist von besonderem Interesse, da unter oxidativem Stress die Modulation von antioxidativen Mechanismen bewirkt wird (Myhrstad et al. 2002). In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin die Translokation von Nrf-2 in den Zellkern induziert. Die Induzierbarkeit der Kerntranslokation von Nrf-2 durch NO konnte in der Literatur bereits beschrieben werden (Cortese et al. 2008, Luna-Lopez et al. 2010). In kortikalen Astrozyten konnte eine Akkumulation von Nrf-2 im Zellkern nach Behandlung mit 100 nM (-)-Epicatechin sowie 100 µM TBHQ gezeigt werden (Bahia et al. 2008). Ramyaa et al. konnten in hepatozellulären Karzinomzellen nachweisen, dass nach Vorbehandlung mit dem Flavonol Quercetin gefolgt von einer oxidativen Stressinduktion durch ein Toxin, eine Nrf-2 Translokation in den Kern induziert werden kann. Eine Nrf-2-Translokation nach Quercetin Behandlung wurde dabei nach 2 Stunden beobachtet, mit einem Maximum nach 4 Stunden und einem Abfall nach 6 Stunden (Ramyaa et al. 2013). In den vorliegenden Experimenten bewirkt insbesondere die Behandlung mit 100 µM (-)-Epicatechin, aber auch 10 µM (-)-Epicatechin, eine Zunahme des Fluoreszenz-Signals im Zellkern. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich die Induktion der Nrf-2-Kerntranslokation durch (-)-Epicatechin in HUVEC-Zellen hervorrufen lässt, wobei die Kerntranslokation ohne Stressbedingungen zu beobachten ist.

#### **4.3.2. (-)-Epicatechin vermittelt eine Verminderung der Nrf-2-/Nrf-1-Expression**

Nrf-1 und Nrf-2 haben überlappende Aufgaben in der Regulation der basalen Expression von ARE-haltigen antioxidativen Genen, wobei die induzierbare Expression größtenteils Nrf-2-abhängig vermittelt wird (Biswas et al. 2010). Der engverwandte Transkriptionsfaktor Nrf-1 scheint bevorzugt prooxidative Gene zu aktivieren (Ohtsuji et al. 2008) und liegt in verschiedenen Isoformen (p120, p95, p65) vor (Chepelev et al. 2013). Insbesondere die 65 kDa N-terminale-abgeschnittene Form ist konstitutiv im Zellkern lokalisiert (Wang et al. 2006, Wang et al. 2007) und wirkt als Inhibitor des Nrf-2/EpRE-Signalwegs (Chepelev et al. 2013). Da bekannt ist, dass die transkriptionale Aktivität von Nrf-2 durch oxidative und elektrophile Moleküle induziert werden kann (Buckley et al. 2008, Zhu et al. 2008, Baird et al. 2011), ist auch eine Beeinflussung durch (-)-Epicatechin denkbar. Wobei möglich wäre, dass Flavanoide in der Lage sind die Interaktion zwischen Keap-1 und Nrf-2 zu modifizieren (Myhrstad et al. 2002). In den vorliegenden Western Blots von Kernextrakten wurde die Nrf-2- und Nrf-1-Expression untersucht, wobei nach (-)-Epicatechin-Behandlung eine Runterregulation von Nrf-2 und Nrf-1 auf Proteinebene nachgewiesen wurde. Als Positivkontrolle wurde TBHQ eingesetzt, das in der Literatur als Induktor des Transkriptionsfaktors Nrf-2 etabliert ist (Bryan et al. 2013). Ngugen et

al. konnten unter TBHQ-Behandlung (50  $\mu\text{M}$ ) bereits eine erhöhte Nrf-2 Expression durch Beeinflussung der Proteinstabilität von Nrf-2 feststellen (Nguyen et al. 2003); jedoch konnte keine Beeinflussung von Nrf-1 im Sinne einer Hochregulation gezeigt werden. Bei dem Transkriptionsfaktor Nrf-2 wurden in der Literatur zwei Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht (98 und 118 kDa) im Western Blot detektiert (Pi et al. 2007). In den vorliegenden Experimenten zeigte sich eine Nrf-2 Banden bei 98 kDa. Eine weitere Nrf-2-Bande bei 118 kDa ließ sich in den Blots mit Kernextrakten nicht nachweisen. Zudem wurde eine Nrf-1-Bande bei 65 kDa lokalisiert. Dies ist konsistent mit den Beobachtungen von Wang et al., nachdem sich die Isoform (p65) im Zellkern befindet und sich daher bei den hier verwendeten Kernextrakten als eine Bande bei 65 kDa detektieren lässt. Ramyaa et al. konnten eine Erhöhung der Nrf-2 Expression in humanen Leberkarzinomzellen nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  des verwandten Flavonol Quercetin beobachten (Ramyaa et al. 2013). Es ist jedoch hervorzuheben, dass die in der Arbeit vorliegenden Versuche unter Normalbedingungen d.h. ohne Vorliegen von oxidativem Stress durchgeführt wurden. Mit diesen Experimenten konnte abschließend eine Runterregulation von Nrf-2 und Nrf-1 auf Proteinebene nach (-)-Epicatechin-Behandlung beobachtet werden. Da bereits die (-)-Epicatechin- bzw. Metaboliten-Behandlungen eine deutliche Zunahme der eNOS-Expression unter Starving-Bedingungen bewirken konnte, ist es möglich, dass auch der Transkriptionsfaktor Nrf-2 nur unter oxidativem Stress beeinflusst wird.

#### **4.3.3. Beeinflussung der ARE-Genexpression durch (-)-Epicatechin**

Die Aktivierung von Nrf-2 führt zu einem Anstieg der ARE-Genexpression, die die Induktion von HO-1 und anderen Phase II antioxidativen Enzymen beeinflusst (Kobayashi et al. 2004). In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin auf Genebene durch vermehrte Nrf-2-Bindung an ARE, eine Beeinflussung antioxidativer Mechanismen bewirkt. (-)-Epicatechin 10  $\mu\text{M}$  vermittelt dabei den größten Effekt auf die ARE-Bindung. Dies ist vereinbar mit in der Literatur bereits beschriebenen Resultaten von Bahia et al., wobei sich nach Behandlung mit 1 -, 10 - und 100  $\mu\text{M}$  (-)-Epicatechin einen Anstieg der ARE-vermittelten Expression zeigte (Bahia et al. 2008). Das engverwandte Flavonol Quercetin vermittelt während Ethanol-Behandlung ebenfalls einen Anstieg der ARE-Genexpression in humanen Hepatozyten (Yao et al. 2007). Zusammenfassend wurde bei (-)-Epicatechin eine vermehrte Nrf-2-Bindung an ARE beobachtet, wobei 10  $\mu\text{M}$  (-)-Epicatechin den größten Effekt ausübt. Die Ergebnisse der Nrf-2-Translokation sowie der ARE-Bindung legen nahe, dass Nrf-2 eher durch die höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  beeinflusst wird.

#### **4.4. Beeinflussung des Redoxstatus durch (-)-Epicatechin und seine Metaboliten**

##### **4.4.1. (-)-Epicatechin verändert die Expression von Redoxproteinen**

Es ist bekannt, dass Flavanoide wie das (-)-Epicatechin Gegenstand des enzymatischen und mikrobiellen Metabolismus im Gastrointestinaltrakt und in der Leber sind und dass die dadurch entstandenen glukoronidierten, methylierten und sulfatierten Produkte im zirkulierenden Plasma vorzufinden sind (Day et al. 1998, Spencer et al. 1999). Da strukturelle Modifikationen die biologische Aktivität der Flavonoide beeinflussen (Nanjo et al. 1996, Harada et al. 1999, Spencer et al. 2001), ist es wichtig die einzelnen Metaboliten bezüglich ihrer spezifischen Effekte zu untersuchen. In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu$ M) sowie die (-)-Epicatechin-Metaboliten (5S, 3G, 3S) unter normalen Bedingungen mit Kultivierung der HUVEC-Zellen in Endothelial Cell Growth Medium complete keine vermehrte Expression der Redoxproteine bewirken. Wobei HO-1 insbesondere durch (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M runterreguliert wird und eine Runterregulation von CAT und SOD neben (-)-Epicatechin, vor allem durch die (-)-Epicatechin-Metaboliten vermittelt wird. Gleichermäßen beeinflusst von (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten zeigte sich GPx. Es wird vermutet, dass HO-1 eine Schlüsselrolle in den Abwehrmechanismen gegen oxidative Schädigung einnimmt (Takahashi et al. 2004), wobei es durch verschiedene Stressstimuli wie Häm, Schwermetalle, UV-Licht, Lipopolysaccharide, Temperaturwechsel und Hyperoxie stark hochreguliert wird (Ryter et al. 2002). Bei Scherstress konnte eine Induktion der Genexpression von HO-1 über den Nrf-2-Keap-1-Signalweg nachgewiesen werden (Warabi et al. 2007). In der Literatur sind hemmende Effekte von (-)-Epicatechin- und seinen Metaboliten auf HO-1 bisher nicht beschrieben. Chow et al konnten zeigen, dass das engverwandte Flavonol Quercetin die HO-1 Expression induzieren kann (Chow et al. 2005), wobei Quercetin durch die HO-1-Induktion einen protektiven Effekt gegen alkoholischen oxidativen Stress in humanen Hepatozyten vermittelt (Yao et al. 2007). Epigallocatechingallat bewirkt unter ischämischen Stressbedingungen ebenfalls eine Erhöhung der HO-1-Expression (Han et al. 2014). Eine Hochregulation der HO-1-Expression durch Flavanoide ist durch Aktivierung der Bindung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 an die ARE-Region in Endothelzellen bekannt (Lin et al. 2004, Chow et al. 2005). Weitere Effekte wurden durch Heiss et al. beschrieben, die durch Induktion von HO-1 eine Runterregulation der eNOS nachweisen konnten (Heiss et al. 2009). Verglichen mit den obengenannten Effekten engverwandter Flavonoide bewirken sowohl (-)-Epicatechin (1 -, 10 -, 100  $\mu$ M) als auch die Metaboliten (5S, 3G, 3S) in den vorliegenden Experimenten unter Starving eine Hochregulation der HO-1. Die Hochregulation von HO-1 wird dabei am stärksten durch (-)-Epicatechin 1  $\mu$ M hervorgerufen.

Eine Runterregulation der SOD, CAT und GPx durch (-)-Epicatechin und seine Metaboliten lässt sich nur teilweise bei engverwandten Substanzen in der Literatur wiederfinden. Tamilselvam et al. konnten nach Behandlung mit dem Flavanon-Glykosid Hesperidin einen signifikanten Abfall der SOD-, CAT- und GPx-Aktivität nachweisen (Tamilselvam et al. 2013). Bei Mäusen konnte nach Behandlung mit Catechinen ebenfalls ein starker Abfall der GPx-Level und jedoch aber einen signifikanter Anstieg des SOD-Levels beobachtet werden (Simos et al. 2012). Des Weiteren ist nach 24-stündiger Behandlung von humanen Fibroblasten mit dem Flavanol Epigallocatechingallat (25 -, 50 µM) ein erheblicher Anstieg der Genexpression und Aktivität von SOD, CAT und GPx beschrieben (Meng et al. 2008). Unter Starving zeigen die vorliegenden Experimente jedoch eine Hochregulation der Expression dieser antioxidativen Enzyme (HO-1, SOD, CAT, GPx) sowohl bei Behandlung mit (-)-Epicatechin als auch mit (-)-Epicatechin-Metaboliten. Dabei wird die SOD insbesondere durch (-)-Epicatechin-Metaboliten hochreguliert, wohingegen die CAT stärker durch (-)-Epicatechin beeinflusst wird. GPx wird sowohl von (-)-Epicatechin als auch von seinen Metaboliten hochreguliert. Die durchgeführten Versuchsergebnisse unter Starving sind mit der oben erwähnten Literatur, die unterschiedliche Effekte der verschiedenen Flavonoide zeigt, nur unzureichend zu vergleichen. Auch sind die Stressbedingungen bei den Experimenten zu berücksichtigen. Ergebnisse von Ramyaa et al. ergaben eine signifikante Runterregulation von SOD, CAT und GPx in Toxin-behandelten Zellen, wobei die Vorbehandlung mit dem Flavonol Quercetin die Aktivität der antioxidativen Enzyme signifikant erhöhte (Ramyaa et al. 2013). Diese Ergebnisse legen nahe, dass es unter Stressbedingungen zur Induktion von antioxidativen Enzymen durch Flavonoide kommen kann. In Bezug auf konzentrationsabhängige Effekte konnten Wang et al. bei dem (-)-Epicatechin-verwandten Flavanol Epigallocatechingallat erweiterte Erkenntnisse über die Beeinflussung von SOD, CAT und GPx generieren (Wang et al. 2015). Basierend auf den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin und seine Metaboliten unter Normalbedingungen keine Hochregulation der antioxidativen Enzyme HO-1, SOD, CAT und GPx bewirken. Unter oxidativem Stress verursacht durch Starving werden jedoch Effekte von (-)-Epicatechin und seiner Metaboliten auf die hier untersuchten antioxidativen Enzyme vermittelt.

#### **4.4.2. (-)-Epicatechin-Metaboliten haben Einfluss auf die Glutamacysteinligase (GCL)-Expression**

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der GSH-De-novo Synthese wird katalysiert durch die  $\gamma$ -Glutamylcysteinylase, die aus einer katalytischen (GCLC) und einer regulatorischen Untereinheit (GCLM) besteht (Franklin et al. 2009). Warabi et al. konnten zeigen, dass die Genexpression von GCLM durch Scherstress über den Nrf-2-Keap-1-Signalweg induziert wird (Warabi et al. 2007). Die Erkenntnisse konnten durch Kwong et al. erweitert werden, wobei bei Nrf-1-Mangel in Fibroblasten

reduzierte GSH-Level und eine reduzierte GCLM-Expression mit verbesserter Empfindlichkeit zu Oxidantien beobachtet wurde (Kwong et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden Western Blots durchgeführt, um eine mögliche Beeinflussung auf Proteinniveau von (-)-Epicatechin und seinen Metaboliten auf die Glutamylcysteinligase zu untersuchen. Es ergab sich bei Kultivierung der HUVEC-Zellen in Endothelial Cell Growth Medium complete keine Hochregulation sowohl der GCLC- als auch GCLM-Expression. Wobei unter Starving-Bedingungen die GCLC- und die GCLM-Expression deutlich hochreguliert wurden. In einer Fibroblasten-ähnlichen Zelllinie konnte das Flavonol Quercetin eine Erhöhung der Expression der regulatorischen und katalytischen Untereinheit der Glutamylcysteinligase bedingen (Myhrstad et al. 2002). Auch Versuche unter Stressbedingungen, hervorgerufen durch Ischämie des Kortex von Mäusen, konnten bei Behandlung mit dem Flavanol Epigallocatechingallat zu einem Anstieg der GCLC- und GCLM-Expression führen (Han et al. 2014). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Experimente ableiten, dass die GCLC und die GCLM durch (-)-Epicatechin und seine Metaboliten nur unter oxidativem Stress (Starving) im Sinne einer Hochregulation beeinflusst werden.

#### **4.4.3. Effekte zwischen (-)-Epicatechin und Glutathion**

Glutathion (GSH) ist ein bedeutendes Antioxidans und ein wichtiger Kofaktor für eine Vielzahl von Enzymen, die an der Metabolisierung und Elimination von endogenen Komponenten und Fremdstoffen beteiligt sind (Wu et al. 2004). Die durchgeführten Fluoreszenz-Messungen von HUVEC-Zellen ergaben, dass (-)-Epicatechin keinen Einfluss auf das GSH/GSSG-Level dieser Endothelzellen ausübt. Bahin et al. konnten in kortikalen Astrozyten einen signifikanten Anstieg im GSH/GSSG-Level durch (-)-Epicatechin 100 nM beobachten (Bahia et al. 2008). Bisher unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe an Mäusen konnten zeigen, dass die GSH-Level in der Aorta und im Plasma nach (-)-Epicatechin-Behandlung nicht beeinflusst werden, wohingegen sich in der Lunge und im Herz ein signifikanter Anstieg der GSH-Konzentration auf das über 2-fache darstellt. Keinen Einfluss auf das GSH-Level konnte ebenfalls bei dem Flavonol Quercetin gezeigt werden (Ramya et al. 2013). Es konnte nachweisen werden, dass die Vorbehandlung mit dem Flavonol Quercetin gefolgt von einer Behandlung mit Toxinen zu einer Wiederherstellung der GSH-Level führten. (Ramya et al. 2013). Die Ergebnisse von Ramya et al. sind vereinbar mit Ergebnissen von Tamilselvam et al., wobei bei Toxin-behandelten Neuroblastomzellen durch Vorbehandlung mit dem Flavanon-Glykosid Hesperidin ein signifikanten Anstieg der GSH-Level im Vergleich zu nur Toxin-behandelten Zellen detektiert wurde (Tamilselvam et al. 2013). Die Ergebnisse zum GSH/GSSG-Level in (-)-Epicatechin-behandelten Zellen sind vereinbar mit den vorherigen Ergebnissen der Proteinexpression von GCLC- und GCLM nach (-)-Epicatechin- bzw. Metaboliten-Behandlung, wonach sich erst unter Starving eine Hochregulation der beiden GCL-Untereinheiten zeigte. Es ist denkbar,

dass sich Effekte auf das GSH/GSSG-Level durch (-)-Epicatechin erst unter Bedingungen des oxidativen Stresses bzw. anderen (-)-Epicatechin-Konzentrationen zeigen. Anhand der Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass (-)-Epicatechin unter Normalbedingungen keinen Einfluss auf das GSH/GSSG-Level in HUVEC-Zellen ausübt.

## 5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Mechanismen der vaskulären Effekte des Flavanols (-)-Epicatechin auf endotheliale HUVEC-Zellen. Die positiven Effekte von Flavanolen auf das kardiovaskuläre System sind in der Literatur beschrieben, dennoch sind die grundlegenden Mechanismen der Effektvermittlung noch nicht geklärt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin sowohl Effekte auf die NO-Bioverfügbarkeit durch Beeinflussung der eNOS als auch auf den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf-2 und auf antioxidative Enzyme in der Zellkultur ausübt. Unter Stressbedingungen verursacht durch Starving konnte eine deutliche Erhöhung der eNOS-Expression, der eNOS-Phosphorylierung, der Expression von Redoxproteinen (HO-1, SOD, CAT, GPx) sowie der Expression der in der Glutathionsynthese entscheidenden Glutamatcysteinylgase (GCLC, GCLM) nachgewiesen werden. Auch konnte durch (-)-Epicatechin eine Induktion der Translokation von Nrf-2 sowie eine erhöhte Bindung von Nrf-2 an ARE gezeigt werden. Zusammenfassend führt sowohl die erhöhte NO-Produktion durch die eNOS als auch der reduzierte Verbrauch durch eine Nrf-2-vermittelte Steigerung der antioxidativen Mechanismen zu einer erhöhten endothelialen Bioverfügbarkeit von NO. Diese Mechanismen sind an der Vermittlung des positiven Effekte von (-)-Epicatechin auf das kardiovaskuläre System beteiligt.

Weiterführend ist von Interesse die Expression von inhibierenden eNOS-Phosphorylierungen (u.a. Thr495, Ser116, Tyr 657) in den unterschiedlichen HUVEC-Passagen zu analysieren, um die eNOS-Aktivität weiter charakterisieren zu können. Da Xia et al. zeigen konnten, dass das Polyphenol Resveratrol das Uncoupling in kardiovaskulären Zellen verhindern kann, wäre auch denkbar, dass (-)-Epicatechin einen Effekt auf das Uncoupling der eNOS ausüben könnte. Auch der Einfluss von (-)-Epicatechin auf eNOS-Inhibitoren stellt einen interessanten Forschungsansatz dar, wobei Litterio et al. bereits zeigen konnten, dass (-)-Epicatechin den L-NAME vermittelten Abfall der eNOS-Aktivität verhindert.

Experimente unter Stressbedingungen könnten weiteren Aufschluss über die Beeinflussung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors Nrf-2 durch (-)-Epicatechin erbringen. Dabei ist die Weiterführung von Experimenten mit (-)-Epicatechin-Konzentrationen im Bereich von 1  $\mu$ M wesentlich, da 1  $\mu$ M (-)-Epicatechin in den vorliegenden Experimenten die größten Effekte vermittelte. Auch konnte gezeigt werden, dass die (-)-Epicatechin-Metaboliten wirksame Effekte ausüben, die der weiteren Erforschung bedürfen, um die Wirkung der (-)-Epicatechine im Ganzen verstehen zu können. Bei der Beurteilung der in-vivo Wirkung von (-)-Epicatechin ist die Rate bzw. der Umfang der Absorption, die metabolische Umsetzung, die Bindung an Serumalbumin bzw.

zellulären Proteine, die Plasmalevel von Aglykonen und Konjugaten, die Akkumulation in Zielzellen wie dem vaskulären Endothel, die Ausscheidungsrate im Urin sowie die molekularen Wirkungsweisen von Bedeutung (Schewe et al. 2008). Dies veranschaulicht, dass es weiterer intensiver Forschungen bedarf, um die komplexen Prozesse vollständig entschlüsseln zu können.

## Literaturverzeichnis

- Actis-Goretta, L., A. Leveques, F. Giuffrida, F. Romanov-Michailidis, F. Viton, D. Barron, M. Duenas-Paton, S. Gonzalez-Manzano, C. Santos-Buelga, G. Williamson and F. Dionisi (2012). "Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans." Free Radic Biol Med **53**(4): 787-795.
- Andrew, P. J. and B. Mayer (1999). "Enzymatic function of nitric oxide synthases." Cardiovasc Res **43**(3): 521-531.
- Angermayr, B., M. Mejias, J. Gracia-Sancho, J. C. Garcia-Pagan, J. Bosch and M. Fernandez (2006). "Heme oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation, and increases VEGF expression in portal hypertensive rats." J Hepatol **44**(6): 1033-1039.
- Anter, E., S. R. Thomas, E. Schulz, O. M. Shapira, J. A. Vita and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols." J Biol Chem **279**(45): 46637-46643.
- Baba, S., N. Osakabe, M. Natsume, Y. Muto, T. Takizawa and J. Terao (2001). "In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats." J Nutr **131**(11): 2885-2891.
- Bahia, P. K., M. Rattray and R. J. Williams (2008). "Dietary flavonoid (-)-epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant response element activity and up-regulates glutathione in cortical astrocytes." J Neurochem **106**(5): 2194-2204.
- Baird, L. and A. T. Dinkova-Kostova (2011). "The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway." Arch Toxicol **85**(4): 241-272.
- Bala, K., K. Ambwani and N. K. Gohil (2011). "Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: implication on use of higher passage cells." Tissue Cell **43**(4): 216-222.
- Balligand, J. L., O. Feron and C. Dessy (2009). "eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues." Physiol Rev **89**(2): 481-534.
- Balyasnikova, I. V., S. M. Danilov, V. R. Muzykantov and A. B. Fisher (1998). "Modulation of angiotensin-converting enzyme in cultured human vascular endothelial cells." In Vitro Cell Dev Biol Anim **34**(7): 545-554.
- Balzer, J., T. Rassaf, C. Heiss, P. Kleinbongard, T. Lauer, M. Merx, N. Heussen, H. B. Gross, C. L. Keen, H. Schroeter and M. Kelm (2008). "Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial." J Am Coll Cardiol **51**(22): 2141-2149.
- Baudin, B., A. Bruneel, N. Bosselut and M. Vaubourdolle (2007). "A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells." Nat Protoc **2**(3): 481-485.
- Bendall, J. K., N. J. Alp, N. Warrick, S. Cai, D. Adlam, K. Rockett, M. Yokoyama, S. Kawashima and K. M. Channon (2005). "Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression." Circ Res **97**(9): 864-871.

- Bevers, L. M., B. Braam, J. A. Post, A. J. van Zonneveld, T. J. Rabelink, H. A. Koomans, M. C. Verhaar and J. A. Joles (2006). "Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase." Hypertension **47**(1): 87-94.
- Biswas, M. and J. Y. Chan (2010). "Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 16-20.
- Blankenberg, S., H. J. Rupprecht, C. Bickel, M. Torzewski, G. Hafner, L. Tiret, M. Smieja, F. Cambien, J. Meyer and K. J. Lackner (2003). "Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease." N Engl J Med **349**(17): 1605-1613.
- Bryan, H. K., A. Olayanju, C. E. Goldring and B. K. Park (2013). "The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation." Biochem Pharmacol **85**(6): 705-717.
- Buckley, B. J., S. Li and A. R. Whorton (2008). "Keap1 modification and nuclear accumulation in response to S-nitrosocysteine." Free Radic Biol Med **44**(4): 692-698.
- Bulleid, N. J. and L. Ellgaard (2011). "Multiple ways to make disulfides." Trends Biochem Sci **36**(9): 485-492.
- Busse, R., A. Luckhoff and E. Bassenge (1987). "Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **336**(5): 566-571.
- Busse, R. and A. Mulsch (1990). "Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin." FEBS Lett **265**(1-2): 133-136.
- Cai, H., M. E. Davis, G. R. Drummond and D. G. Harrison (2001). "Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(10): 1571-1576.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-844.
- Cai, S., N. J. Alp, D. Denise McDonald, I. Smith, J. Kay, L. Canevari, S. Heales and K. M. Channon (2002). "GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerisation."
- Cai, S., J. Khoo and K. M. Channon (2005). "Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells." Cardiovasc Res **65**(4): 823-831.
- Cassuto, J., H. Dou, I. Czikora, A. Szabo, V. S. Patel, V. Kamath, E. Belin de Chantemele, A. Feher, M. J. Romero and Z. Bagi (2014). "Peroxynitrite disrupts endothelial caveolae leading to eNOS uncoupling and diminished flow-mediated dilation in coronary arterioles of diabetic patients." Diabetes **63**(4): 1381-1393.
- Channon, K. M. (2004). "Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease." Trends Cardiovasc Med **14**(8): 323-327.
- Chen, W., H. Xiao, A. N. Rizzo, W. Zhang, Y. Mai and M. Ye (2014). "Endothelial nitric oxide synthase dimerization is regulated by heat shock protein 90 rather than by phosphorylation." PLoS One **9**(8): e105479.
- Chen, Y. C., S. C. Shen and H. Y. Lin (2003). "Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids." Biochem Pharmacol **66**(7): 1139-1150.

Chen, Z. P., K. I. Mitchelhill, B. J. Michell, D. Stapleton, I. Rodriguez-Crespo, L. A. Witters, D. A. Power, P. R. Ortiz de Montellano and B. E. Kemp (1999). "AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase." FEBS Lett **443**(3): 285-289.

Chepelev, N. L., H. Zhang, H. Liu, S. McBride, A. J. Seal, T. E. Morgan, C. E. Finch, W. G. Willmore, K. J. Davies and H. J. Forman (2013). "Competition of nuclear factor-erythroid 2 factors related transcription factor isoforms, Nrf1 and Nrf2, in antioxidant enzyme induction." Redox Biol **1**(1): 183-189.

Chow, J. M., S. C. Shen, S. K. Huan, H. Y. Lin and Y. C. Chen (2005). "Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages." Biochem Pharmacol **69**(12): 1839-1851.

Cortese-Krott, M. M., A. Rodriguez-Mateos, G. G. Kuhnle, G. Brown, M. Feelisch and M. Kelm (2012). "A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins." Free Radic Biol Med **53**(11): 2146-2158.

Cortese, M. M., C. V. Suschek, W. Wetzler, K. D. Kroncke and V. Kolb-Bachofen (2008). "Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis." Free Radic Biol Med **44**(12): 2002-2012.

Cosentino, F., S. Patton, L. V. d'Uscio, E. R. Werner, G. Werner-Felmayer, P. Moreau, T. Malinski and T. F. Luscher (1998). "Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats." J Clin Invest **101**(7): 1530-1537.

Cummings, S. W. and R. A. Prough (1983). "Butylated hydroxyanisole-stimulated NADPH oxidase activity in rat liver microsomal fractions." J Biol Chem **258**(20): 12315-12319.

Day, A. J., M. S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M. J. Rhodes, M. R. Morgan and G. Williamson (1998). "Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity." FEBS Lett **436**(1): 71-75.

Dernbach, E., C. Urbich, R. P. Brandes, W. K. Hofmann, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2004). "Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress." Blood **104**(12): 3591-3597.

Desch, S., J. Schmidt, D. Kobler, M. Sonnabend, I. Eitel, M. Sareban, K. Rahimi, G. Schuler and H. Thiele (2010). "Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis." Am J Hypertens **23**(1): 97-103.

Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse and A. M. Zeiher (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.

Donovan, J. L., J. R. Bell, S. Kasim-Karakas, J. B. German, R. L. Walzem, R. J. Hansen and A. L. Waterhouse (1999). "Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine." J Nutr **129**(9): 1662-1668.

Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller and T. V. Kurzchalia (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." Science **293**(5539): 2449-2452.

Fisslthaler, B., A. E. Loot, A. Mohamed, R. Busse and I. Fleming (2008). "Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin." Circ Res **102**(12): 1520-1528.

- Fleming, I. and R. Busse (1999). "Signal transduction of eNOS activation." Cardiovasc Res **43**(3): 532-541.
- Fleming, I. and R. Busse (2003). "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(1): R1-12.
- Fleming, I., B. Fisslthaler, S. Dimmeler, B. E. Kemp and R. Busse (2001). "Phosphorylation of Thr495 Regulates Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity." Circulation Research **88**(11): e68-e75.
- Forstermann, U. (2008). "Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **5**(6): 338-349.
- Forstermann, U. (2010). "Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease." Pflugers Arch **459**(6): 923-939.
- Forstermann, U., J. P. Boissel and H. Kleinert (1998). "Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)." Faseb j **12**(10): 773-790.
- Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.
- Franklin, C. C., D. S. Backos, I. Mohar, C. C. White, H. J. Forman and T. J. Kavanagh (2009). "Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase." Mol Aspects Med **30**(1-2): 86-98.
- Fulton, D., J. E. Church, L. Ruan, C. Li, S. G. Sood, B. E. Kemp, I. G. Jennings and R. C. Venema (2005). "Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83." J Biol Chem **280**(43): 35943-35952.
- Garcia-Cardena, G., R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos and W. C. Sessa (1998). "Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90." Nature **392**(6678): 821-824.
- Garcin, E. D., C. M. Bruns, S. J. Lloyd, D. J. Hosfield, M. Tiso, R. Gachhui, D. J. Stuehr, J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2004). "Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase." J Biol Chem **279**(36): 37918-37927.
- Gharavi, N. M., N. A. Baker, K. P. Mouillesseaux, W. Yeung, H. M. Honda, X. Hsieh, M. Yeh, E. J. Smart and J. A. Berliner (2006). "Role of endothelial nitric oxide synthase in the regulation of SREBP activation by oxidized phospholipids." Circ Res **98**(6): 768-776.
- Ghosh, D. K., C. Wu, E. Pitters, M. Moloney, E. R. Werner, B. Mayer and D. J. Stuehr (1997). "Characterization of the inducible nitric oxide synthase oxygenase domain identifies a 49 amino acid segment required for subunit dimerization and tetrahydrobiopterin interaction." Biochemistry **36**(35): 10609-10619.
- Goldsmith, J. C., J. J. McCormick and A. Yen (1984). "Endothelial cell cycle kinetics. Changes in culture and correlation with endothelial properties." Lab Invest **51**(6): 643-647.
- Granado-Serrano, A. B., M. A. Martin, L. Bravo, L. Goya and S. Ramos (2006). "Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2)." J Nutr **136**(11): 2715-2721.

Halliwell, B., M. V. Clement, J. Ramalingam and L. H. Long (2000). "Hydrogen Peroxide. Ubiquitous in Cell Culture and In vivo?" IUBMB Life **50**: 251-257.

Han, J., M. Wang, X. Jing, H. Shi, M. Ren and H. Lou (2014). "(-)-Epigallocatechin gallate protects against cerebral ischemia-induced oxidative stress via Nrf2/ARE signaling." Neurochem Res **39**(7): 1292-1299.

Harada, M., Y. Kan, H. Naoki, Y. Fukui, N. Kageyama, M. Nakai, W. Miki and Y. Kiso (1999). "Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin." Biosci Biotechnol Biochem **63**(6): 973-977.

Harrison, D. G. (1997). "Endothelial function and oxidant stress." Clin Cardiol **20**(11 Suppl 2): li-11-17.

Hasegawa, N., M. Yamamoto, T. Imamura, Y. Mitsui and K. Yamamoto (1988). "Evaluation of long-term cultured endothelial cells as a model system for studying vascular ageing." Mech Ageing Dev **46**(1-3): 111-123.

Hayashi, I. and G. H. Sato (1976). "Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium." Nature **259**(5539): 132-134.

Hecker, M., A. Mulsch, E. Bassenge, U. Forstermann and R. Busse (1994). "Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications." Biochem J **299** ( Pt 1): 247-252.

Heim, K. E., A. R. Tagliaferro and D. J. Bobilya (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." J Nutr Biochem **13**(10): 572-584.

Heiss, C., D. Finis, P. Kleinbongard, A. Hoffmann, T. Rassaf, M. Kelm and H. Sies (2007). "Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week." J Cardiovasc Pharmacol **49**(2): 74-80.

Heiss, C., C. L. Keen and M. Kelm (2010). "Flavanols and cardiovascular disease prevention." Eur Heart J **31**(21): 2583-2592.

Heiss, E. H., D. Schachner, E. R. Werner and V. M. Dirsch (2009). "Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels." J Biol Chem **284**(46): 31579-31586.

Herranz, B., S. Marquez, B. Guijarro, E. Aracil, C. Aicart-Ramos, I. Rodriguez-Crespo, I. Serrano, M. Rodriguez-Puyol, C. Zaragoza and M. Saura (2012). "Integrin-linked kinase regulates vasomotor function by preventing endothelial nitric oxide synthase uncoupling: role in atherosclerosis." Circ Res **110**(3): 439-449.

Higashi, Y., K. Noma, M. Yoshizumi and Y. Kihara (2009). "Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases." Circ J **73**(3): 411-418.

Hooper, L., P. A. Kroon, E. B. Rimm, J. S. Cohn, I. Harvey, K. A. Le Cornu, J. J. Ryder, W. L. Hall and A. Cassidy (2008). "Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials." Am J Clin Nutr **88**(1): 38-50.

Hou, X., Q. Tong, W. Wang, W. Xiong, C. Shi and J. Fang (2015). "Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways." Life Sci **130**: 38-46.

- Ignarro, L. J. (2002). "Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview." J Physiol Pharmacol **53**(4 Pt 1): 503-514.
- Ishii, T., K. Itoh, E. Ruiz, D. S. Leake, H. Unoki, M. Yamamoto and G. E. Mann (2004). "Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal." Circ Res **94**(5): 609-616.
- Ishii, T., K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai and M. Yamamoto (2000). "Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages." J Biol Chem **275**(21): 16023-16029.
- Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto and Y. Nabeshima (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 313-322.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel and M. Yamamoto (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." Genes Dev **13**(1): 76-86.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-2756.
- Janssen-Heininger, Y. M., J. D. Nolin, S. M. Hoffman, J. L. van der Velden, J. E. Tully, K. G. Lahue, S. T. Abdalla, D. G. Chapman, N. L. Reynaert, A. van der Vliet and V. Anathy (2013). "Emerging mechanisms of glutathione-dependent chemistry in biology and disease." J Cell Biochem **114**(9): 1962-1968.
- Jiang, F., S. J. Roberts, Datla, Sr. and G. J. Dusting (2006). "NO modulates NADPH oxidase function via heme oxygenase-1 in human endothelial cells." Hypertension **48**(5): 950-957.
- Johnson, M. K. and G. Loo (2000). "Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA." Mutat Res **459**(3): 211-218.
- Jung, O., S. L. Marklund, N. Xia, R. Busse and R. P. Brandes (2007). "Inactivation of extracellular superoxide dismutase contributes to the development of high-volume hypertension." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(3): 470-477.
- Kahl, R., S. Weinke and H. Kappus (1989). "Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole." Toxicology **59**(2): 179-194.
- Kaspar, J. W., S. K. Niture and A. K. Jaiswal (2009). "Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress." Free Radic Biol Med **47**(9): 1304-1309.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi and S. Biswal (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.
- Kim, D. H., I. S. Sohng, K. Kobashi and M. J. Han (1996). "Purification and characterization of beta-glucosidase from Bacteroides JY-6, a human intestinal bacterium." Biol Pharm Bull **19**(9): 1121-1125.
- Klatt, P., K. Schmidt, D. Lehner, O. Glatter, H. P. Bachinger and B. Mayer (1995). "Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer." Embo j **14**(15): 3687-3695.

- Kobayashi, A., T. Ohta and M. Yamamoto (2004). "Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes." Methods Enzymol **378**: 273-286.
- Koes, R., W. Verweij and F. Quattrocchio (2005). "Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways." Trends Plant Sci **10**(5): 236-242.
- Kohno, T., Y. Kubo, K. Yasui, M. Haraguchi, S. Shigematsu, K. J. Chua, T. Matsuyama and H. Hayashi (2012). "Serum starvation activates NF-kappaB through G protein beta2 subunit-mediated signal." DNA Cell Biol **31**(11): 1636-1644.
- Kojima, H., N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata and T. Nagano (1998). "Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins." Anal Chem **70**(13): 2446-2453.
- Kraft, A. D., D. A. Johnson and J. A. Johnson (2004). "Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult." J Neurosci **24**(5): 1101-1112.
- Kuhnle, G., J. P. Spencer, H. Schroeter, B. Shenoy, E. S. Debnam, S. K. Srail, C. Rice-Evans and U. Hahn (2000). "Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 507-512.
- Kumar, S. and A. K. Pandey (2013). "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview." ScientificWorldJournal **2013**: 162750.
- Kwong, M., Y. W. Kan and J. Y. Chan (1999). "The CNC basic leucine zipper factor, Nrf1, is essential for cell survival in response to oxidative stress-inducing agents. Role for Nrf1 in gamma-gcs(I) and gss expression in mouse fibroblasts." J Biol Chem **274**(52): 37491-37498.
- Landmesser, U., S. Dikalov, S. R. Price, L. McCann, T. Fukai, S. M. Holland, W. E. Mitch and D. G. Harrison (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." J Clin Invest **111**(8): 1201-1209.
- Laursen, J. B., M. Somers, S. Kurz, L. McCann, A. Warnholtz, B. A. Freeman, M. Tarpey, T. Fukai and D. G. Harrison (2001). "Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin." Circulation **103**(9): 1282-1288.
- Lee, J. M., J. D. Moehlenkamp, J. M. Hanson and J. A. Johnson (2001). "Nrf2-dependent activation of the antioxidant responsive element by tert-butylhydroquinone is independent of oxidative stress in IMR-32 human neuroblastoma cells." Biochem Biophys Res Commun **280**(1): 286-292.
- Lee, M. J., Z. Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, D. A. Balentine and C. S. Yang (1995). "Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(4): 393-399.
- Li, C., L. Ruan, S. G. Sood, A. Papapetropoulos, D. Fulton and R. C. Venema (2007). "Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells." Vascul Pharmacol **47**(5-6): 257-264.
- Li, W. G., F. J. Miller, Jr., H. J. Zhang, D. R. Spitz, L. W. Oberley and N. L. Weintraub (2001). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced O<sub>2</sub> production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury." J Biol Chem **276**(31): 29251-29256.
- Lin, H. C., T. H. Cheng, Y. C. Chen and S. H. Juan (2004). "Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by quercetin in rat aortic smooth muscle cells." Pharmacology **71**(2): 107-112.

- Lin, M. I., D. Fulton, R. Babbitt, I. Fleming, R. Busse, K. A. Pritchard, Jr. and W. C. Sessa (2003). "Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production." J Biol Chem **278**(45): 44719-44726.
- Litterio, M. C., G. Jagers, G. Sagdicoglu Celep, A. M. Adamo, M. A. Costa, P. I. Oteiza, C. G. Fraga and M. Galleano (2012). "Blood pressure-lowering effect of dietary (-)-epicatechin administration in L-NAME-treated rats is associated with restored nitric oxide levels." Free Radic Biol Med **53**(10): 1894-1902.
- Liu, J., G. Garcia-Cardena and W. C. Sessa (1996). "Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization." Biochemistry **35**(41): 13277-13281.
- Long, L. H., M. V. Clement and B. Halliwell (2000). "Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media." Biochem Biophys Res Commun **273**(1): 50-53.
- Long, L. H. and B. Halliwell (2009). "Artefacts in cell culture: pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 700-704.
- Long, L. H. and B. Halliwell (2011). "Artefacts in cell culture: alpha-Ketoglutarate can scavenge hydrogen peroxide generated by ascorbate and epigallocatechin gallate in cell culture media." Biochem Biophys Res Commun **406**(1): 20-24.
- Luna-Lopez, A., F. Triana-Martinez, N. E. Lopez-Diazguerrero, J. L. Ventura-Gallegos, M. C. Gutierrez-Ruiz, P. Damian-Matsumura, A. Zentella, L. E. Gomez-Quiroz and M. Konigsberg (2010). "Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts." Free Radic Biol Med **49**(7): 1192-1204.
- Machiels, B. M., F. C. Ramaekers, H. J. Kuijpers, J. S. Groenewoud, J. W. Oosterhuis and L. H. Looijenga (1997). "Nuclear lamin expression in normal testis and testicular germ cell tumours of adolescents and adults." J Pathol **182**(2): 197-204.
- Manach, C. and J. L. Donovan (2004). "Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans." Free Radic Res **38**(8): 771-785.
- Mancuso, C. (2004). "Heme oxygenase and its products in the nervous system." Antioxid Redox Signal **6**(5): 878-887.
- Mann, G. E., D. J. Rowlands, F. Y. Li, P. de Winter and R. C. Siow (2007). "Activation of endothelial nitric oxide synthase by dietary isoflavones: role of NO in Nrf2-mediated antioxidant gene expression." Cardiovasc Res **75**(2): 261-274.
- Mayer, B., K. Schmidt, P. Humbert and E. Bohme (1989). "Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca<sup>2+</sup>-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase." Biochem Biophys Res Commun **164**(2): 678-685.
- McCabe, T. J., D. Fulton, L. J. Roman and W. C. Sessa (2000). "Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation." J Biol Chem **275**(9): 6123-6128.

- Meng, Q., C. N. Velalar and R. Ruan (2008). "Effects of epigallocatechin-3-gallate on mitochondrial integrity and antioxidative enzyme activity in the aging process of human fibroblast." Free Radic Biol Med **44**(6): 1032-1041.
- Michell, B. J., M. B. Harris, Z. P. Chen, H. Ju, V. J. Venema, M. A. Blackstone, W. Huang, R. C. Venema and B. E. Kemp (2002). "Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635." J Biol Chem **277**(44): 42344-42351.
- Minor, R. L., Jr., P. R. Myers, R. Guerra, Jr., J. N. Bates and D. G. Harrison (1990). "Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta." J Clin Invest **86**(6): 2109-2116.
- Morita, T. (2005). "Heme oxygenase and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(9): 1786-1795.
- Motohashi, H. and M. Yamamoto (2004). "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism." Trends Mol Med **10**(11): 549-557.
- Mulsch, A., E. Bassenge and R. Busse (1989). "Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **340**(6 Pt 2): 767-770.
- Murphy, K. J., A. K. Chronopoulos, I. Singh, M. A. Francis, H. Moriarty, M. J. Pike, A. H. Turner, N. J. Mann and A. J. Sinclair (2003). "Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (Theobroma cacao) inhibit platelet function." Am J Clin Nutr **77**(6): 1466-1473.
- Myhrstad, M. C., H. Carlsen, O. Nordstrom, R. Blomhoff and J. O. Moskaug (2002). "Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter." Free Radic Biol Med **32**(5): 386-393.
- Nagata, D., M. Takahashi, K. Sawai, T. Tagami, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Hirata and M. Naruse (2006). "Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity." Hypertension **48**(1): 165-171.
- Nakatsubo, N., H. Kojima, K. Kikuchi, H. Nagoshi, Y. Hirata, D. Maeda, Y. Imai, T. Irimura and T. Nagano (1998). "Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins." FEBS Lett **427**(2): 263-266.
- Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai and Y. Hara (1996). "Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical." Free Radic Biol Med **21**(6): 895-902.
- Neveu, V., J. Perez-Jimenez, F. Vos, V. Crespy, L. du Chaffaut, L. Mennen, C. Knox, R. Eisner, J. Cruz, D. Wishart and A. Scalbert (2010). "Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods." Database (Oxford) **2010**: bap024.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt, H. C. Huang, C. S. Yang and C. B. Pickett (2003). "Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome." J Biol Chem **278**(7): 4536-4541.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt and C. B. Pickett (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 233-260.

- Nichols, W. W., E. B. Buynak, C. Bradt, R. Hill, M. Aronson, B. E. Jarrell, S. N. Mueller and E. M. Levine (1987). "Cytogenetic evaluation of human endothelial cell cultures." J Cell Physiol **132**(3): 453-462.
- Ohara, Y., T. E. Peterson and D. G. Harrison (1993). "Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production." J Clin Invest **91**(6): 2546-2551.
- Ohtsuji, M., F. Katsuoka, A. Kobayashi, H. Aburatani, J. D. Hayes and M. Yamamoto (2008). "Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes." J Biol Chem **283**(48): 33554-33562.
- Okushio, K., M. Suzuki, N. Matsumoto, F. Nanjo and Y. Hara (1999). "Identification of (-)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat." Drug Metab Dispos **27**(2): 309-316.
- Ostertag, L. M., N. O'Kennedy, P. A. Kroon, G. G. Duthie and B. de Roos (2010). "Impact of dietary polyphenols on human platelet function--a critical review of controlled dietary intervention studies." Mol Nutr Food Res **54**(1): 60-81.
- Ottaviani, J. I., T. Y. Momma, C. Heiss, C. Kwik-Urbe, H. Schroeter and C. L. Keen (2011). "The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo." Free Radic Biol Med **50**(2): 237-244.
- Ottaviani, J. I., T. Y. Momma, G. K. Kuhnle, C. L. Keen and H. Schroeter (2012). "Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards." Free Radic Biol Med **52**(8): 1403-1412.
- Ozaki, M., S. Kawashima, T. Yamashita, T. Hirase, M. Namiki, N. Inoue, K. Hirata, H. Yasui, H. Sakurai, Y. Yoshida, M. Masada and M. Yokoyama (2002). "Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice." J Clin Invest **110**(3): 331-340.
- Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Palmer, R. M., D. S. Ashton and S. Moncada (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-666.
- Pi, J., Y. Bai, J. M. Reece, J. Williams, D. Liu, M. L. Freeman, W. E. Fahl, D. Shugar, J. Liu, W. Qu, S. Collins and M. P. Waalkes (2007). "Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2." Free Radic Biol Med **42**(12): 1797-1806.
- Pittarella, P., D. F. Squarzanti, C. Molinari, M. Invernizzi, F. Uberti and F. Reno (2015). "NO-dependent proliferation and migration induced by Vitamin D in HUVEC." J Steroid Biochem Mol Biol **149**: 35-42.
- Poderoso, J. J. (2009). "The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide." Arch Biochem Biophys **484**(2): 214-220.
- Pou, S., W. S. Pou, D. S. Bredt, S. H. Snyder and G. M. Rosen (1992). "Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase." J Biol Chem **267**(34): 24173-24176.
- Pritchard, K. A., Jr., A. W. Ackerman, E. R. Gross, D. W. Stepp, Y. Shi, J. T. Fontana, J. E. Baker and W. C. Sessa (2001). "Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **276**(21): 17621-17624.
- Ramirez-Sanchez, I., L. Maya, G. Ceballos and F. Villarreal (2010). "(-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways." Hypertension **55**(6): 1398-1405.

- Ramirez-Sanchez, I., L. Maya, G. Ceballos and F. Villarreal (2011). "(-)-Epicatechin induces calcium and translocation independent eNOS activation in arterial endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **300**(4): C880-887.
- Ramirez-Sanchez, I., L. Nogueira, A. Moreno, A. Murphy, P. Taub, G. Perkins, G. M. Ceballos, M. Hogan, M. Malek and F. Villarreal (2012). "Stimulatory effects of the flavanol (-)-epicatechin on cardiac angiogenesis: additive effects with exercise." J Cardiovasc Pharmacol **60**(5): 429-438.
- Ramyaa, P., R. Krishnaswamy and V. V. Padma (2013). "Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells - up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF-kappaB and COX-2." Biochim Biophys Acta **1840**(1): 681-692.
- Rassaf, T., C. Heiss, U. Hendgen-Cotta, J. Balzer, S. Matern, P. Kleinbongard, A. Lee, T. Lauer and M. Kelm (2006). "Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation." Free Radic Biol Med **41**(2): 295-301.
- Rechner, A. R., M. A. Smith, G. Kuhnle, G. R. Gibson, E. S. Debnam, S. K. Srail, K. P. Moore and C. A. Rice-Evans (2004). "Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products." Free Radic Biol Med **36**(2): 212-225.
- Reznichenko, L., T. Amit, M. B. Youdim and S. Mandel (2005). "Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite outgrowth." J Neurochem **93**(5): 1157-1167.
- Rodriguez-Mateos, A., M. J. Oruna-Concha, C. Kwik-Urbe, A. Vidal and J. P. Spencer (2012). "Influence of sugar type on the bioavailability of cocoa flavanols." Br J Nutr **108**(12): 2243-2250.
- Roura, E., C. Andres-Lacueva, O. Jauregui, E. Badia, R. Estruch, M. Izquierdo-Pulido and R. M. Lamuela-Raventos (2005). "Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans." J Agric Food Chem **53**(16): 6190-6194.
- Ryter, S. W. and A. M. Choi (2002). "Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress." Antioxid Redox Signal **4**(4): 625-632.
- Schewe, T., Y. Steffen and H. Sies (2008). "How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper." Arch Biochem Biophys **476**(2): 102-106.
- Schnorr, O., T. Brossette, T. Y. Momma, P. Kleinbongard, C. L. Keen, H. Schroeter and H. Sies (2008). "Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo." Arch Biochem Biophys **476**(2): 211-215.
- Schroeter, H., C. Heiss, J. Balzer, P. Kleinbongard, C. L. Keen, N. K. Hollenberg, H. Sies, C. Kwik-Urbe, H. H. Schmitz and M. Kelm (2006). "(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(4): 1024-1029.
- Sessa, W. C. (2009). "Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 35-37.
- Shah, Z. A., R. C. Li, A. S. Ahmad, T. W. Kensler, M. Yamamoto, S. Biswal and S. Dore (2010). "The flavanol (-)-epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway." J Cereb Blood Flow Metab **30**(12): 1951-1961.

- Sheng, J. Z. and A. P. Braun (2007). "Small- and intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **293**(1): C458-467.
- Shimokawa, H., N. A. Flavahan and P. M. Vanhoutte (1991). "Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries." Circulation **83**(2): 652-660.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.
- Sies, H. (1999). "Glutathione and its role in cellular functions." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 916-921.
- Simos, Y. V., Verginadis, I. K. Toliopoulos, A. P. Velalopoulou, I. V. Karagounis, S. C. Karkabounas and A. M. Evangelou (2012). "Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo." Redox Rep **17**(5): 181-186.
- Song, Y., A. J. Cardounel, J. L. Zweier and Y. Xia (2002). "Inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase by heat shock protein 90: implications in NOS regulation." Biochemistry **41**(34): 10616-10622.
- Spencer, J. P., G. Chowrimootoo, R. Choudhury, E. S. Debnam, S. K. Srail and C. Rice-Evans (1999). "The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids." FEBS Lett **458**(2): 224-230.
- Spencer, J. P., H. Schroeter, G. Kuhnle, S. K. Srail, R. M. Tyrrell, U. Hahn and C. Rice-Evans (2001). "Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation." Biochem J **354**(Pt 3): 493-500.
- Steffen, J., M. Seeger, A. Koch and E. Kruger (2010). "Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop." Mol Cell **40**(1): 147-158.
- Steffen, Y., C. Gruber, T. Schewe and H. Sies (2008). "Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase." Arch Biochem Biophys **469**(2): 209-219.
- Steffen, Y., T. Jung, L. O. Klotz, T. Schewe, T. Grune and H. Sies (2007). "Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin." Free Radic Biol Med **42**(7): 955-970.
- Steffen, Y., T. Schewe and H. Sies (2005). "Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase." Biochem Biophys Res Commun **331**(4): 1277-1283.
- Steffen, Y., T. Schewe and H. Sies (2006). "Myeloperoxidase-mediated LDL oxidation and endothelial cell toxicity of oxidized LDL: attenuation by (-)-epicatechin." Free Radic Res **40**(10): 1076-1085.
- Steffen, Y., T. Schewe and H. Sies (2007). "(-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase." Biochem Biophys Res Commun **359**(3): 828-833.
- Stocker, R. and M. A. Perrella (2006). "Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases?" Circulation **114**(20): 2178-2189.
- Takahashi, T., K. Morita, R. Akagi and S. Sassa (2004). "Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries." Curr Med Chem **11**(12): 1545-1561.
- Tamilselvam, K., N. Braid, T. Manivasagam, M. M. Essa, N. R. Prasad, S. Karthikeyan, A. J. Thenmozhi, S. Selvaraju and G. J. Guillemin (2013). "Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on

rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease." Oxid Med Cell Longev **2013**: 102741.

Taubert, D., R. Roesen, C. Lehmann, N. Jung and E. Schomig (2007). "Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial." Jama **298**(1): 49-60.

Taverne, Y. J., V. J. de Beer, B. A. Hoogteijling, R. P. Juni, A. L. Moens, D. J. Duncker and D. Merkus (2012). "Nitroso-redox balance in control of coronary vasomotor tone." J Appl Physiol (1985) **112**(10): 1644-1652.

Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-344.

Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo and K. A. Pritchard, Jr. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9220-9225.

Wagener, F. A., H. D. Volk, D. Willis, N. G. Abraham, M. P. Soares, G. J. Adema and C. G. Figdor (2003). "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation." Pharmacol Rev **55**(3): 551-571.

Wallerath, T., H. Li, U. Godtel-Ambrust, P. M. Schwarz and U. Forstermann (2005). "A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase." Nitric Oxide **12**(2): 97-104.

Wang, D., Y. Wang, X. Wan, C. S. Yang and J. Zhang (2015). "Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate triggered hepatotoxicity in mice: responses of major antioxidant enzymes and the Nrf2 rescue pathway." Toxicol Appl Pharmacol **283**(1): 65-74.

Wang, W. and J. Y. Chan (2006). "Nrf1 is targeted to the endoplasmic reticulum membrane by an N-terminal transmembrane domain. Inhibition of nuclear translocation and transacting function." J Biol Chem **281**(28): 19676-19687.

Wang, W., A. M. Kwok and J. Y. Chan (2007). "The p65 isoform of Nrf1 is a dominant negative inhibitor of ARE-mediated transcription." J Biol Chem **282**(34): 24670-24678.

Wang, Y., M. Qiao, J. J. Mieyal, L. M. Asmis and R. Asmis (2006). "Molecular mechanism of glutathione-mediated protection from oxidized low-density lipoprotein-induced cell injury in human macrophages: role of glutathione reductase and glutaredoxin." Free Radic Biol Med **41**(5): 775-785.

Warabi, E., W. Takabe, T. Minami, K. Inoue, K. Itoh, M. Yamamoto, T. Ishii, T. Kodama and N. Noguchi (2007). "Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species." Free Radic Biol Med **42**(2): 260-269.

Warnholtz, A., G. Nickenig, E. Schulz, R. Macharzina, J. H. Brasen, M. Skatchkov, T. Heitzer, J. P. Stasch, K. K. Griendling, D. G. Harrison, M. Bohm, T. Meinertz and T. Munzel (1999). "Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system." Circulation **99**(15): 2027-2033.

Werner, E. R., A. C. Gorren, R. Heller, G. Werner-Felmayer and B. Mayer (2003). "Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects." Exp Biol Med (Maywood) **228**(11): 1291-1302.

- White, C. R., V. Darley-USmar, W. R. Berrington, M. McAdams, J. Z. Gore, J. A. Thompson, D. A. Parks, M. M. Tarpey and B. A. Freeman (1996). "Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8745-8749.
- Wilcox, J. N., R. R. Subramanian, C. L. Sundell, W. R. Tracey, J. S. Pollock, D. G. Harrison and P. A. Marsden (1997). "Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 2479-2488.
- Williams, R. J., J. P. Spencer and C. Rice-Evans (2004). "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?" Free Radic Biol Med **36**(7): 838-849.
- Wippel, R., M. Rehn, A. C. Gorren, K. Schmidt and B. Mayer (2004). "Interference of the polyphenol epicatechin with the biological chemistry of nitric oxide- and peroxynitrite-mediated reactions." Biochem Pharmacol **67**(7): 1285-1295.
- Wu, G., Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton and N. D. Turner (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." J Nutr **134**(3): 489-492.
- Yang, H., L. J. Roberts, M. J. Shi, L. C. Zhou, B. R. Ballard, A. Richardson and Z. M. Guo (2004). "Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E." Circ Res **95**(11): 1075-1081.
- Yao, P., A. Nussler, L. Liu, L. Hao, F. Song, A. Schirmeier and N. Nussler (2007). "Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways." J Hepatol **47**(2): 253-261.
- Zhang, Y., K. K. Griendling, A. Dikalova, G. K. Owens and W. R. Taylor (2005). "Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." Hypertension **46**(4): 732-737.
- Zhu, H., Z. Jia, L. Zhang, M. Yamamoto, H. P. Misra, M. A. Trush and Y. Li (2008). "Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress." Exp Biol Med (Maywood) **233**(4): 463-474.

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm, Leiter der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, für die Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit zum experimentellen Arbeiten am Institut bedanken.

Mein besonderer Dank gehört meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Dr. Miriam Cortese-Krott für die intensive, engagierte Betreuung und die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung von Versuchen. Die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und bedeutsamen Denkanstöße haben wesentlich zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Für die Unterstützung und die Vermittlung der experimentellen Fähigkeiten bedanke ich mich weiterhin vielmals bei Frau Sivatharsini Thasian-Sivarajah. Meinen Laborkollegen und Angehörigen des Instituts gilt mein Dank für das vorgebrachte Interesse und die freundliche Zusammenarbeit.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Martina und Wilhelm für die großzügige Förderung meiner Ausbildung sowie den grenzenlosen Rückhalt während der Studienzeit. Herzlichen Dank an meinen Bruder Mathias und meine Freundinnen, die immer für mich da waren und mich begleitet haben.

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann Thomas, der mir in allen Lebenslagen mit konstruktivem Rat und Motivation zur Seite stand.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 07.08.2017



---

Friederike Julia Angela Wilhelmine Vössing