

Zur Schutzwirkung des Polyphenols (–)-Epicatechin auf
Gefäßendothelzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Yvonne Steffen

Düsseldorf 2007

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

Referent: Prof. H. Sies

Korreferent: Prof. L. Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2007

Die vorliegende Arbeit ist eine
kumulative Dissertation
gemäß § 4 Abs. 1 Promotionsordnung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
zur Verleihung des Grades „Dr. rer. nat.“
vom 18. 04. 2007

**Sie besteht aus Thesen, 6 erschienenen Publikationen, 1
eingereichte Publikationen sowie Erläuterungen zu den
Thesen und Publikationen**

A Thesen zur Dissertation

Zur Schutzwirkung des Polyphenols (–)-Epicatechin auf Gefäßendothelzellen

These 1:

Experimentelle Daten der Literatur belegen einen Zusammenhang zwischen Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) und Entzündung bei kardiovaskulären Erkrankungen. Ein möglicher Angriffspunkt der MPO ist die Bildung von oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL; erzeugt durch Myeloperoxidase/H₂O₂/Nitrit oder Cu²⁺). Eigene Daten zeigen, dass die LDL-Oxidation durch MPO maßgeblich durch Nitrit moduliert wird. Im MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL sind die Mengen an konjugierten Dienen und thiobarbitursäurereaktiven Substanzen zwar deutlich niedriger als im Cu²⁺-oxLDL, jedoch ist die cytotoxische und proapoptotische Wirkung des MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL auf verschiedene Endothelzellen deutlich stärker ausgeprägt.

Die Cytotoxizität von oxLDL beruht auf einer Stimulierung prooxidativer Prozesse. Dies drückt sich in einer erhöhten Produktion von Superoxidanionen über die NADPH-Oxidase aus und führt zu Veränderungen in Endothelzellen, welche für die Atherogenese *in vivo* von Bedeutung sind. OxLDL-vermittelter Stress führt in Endothelzellen zur Proteinnitrierung, Carbonylierung und Bildung von 4-Hydroxynonenal-Addukten, die durch Vorinkubation der Zellen mit (–)-Epicatechin verhindert werden.

(–)-Epicatechin wirkt in doppelter Weise auf diese Prozesse, indem es sowohl die Bildung des oxLDL als auch dessen Wirkungen auf Endothelzellen unterdrückt.

[Publikationen 1,2,3]

These 2:

Oxysterole lösen in Endothelzellen oxidativen Stress und Apoptose aus. 7β-OH-Cholesterol ist cytotoxischer als 7-Ketocholesterol. Letzteres wirkt in biologischen Systemen als Gegenspieler des 7β-OH-Cholesterols. Auch hier unterdrückt (–)-Epicatechin sowohl die Bildung im LDL als auch die Wirkung der Oxysterole auf Endothelzellen.

Die Effektivität, mit der (–)-Epicatechin die Lipidperoxidation des LDL hemmt, wird von anderen Antioxidanzien und Endothelschutzstoffen, wie Vitamin C und Aspirin, nicht erreicht. Diese Substanzen wirken über andere Mechanismen. (–)-Epicatechin schützt sowohl die Protein- als auch die Lipidkomponente des LDL vor oxidativer Modifikation.

[Publikationen 2,7]

These 3:

Kurz -oder besser Langzeitbehandlung von Endothelzellen mit (-)-Epicatechin hemmt die $O_2^{\cdot-}$ Freisetzung aus Endothelzellen und bedingt eine Anzahl von vorteilhaften Veränderungen im NO-Stoffwechsel, deren gemeinsame Ursache die Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität ist. (-)-Epicatechin wirkt dabei als „Prodrug“ für dessen Methylether als eigentliche Wirkstoffe. Dies folgt aus der Zeitabhängigkeit des (-)-Epicatechineffektes sowie aus den Hemmungen durch Apocynin und 2-Desoxyglucose und dem fehlenden Hemmeffekt durch Allopurinol. Dabei wirkt (-)-Epicatechin nicht auf die Aktivität der eNOS oder ihre Coenzyme.

[Publikationen 3, 4, 5, 6]

These 4:

Die Metabolisierung von (-)-Epicatechin erfolgt nicht nur in Darmmukosa und Leber, sondern auch in Gefäßendothelzellen. Durch Einsatz des Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT)-Inhibitors 3,5-Dinitrocatechol wurde die Natur der Metabolisierung des (-)-Epicatechins als COMT-abhängige Reaktion nachgewiesen. Eigene Untersuchungen ergaben, dass sich der cGMP-Spiegel in Endothelzellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen mit dem NO-Spiegel parallel verhält, woraus zu schließen ist, dass der erhöhte Spiegel an $\cdot NO$ auch bioverfügbar ist.

[Publikationen 4,5]

These 5:

Die Hemmung der NADPH-Oxidase durch (-)-Epicatechin wird durch eine Reihe anderer ernährungsrelevanter Polyphenole geteilt, darunter monomethylierte und andere Flavonoide, die über einen apocyninanalogen Mechanismus wirken. Eine Mono-O-Methylierung der Catecholgruppe verstärkt die Wirksamkeit vieler Verbindungen auf die NADPH-Oxidase-Aktivität, geht aber einher mit dem Verlust der Radikalfängereigenschaft.

[Publikation 6]

B Publikationen zur Dissertation

Die kumulative Dissertation umfasst 7 Beiträge, die zwischen 2003 und 2007 aus je aktuellen Forschungszusammenhängen entstanden sind und in unterschiedlichen Zeitschriften publiziert wurden.

1: Steffen Y, Schewe T, Sies H.

Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 331(4):1277-83

2: Steffen Y, Wiswedel I, Peter D, Schewe T, Sies H

Cytotoxicity of myeloperoxidase/nitrite-oxidized low-density lipoprotein toward endothelial cells is due to a high 7 β -hydroxycholesterol to 7-ketocholesterol ratio. Free Radic Biol Med. 2006; 41(7):1139-50.

3: Steffen Y, Jung T, Klotz LO, Schewe T, Grune T, Sies H.

Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: Protection by (-)-epicatechin. Free Radic Biol Med. 2006;42(7):955-70

4: Steffen Y, Schewe T, Sies H

(-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 359(3):828-33.

5: Steffen Y, Krause S, Kürsten D, Werner ER, Schewe T, Sies H., Heller R.

Epicatechin increases shear stress-induced cGMP formation in HUVEC without stimulating NO synthase activity. Manuskript im Entwurf (vorgesehen für Free Radic Biol Med)

6: Steffen Y, Claudia Gruber, Schewe T, Sies

O-Methyl flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008; 469(2):209-19

Übersichtsartikel:

7: Steffen Y, Schewe T, Sies H.

Myeloperoxidase-mediated LDL oxidation and endothelial cell toxicity of oxidized LDL: attenuation by (-)-epicatechin. Free Radic Res. 2006; 40(10):1076-85. Review.

C Erläuterungen zu den Thesen und Publikationen

Verweise auf die eigenen Publikationen sind durch [1].....[7] gekennzeichnet

1. POLYPHENOLE ALS BIOAKTIVE MIKRONÄHRSTOFFE	10
1.1 STRUKTUR, VORKOMMEN UND NAHRUNGS-AUFNAHME VON FLAVONOIDEN	10
1.2 ANTIOXIDATIVE FLAVONOIDE – MEHR ALS NUR RADIKALFÄNGER.....	11
1.3 POLYPHENOLE UND GESUNDE ERNÄHRUNG.....	12
1.4 EPICATECHIN – EIN BIOAKTIVER BESTANDTEIL DES KAKAOS.....	13
1.5 RESORPTION UND METABOLISMUS DER FLAVONOIDE	15
1.6 GEFÄßENDOTHELZELLEN – EIN ORT DES FLAVONOIDSTOFFWECHSELS	15
1.7 WIE WIRKT EPICATECHIN AUF DAS GEFÄßENDOTHEL? – ZIELSTELLUNG DIESER DISSERTATION.....	16
1.8 ZUR MÖGLICHEN ROLLE DER PROCYANIDINE FÜR DEN OXIDATIONSSCHUTZ DES MENSCHEN.....	17
2 DAS GEFÄßENDOTHEL ALS ANGRIFFSPUNKT BIOAKTIVER VERBINDUNGEN.....	18
2.1 DAS GEFÄßENDOTHEL IST FUNKTIONELL KOMPLEXER ALS FRÜHER ANGENOMMEN.....	18
2.2 STICKSTOFFMONOXID (NO) – EIN MOLEKÜL FÜR DIE FUNKTION DES GEFÄßENDOTHELs	19
2.3 IM HERZ-KREISLAUFSYSTEM SPIELT DIE NO-SYNTHESE DURCH DIE ENDOTHELIALE NOS EINE ZENTRALE ROLLE	20
2.4 DIE NO-SYNTASEN SYNTHETISIEREN AUS L-ARGININ STICKSTOFFMONOXID (NO)	21
2.5 REGULATION DES NO-STOFFWECHSELS.....	21
2.6 UMWANDLUNG DES NO ZU ANDEREN VERBINDUNGEN UND IHRE KONSEQUENZEN	23
2.7 MANGEL AN NO FÜHRT ZUR ENDOTHELIALEN DYSFUNKTION	24
2.8 WIE KANN EINER ENDOTHELIALEN DYSFUNKTION ENTGEGENGEWIRKT WERDEN ?	24
3 ENDOTHELIALE DYSFUNKTION UND ATHEROSKLEROSE	27
3.1 DIE ENDOTHELIALE DYSFUNKTION ALS FRÜHSTADIUM DER ATHEROGENESE	27
3.2 LDL-OXIDATION UND ENDOTHELZELLSCHÄDIGUNG	27
3.3 WIRKUNGEN VON „NATIVEM“ LDL UND oxLDL AUF ENDOTHELZELLEN.....	28
4. MYELOPEROXIDASE (MPO) UND ATHEROGENESE	29
4.1 DIE BIOLOGISCHE ROLLE DER MPO IST UMFASSENDE ALS FRÜHER ANGENOMMEN.....	29
4.2 REAKTIONEN UND REAKTIONSMechanismus.....	29
4.3 WAS SPRICHT FÜR EINE ROLLE DER MPO BEI ENDOTHELIALER DYSFUNKTION UND ATHERO- GENESE?	30
5 WECHSELWIRKUNGEN DER MYELOPEROXIDASE MIT LDL.....	30
5.1 REAKTION DES MPO/H ₂ O ₂ /NITRIT/-SYSTEMS MIT LDL ALS BESONDERE FORM DER MODIFIZIERUNG DES LDL.....	30
5.2 (–)-EPICATECHIN UNTERDRÜCKT DIE LIPIDPEROXIDATION IM LDL DURCH DAS MPO/H ₂ O ₂ / NITRIT-REAKTIONSSYSTEM; VERGLEICH MIT ANDEREN VASOPROTEKTIVEN VERBINDUNGEN	31
5.3 (–)-EPICATECHIN SCHÜTZT AUCH VOR OXIDATIVER MODIFIZIERUNG DES APOPROTEINS DES LDL	32
5.4 VERGLEICH DER CYTOTOXIZITÄTEN DES Cu ²⁺ -oxLDL UND DES MPO/H ₂ O ₂ /NITRIT– oxLDL.....	33

6. WIRKUNGEN VON OXLDL AUF ENDOTHELZELLEN	34
6.1 MPO/NITRIT-oxLDL IST CYTOTOXISCH FÜR ENDOTHELZELLEN UND FÖRdert IN ENDOTHELZELLEN EINEN PROTEASOMALEN ABBAU VON eNOS-PROTEIN; (-)-EPICATECHIN UNTERDRÜCKT DIESEN PROZESS, IST ABER SELBST KEIN PROTEASOMENINHIBITOR	34
6.2 (-)-EPICATECHIN SCHÜTZT VOR SCHÄDIGUNG KULTIVierter ENDOTHELZELLEN DURCH oxLDL.....	36
6.3 (-)-EPICATECHIN SCHÜTZT VOR oxLDL-VERMITTELTER BILDUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) IN ENDOTHELZELLEN	37
6.4 (-)-EPICATECHIN UNTERDRÜCKT KENNZEICHEN VON oxLDL-VERMITTELTEM OXIDATIVEN UND NITROSATIVEN STRESS	39
7 OXYSTEROLE.....	41
7.1 VORKOMMEN UND ENTSTEHUNG DER OXYSTEROLE	41
7.2 METHODISCHE PROBLEME DER OXYSTEROLANALYTIK IM oxLDL	43
7.3 MPO/H ₂ O ₂ /NITRIT-oxLDL UND Cu ²⁺ -oxLDL ZEIGEN UNTERSCHIEDLICHE OXYSTEROL- MUSTER	43
7.4 BIOLOGISCHE WIRKUNGEN DER OXYSTEROLE; OXYSTEROLE ALS PROINFLAMMATORISCHE UND ATHEROGENE MEDIATOREN	44
7.5 ZYTOTOXISCHE WIRKUNGEN VON OXYSTEROLEN AUF KULTIVIERTE ENDOTHELZELLEN	45
7.6 NEUBEWERTUNG DER BIOLOGISCHEN ROLLE DER OXYSTEROLE	46
8 (-)-EPICATECHIN UND ·NO-SPIEGEL IN ENDOTHELZELLEN.....	46
8.1 (-)-EPICATECHINBEHANDLUNG ERHÖHT DEN INTRAZELLULÄREN SPIEGEL AN ·NO IN ENDOTHELZELLEN.....	46
8.2 ENDOTHELIALE COMT WANDELT (-)-EPICATECHIN IN B-RING-MONOMETHYLETHER UM UND TRÄGT MASSGEBLICH ZUM ENDOTHELSCHUTZ BEI	47
8.3 DER COMT-INHIBITOR 3,5 DINITROCATECHOL SCHWÄCHT DIE (-)- EPICATECHINWIRKUNG AB	48
8.4 DER DURCH (-)-EPICATECHIN VERMITTELTE ANSTIEG DES INTRAZELLULÄREN ·NO IN ENDOTHELZELLEN GEHT MIT EINEM ANSTIEG DES cGMP-SPIEGELS EINHER	48
8.5 NOS-AKTIVITÄT IST VERMUTLICH KEIN ANGRIFFSPUNKT VON (-)-EPICATECHIN UND SEINER METABOLITE	49
9 (-)-EPICATECHIN-MONOMETHYLETHER UND ANDERE FLAVONOIDE ALS NADPH-OXIDASEHEMMER	49
9.1 KURZ- UND LANGZEITBEHANDLUNG VON ENDOTHELZELLEN MIT (-)-EPICATECHIN HEMMT DIE O ₂ ^{·-} -FREISETZUNG AUS ENDOTHELZELLEN	49
9.2 METHODISCHE STRATEGIE ZUR MESSUNG DER NADPH-OXIDASEAKTIVITÄT	51
9.3 METHYLETHER DES (-)-EPICATECHINS HEMMEN DIE NADPH-OXIDATION	51
9.4 STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN VON 46 POLYPHENOLEN IN BEZUG AUF DIE HEMMUNG DER NADPH-OXIDASE	52
9.5 WIRKEN (-)-EPICATECHINMETABOLITE IN ANALOGER WEISE WIE DER NADPH-OXIDASE- HEMMER APOCYNIN ?.....	53
9.6 DIE ENDOTHELIALE NADPH-OXIDASEAKTIVITÄT SPIELT EINE ZENTRALE ROLLE BEI DER MODULIERUNG DES NO-STOFFWECHSELS	56
10 EINORDNUNG DER BEFUNDE DIESER DISSERTATION IN DIE GEGENWÄRTIGE FLAVONOIDFORSCHUNG	56
10.1 (-)-EPICATECHIN ALS „PRODRUG“ VON NADPH-OXIDASEHEMMERN	56
10.2 GLUCURONIDE SCHEINEN EHER DEM TRANSPORT DES (-)-EPICATECHINS UND SEINER META-BOLITE ZU DIENEN ALS DER HARNAUSSCHIEDUNG	58

12 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
ZUSAMMENFASSUNG	78
SUMMARY	79
ERKLÄRUNG.....	80
DANKSAGUNG	81

Zur Schutzwirkung des Polyphenols (–)-Epicatechin auf Gefäß-Endothelzellen

Hintergrund, Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Dissertation

1 Polyphenole als bioaktive Mikronährstoffe

1.1 Struktur, Vorkommen und Nahrungsaufnahme von Flavonoiden

Flavonoide sind ubiquitäre sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und gehören neben Phenolsäuren, Lignanen und Stilbenen zu den pflanzlichen Polyphenolen (SCALBERT & WILLIAMSON 2000). Flavonoide sind durch ein Phenylchromangrundgerüst, bestehend aus drei aromatischen Ringen A, B und C, gekennzeichnet. Ring A ist mit einem O-haltigen heterocyclischen Ring C kondensiert, der in Position 2 einen Phenylrest (Ring B) trägt (Abbildung 1).

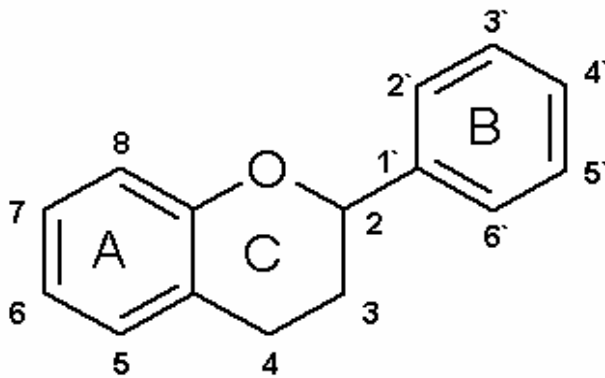


Abb. 1

Flavan, das Phenylchromangrundgerüst der Flavonoide

Abhängig von Hydroxylierungsgrad, Oxidationsgrad des Ringes C, Art der Substituenten und Polymerisierungsgrad werden die Flavonoide in insgesamt 16 Unterklassen eingeteilt (BORS et al., 1997; AGULLO et al., 1997; MONAGAS et al., 2005). Einen besonders hohen Flavonoidgehalt weisen Zwiebeln, Brokkoli, Äpfel, Aprikosen, Tomaten, Johannisbeeren, grüner Kopfsalat, Tee, Rotwein und Schokolade auf, siehe Tabelle 1 (MANACH UND DONOVAN 2004; Ding et al., 2006).

Nahrungsmittel	Flavonoid	Flavonoidunterklasse	Gehalt
Schokolade	(–)-Epicatechin	Flavanol	327,4 ¹⁾
	(+)-Catechin	Flavanol	132,4 ¹⁾
Rotwein	(–)-Epicatechin	Flavanol	15-88 ²⁾
	(+)-Catechin	Flavanol	0-208 ²⁾
	Quercetin	Flavanol	8,3 ²⁾
Tee (Schwarz)	Quercetin	Flavanol	14-17 ²⁾
	Kaempferol	Flavanol	14-16 ²⁾
	(–)-Epicatechin	Flavanol	31-79 ²⁾
Zwiebel	Quercetin	Flavanol	342 ³⁾
Staudensellerie	Luteolin	Flavon	200 ²⁾
	Apigenin	Flavon	750 ²⁾

Tabelle 1

Durchschnittliche Flavonoidgehalte einiger ausgewählter Nahrungsmittel (mg/kg Frisch-gewicht)

1) ARTS et al. (1999) ; ARTS et al. (2000); 2) ARTS & HOLLMANN (2005); 3) CROZIER et al. (2000)

Aufgrund ihres ubiquitären Charakters werden Flavonoide mit nahezu jedem pflanzlichen Nahrungsmittel aufgenommen. Die tägliche Aufnahme ist dabei abhängig von der Art der Ernährung bzw. von den verwendeten Nahrungsmitteln und daher schwer zu bestimmen (ORTEGA et al., 2006; PECHANOVA et al. 2006, PEREZ-VIZCAINO et al., 2006; OPARA et al., 2006). Einen guten Überblick über das Vorkommen und die Struktur der Polyphenole liefert der Übersichtsartikel von Bitsch und dort zitierte Arbeiten (BITSCH 2006).

1.2 Antioxidative Flavonoide – mehr als nur Radikalfänger

Umfangreiche epidemiologische Untersuchungen haben ergeben, dass die Nahrungszufuhr von Flavonoiden, einschließlich Flavanol, gesundheitsfördernd für das Herz-Kreislaufsystem ist (siehe Abschnitte 1.3 und 1.4). Diese Eigenschaft wird in der Literatur überwiegend auf antioxidative Wirkungen der Flavonoide zurückgeführt. Bezüglich des antioxidativen Effektes von Flavonoiden werden verschiedene Wirkungsmechanismen diskutiert, die bisher fast ausschließlich *in vitro* gezeigt wurden. Flavonoide wirken als Radikalfänger. Aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale sind Flavonoide thermodynamisch in der Lage, reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren und damit zu deaktivieren (VAN ACKER et al., 1996, PIETTA, 2000, PANNALA et al. 2001 BORS et al. 2002). Obwohl die Wirkung von Flavonoiden als Radikalfänger, d.h. als Antioxidanzien im engeren Sinne, in zahlreichen Untersuchungen gezeigt wurde, ergeben sich erhebliche Zweifel hinsichtlich des Auftretens derselben Effekte auch *in vivo*, da entsprechende Ex-vivo-Untersuchungen nach Verabreichung von Flavonoiden entweder gar keine oder nur geringe Effekte ergaben. Somit könnte die Radikalfängerwirkung bisher überschätzt, die Hemmung prooxidativer Enzyme (Tabelle 2) hingegen unterschätzt worden sein. Die vorliegende Dissertation liefert Anhaltspunkte für eine besondere Rolle der Hemmung der NADPH-Oxidasen durch Umwandlungsprodukte des (–)-Epicatechins und anderer Flavonoide für den Schutz der Blutgefäße.

Tabelle 2 Eigenschaften der Flavonoide

Eigenschaft	Literatur
Komplexierung von Metallionen	KANDASWAMI & MIDDELTON 1994, FERRALI et al., 1997, PIETTA 2000
Hemmung prooxidativer Enzyme wie z.B. Lipoxygenasen, Myeloperoxidase, induzierbare NO-Synthase, NADPH-Oxidasen und Xanthinoxidase	[3, 4, 5, 6], SELLOUM et al., 2001; SADIK et al., 2003; SIES et al., 2005; VAFEIADOU et al., 2007
Regeneration antioxidativer Vitamine wie Vitamin C und Vitamin E	PIETTA 2000
Hemmung der Proliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung	WILLIAMS et al., 2004
Regulation der Genexpression z.B. durch inhibitorische Wirkung auf den Nuclear-Factor- κ -B (NF κ B)	SEN & PACKER 1996

1.3 Polyphenole und gesunde Ernährung

Es ist seit langem bekannt, dass Nahrungsmittel pflanzlichen Ursprungs z. T. einen hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Substanzen enthalten, die das Risiko für das Auftreten sogenannter „Free Radical Diseases“, wie z. B. Atherosklerose und damit verbundenen Herz-Kreislaufkrankungen oder bestimmte Tumorformen, möglicherweise reduzieren (KROMHOUT 1999, KUMAR et al. 2007 und dort zitierte Arbeiten). Obwohl eine Wirkung von Flavonoiden bei der Prävention von mit oxidativem Stress in Zusammenhang stehenden Herz-Kreislaufkrankungen noch nicht eindeutig belegt ist, weist die Mehrzahl der epidemiologischen Studien auf eine negative Korrelation zwischen der Häufigkeit des Auftretens dieser Erkrankungen und der Flavonidaufnahme hin (KNEKT et al. 1996, LIN et al. 2007, STANGL et al. 2007 und dort zitierte Arbeiten).

Tabelle 3 Zusammenfassung einiger prospektiver epidemiologischer Studien zur Aufnahme von Flavonolen und Flavonen und dem Mortalitätsrisiko für Herzinfarkt und Schlaganfall.

Population	Alter (Jahre)	Beobachtungszeitraum (Jahre)	Studienort	Bezugsquelle	Relevantes Risiko ¹⁾
Zutphen Elderly Study, 805 Männer, Herzinfarkt	65-84	5	Niederlande	HERTOG et al., 1993	0,32
Zutphen Elderly Study, 552 Männer, Schlaganfall	50-69	15	Niederlande		0,27
Finnish Mobile Clinic Health, Examination Survey, 5133 Männer u. Frauen	30-69	20	Finnland	KNEKT et al., 1996	0,73
Health Professionals Study, 34789 Männer, Herzinfarkt	40-75	6	USA	RIMM et al., 1996	1,08 ²⁾
Rotterdam Study, 4807 Männer, Herzinfarkt	> 55	6	Niederlande	GELEIJNSE et al., 2002	0,35

1) Relatives Risiko der Gruppe mit der höchsten gegenüber der mit der niedrigsten Flavonidaufnahme

2) tödlich und nicht tödlich verlaufende Herzinfarkte

1.4 Epicatechin – ein bioaktiver Bestandteil des Kakaos

Dass Kakao und Schokolade reich an antioxidativ wirksamen Polyphenolen sind, ist seit langem bekannt (ALSPACH 2007 und dort zitierte Arbeiten). Polyphenolische Verbindungen finden sich in Speicherzellen der Kotyledonen (Keimblätter) der Kakaobohne und gelangen bei der Verarbeitung in den Kakao und in die Schokolade. Hauptkomponenten sind die Catechine (ca. 37 %) (Abb.2), Procyanidine (ca. 58 %) (Abb.2) und Anthocyane (ca. 4 %) (LAZARUS et al., 1999; HAMMERSTONE et al., 2000, KELM et al., 2006, MORILLAS et al., 2007). Verschiedene epidemiologische Studien haben bereits gezeigt, dass der regelmäßige Konsum von Rotwein, Tee und anderen flavonoidhaltigen Lebensmitteln das Risiko, an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) zu erkranken, senken kann (Tabelle 3). Neuere Studien belegen diese Effekte auch für Kakao und Schokolade, siehe Tabelle 4 (Engler 2006, DING et al. 2006 und dort zitierte Arbeiten, ALSPACH 2007 und dort zitierte Arbeiten).

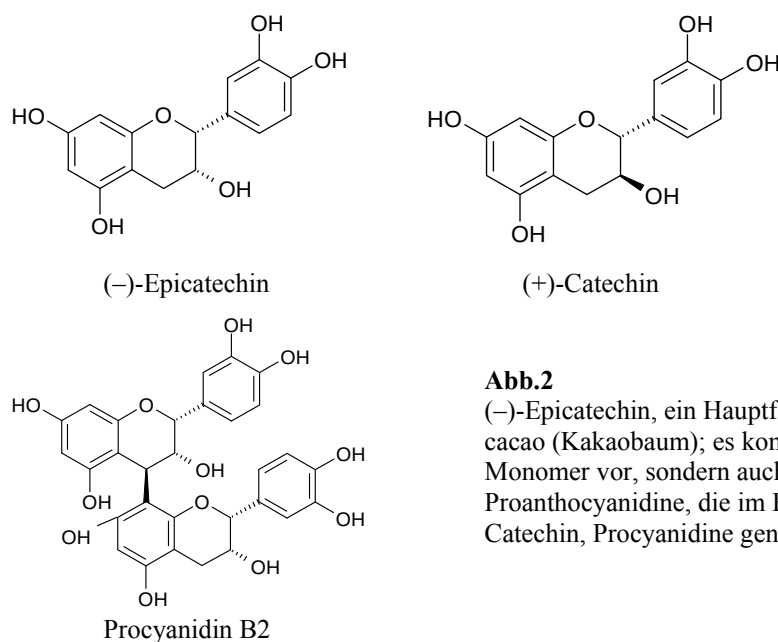


Abb.2

(-)-Epicatechin, ein Hauptflavonoid von *Theobroma cacao* (Kakaobaum); es kommt nicht ausschließlich als Monomer vor, sondern auch oligomerisiert als Proanthocyanidine, die im Falle von (-)-Epicatechin und (+)-Catechin, Procyanidine genannt werden.

(-)-Epicatechin und (+)-Catechin (Abb.2) kommen etwa in gleichen Konzentrationen im Kakao vor, aber das (-)-Epicatechin scheint das ernährungsphysiologisch wichtigere Flavanol zu sein, denn es wurden von verschiedenen Autoren nach Verabreichung von Kakaoprodukten höhere Plasmakonzentrationen an (-)-Epicatechin als an (+)-Catechin gefunden (DING et al. und dort zitierte Arbeiten). Die Arbeitsgruppe von Espin beobachtete kürzlich nach Gabe eines „High“-Flavanol Schokotrunks eine Diskrepanz in der Plasmakinetik zwischen den Plasmametaboliten des Epicatechins und den Harnausscheidungsprodukten (MORILLAS et al., 2007). Nach Durchlaufen eines Maximums der Plasmametabolite (ca. 1-2 h) waren die Glucuronide nach 3 h wieder verschwunden,

obwohl sich die Harnausscheidung von (–)-Epicatechinmetaboliten über 24 h erstreckte. Der Hauptausscheidungsmetabolit im Harn war hingegen *O*-Methyl-Epicatechin-Sulfat. Diese Ergebnisse und eigene Daten lassen folgende Schlussfolgerungen zu: Sulfate sind die Harnausscheidungsprodukte und werden in der Leber gebildet. Es muss aber einen zusätzlichen Speicher für (–)-Epicatechin außerhalb des Plasmas geben, möglicherweise das Endothel. Eigene Untersuchungen zeigten eine (–)-Epicatechinaufnahme durch Endothelzellen. Diese Beobachtungen (Abschnitte 9 und 10) und die Daten anderer Autoren (HALLE et al., 1981; WITTIG Dissertation 2002) stützen die Annahme, dass Endothelzellen Glukuronidaseaktivität aufweisen und daher (–)-Epicatechin in Form von Glucuroniden aus dem Plasma aufnehmen, zum Aglykon spalten und dann akkumulieren können. Flavonoid-Glucuronide dienen außerdem dem Transport zu anderen Zielorganen, insbesondere Leber und werden dort ebenfalls zu Aglykonen gespalten und weiter verstoffwechselt. Die Glucuronide sind somit keine Harnausscheidungsformen, sondern Transportmetabolite zu anderen Zellen und Organen, einschließlich dem Gefäßendothel. Diese unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf, obwohl sie 3 h nach oraler Aufnahme im Plasma nicht mehr nachzuweisen sind. Diese und andere Beobachtungen (Tabelle 4) sprechen für die besondere Rolle des (–)-Epicatechins als ernährungsrelevantes Flavonoid im Kakao.

Tabelle 4 Belege für eine besondere ernährungsphysiologische Rolle des Epicatechins

Hinweis	Literatur
Die Wirkungen von flavanolreichem Kakao auf Endothelfunktion und NO-Stoffwechsel können durch orale Gabe von (–)-Epicatechin simuliert werden.	SCHROETER et al., 2006
(–)-Epicatechin macht fast die Hälfte des Gesamtflavanol-Gehaltes der Schokolade aus	MURSU et al., 2004, DING et al., 2006 und dort zitierte Arbeiten
Es werden höhere Plasmakonzentrationen an (–)-Epicatechin erreicht, als an (+)-Catechin.	DING et al., 2006 und dort zitierte Arbeiten
Deutlicher Anstieg des Plasmaspiegels an (–)-Epicatechin etwa 2 h nach Einnahme eines Kakaoproduktes.	HEISS et al., 2003; ENGLER et al., 2004, DING et al., 2006 und dort zitierte Arbeiten
Mäuseaorta-Endothelzellen akkumulieren (–)-Epicatechin.	SCHROEDER et al., 2003
Spaltung von (–)-Epicatechin durch verschiedene Zellen.	KHOKHAR et al., 1997, MANACH et al., 1999; VAIDYANATHAN et al., 2003
Antikarzinogene Wirkung von Flavonoiden	BOYER et al., 2004

1.5 Resorption und Metabolismus der Flavonoide

Die Resorption der Flavonoide beginnt bereits mit der oralen Aufnahme. Viele Flavonole hingegen, wie das Quercetin, liegen in Nahrungsmitteln überwiegend als Glykoside vor. Grundsätzlich kann zwischen zwei Arten der Resorption unterschieden werden. Im Dünndarm werden diese Glykoside über einen spezifischen Transporter („Sodium-dependent glucose transporter 1“ (SGLT1)) aufgenommen (HOLLMAN et al., 1995, FENG 2006). Dabei werden die Glykoside in der Mucosazelle durch Glycosidasen im Darmlumen gespalten und das Flavonoid als Aglykon resorbiert. In den Epithelzellen der Dünndarmmukosa findet als weiterer Metabolisierungsschritt die Konjugation mit Glucuronsäure statt (DONOVAN et al., 2001; FENG 2006). Die UDPGT (Uridin-5'-diphosphat-glucuronyltransferase; UGT) ist ein Phase-II-Enzym, das die Konjugation von Flavonoiden an Glucuronsäure katalysiert. Die Glucuronidierung der Flavonoide findet in erster Linie durch Enzyme der Familie UGT1A statt, die vor allem im Intestinaltrakt, in der Leber und in den Nieren zu finden sind. Eine Gruppe zytosolischer Enzyme stellen die P-PST (Phenolsulfotransferasen, SULT) dar. Flavanole gehören zu den wenigen Flavonoiden, die in ihrer nativen Form nicht an einen Zuckerrest gebunden sind, jedoch liegen sie nicht selten acyliert vor (besonders mit Gallussäuren). Diese Substitution verursacht, im Gegensatz zur Glykosylierung, nur geringe Veränderungen in der Lipophilie und beeinflusst die Bioverfügbarkeit wenig. Flavanole können biologische Membranen mittels passiver Diffusion passieren und werden ohne vorherige Dekonjugation oder Hydrolyse absorbiert (AHERNE & O'BRIEN 2002; STARP et al., 2006). In Darmmucosa und Leber werden Flavonoide methyliert, sulfatiert und glucuronidiert. Die COMT (Catecholamin-O-methyltransferase) ist eines der Hauptenzyme im Dopamin-Stoffwechsel. Sie ist weit verbreitet im Organismus und methyliert Polyphenole an einer der Hydroxylgruppen des Catecholorings (CHEN et al., 2005).

1.6 Gefäßendothelzellen – ein Ort des Flavonoidstoffwechsels

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, findet eine Hauptverstoffwechslung von (–)-Epicatechin hauptsächlich in Darmmukosa und Leber statt. In dieser Dissertation wurde an humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) die Metabolisierung von (–)-Epicatechin untersucht (s.a. Abschnitt 9). Dafür wurde ein *In-vitro*-Modell unter Verwendung von HUVEC-Monolayerkulturen unter folgenden Bedingungen entwickelt:

- Wenn (–)-Epicatechin und andere Flavonoid-Aglykone getestet wurden, wurde kein Serumalbumin dem Medium hinzugesetzt, da dieses die Aglykone bindet.

- Die Zellen wurden hinreichend lange inkubiert, um eine volle Verstoffwechslung der Aglykone zu gewährleisten.
- Die Stabilität und Intaktheit der Zellen wurden über den Versuchszeitraum geprüft.
- Durch Einsatz des COMT-Inhibitors 3,5-Dinitrocatechol wurde der Nachweis der Metabolisierung des (–)-Epicatechins als COMT-abhängige Reaktion gesichert (siehe Abschnitt 9.3).
- Die Rolle der Serumalbumine und der Glucuronidierung bzw. Deglucuronidierung des (–)-Epicatechins durch Glucuronidasen in Endothelzellen wurde mituntersucht (siehe Abschnitte 1.2 und 9.1).

Eigene Daten belegen, dass auch Endothelzellen in der Lage sind, (–)-Epicatechin zu verstoffwechseln. Dabei wurde nach Inkubation der Zellen mit (–)-Epicatechin die Bildung von O-methylierten Metaboliten (3'- und 4'-Methylether) nachgewiesen. Bekannt war, dass die COMT in Endothelzellen exprimiert wird. Dies wurde in eigenen Untersuchungen bestätigt, die biologische Rolle war bislang unklar. Unter Anwendung von HPLC und TLC (Dünnschichtchromatographie) konnten erstmals Methylether des (–)-Epicatechins als endotheliale Metabolite des (–)-Epicatechins nachgewiesen werden [7].

1.7 Wie wirkt Epicatechin auf das Gefäßendothel? – Zielstellung dieser Dissertation

Die Daten dieser Dissertation stützen die Annahme, dass der Modulation des NO-Stoffwechsels (siehe Abschnitt 2) eine Schlüsselrolle zuzukommen scheint. Die *In-vivo*-Effekte von (–)-epicatechin-reichem Kakao auf das menschliche Endothel wurden in klinischen Studien nachgewiesen. Es wurde beobachtet, dass die Menge der im Plasma zirkulierenden NO-Verbindungen (als RXNO zusammengefasst: S-Nitrosothiole und N-Nitrosoverbindungen) sowie der Plasmaspiegel an Nitrit zwei Stunden nach Gabe eines Kakaotrunkes mit hohem Flavanolgehalt im Vergleich zum Kontrolltrunk deutlich ansteigen (HEISS et al., 2003; 2005; 2007). In diesen Studien zeigte sich auch eine Verbesserung der blutflussvermittelten Gefäßdilatation der Brachialarterien, („flow-mediated dilation“), FMD, ein nicht invasiv messbarer Parameter, der zur Beurteilung einer endothelialen Dysfunktion herangezogen wird (KELM 2002). Der NO-Synthaseinhibitor

L-NMMA (L-N. G. –Monomethylarginin) hob die Wirkung auf (HEISS et al., 2005). Die Wirkung der Kakaoflavanole konnte durch direkte Gabe von (–)-Epicatechin (1 mg/kg Körpermasse) simuliert werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass das (–)-Epicatechin der endothel-protective Bestandteil des Kakaos ist (SCHROETER et al.,

2006). Die von flavanolreichem Kakao oder (–)-Epicatechin ausgeübten Effekte waren vorübergehend, doch trat bei einer wiederholten Gabe eine gewisse Nachhaltigkeit auf (HEISS et al., 2005; HEISS et al., 2007). Insgesamt sprechen diese Daten für eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) als Ursache der Verbesserung der Gefäßfunktion nach (–)-Epicatechingabe. Somit stellte sich die Frage, worauf die erhöhte NO-Konzentration zurückgeführt werden kann. Folgende Möglichkeiten wären denkbar:

1. eine Freisetzung von NO aus zellulären Speichern
2. eine Stimulierung der eNOS, d.h. direkte oder indirekte Erhöhung der Enzymaktivität bzw. Kapazität der NO-Synthasen, sei es durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration oder durch Serinphosphorylierung oder durch ein höheres Angebot des Coenzym Tetrahydrobiopterin
3. eine Verlängerung der Lebensdauer von NO durch Verlangsamung des oxidativen Abbaus zu Nitrat über die Bildung von Peroxynitrit

Die Daten der vorliegenden Dissertation stützen die drittgenannte Möglichkeit.

1.8 Zur möglichen Rolle der Procyanidine für den Oxidationsschutz des Menschen

Die Resorption der Procyanidine im Dünndarm beim Menschen ist noch nicht geklärt. Procyanidine werden, wenn überhaupt, nur geringfügig resorbiert (HOLT et al., 2002). In Humanstudien wurde gezeigt, dass (–)-Epicatechin zwischen 20% und 60% (BABA et al., 2002; DING et al., 2006 und dort zitierte Arbeiten) und Procyanidine höchstens zu etwa 1% resorbiert werden. Holt und Mitarbeiter (HOLT et al., 2002) interpretieren das Auftreten von Procyanidin B2 und B5 im Plasma nach Gabe von flavanolreichem Kakao als Nachweis einer geringen Resorption, aber die Möglichkeit einer sekundären Bildung aus (–)-Epicatechin wurde dabei nicht geprüft. Dies hätte durch Isotopenexperimente oder Verabreichung von reinem (–)-Epicatechin anstelle von Kakao geschehen müssen. Bei der Ratte kann hingegen eine geringe Procyanidin-Resorption als gesichert gelten (BABA et al. 2002). Diese Autoren haben Procyanidin B2 verabreicht und (–)-Epicatechin und dessen Metaboliten im Plasma nachgewiesen. Außerdem wurde 3'-O-Methyl-Epicatechin im Harn nachgewiesen. Dies lässt auf eine Umwandlung des Procyanidin B2 in (–)-Epicatechin im Organismus schließen. Diese Umwandlung findet aber nicht im Magen-Darmtrakt statt, wie zunächst von Schroeter et al aufgrund von Modelluntersuchungen postuliert wurde (SCHROETER et al., 2001). Mehrere Autoren haben diese Möglichkeit *in vivo* ausgeschlossen (SPENCER 2003; ZHU 2002). Die dehydrierende Bildung von (–)-Epicatechindimeren muss *in vivo* in Betracht gezogen werden, insbesondere unter Bedingungen des oxidativen Stresses. Eigene

Untersuchungen zeigten in einer Modellreaktion mit der Myeloperoxidase (MPO) eine Dimerisierung von (–)-Epicatechin. Im Falle der Verifizierung der Bildung von Procyanidinen aus (–)-Epicatechin im Säugerorganismus hätte das biologische Bedeutung, da auf diesem Wege eine direkte Wechselwirkung mit Endothelzellen möglich wäre und Procyanidine dort wirksamer als (–)-Epicatechin sind (CARINI et al., 2001; ALDINI et al., 2003). Eigene Daten ergaben, dass Procyanidin B2 im Gegensatz zum (–)-Epicatechin ein direkter Hemmer der NADPH-Oxidase ist [6].

Trotz der fraglichen Resorbierbarkeit der Procyanidine dienen sie dem Oxidationsschutz des Menschen. Die Wirkungen beschränken sich jedoch auf den Magen-Darm-Trakt. Aufgrund der reduzierenden Eigenschaften vermögen sie organische Hydroperoxide der Nahrung zu reduzieren, und durch die Fähigkeit zur Komplexbildung werden prooxidative Übergangsmetallionen gebunden. Diese Wirkungen der Procyanidine tragen möglicherweise gerade infolge ihrer schlechten oder fehlenden Resorbierbarkeit zum Schutz vor Darmkrebs durch polyphenolreiche Nahrungszufuhr bei, wie epidemiologische Studien ergeben haben (WILLIAMSON & MANACH 2005). Die nicht resorbierbaren Flavonoide und der nicht resorbierte Anteil der resorbierbaren Flavonoide können durch die Darmflora zu Phenolcarbonsäuren verstoffwechselt werden, die resorbierbar und somit als bioaktive Verbindungen systemisch verfügbar sind (SPENCER et al., 2001).

2 Das Gefäßendothel als Angriffspunkt bioaktiver Verbindungen

2.1 Das Gefäßendothel ist funktionell komplexer als früher angenommen

Während dem Endothel früher hauptsächlich nur eine strukturelle Funktion im Sinne einer Innenauskleidung der Gefäßwand zugeordnet wurde, wird es heute zunehmend als eigenständiges Organ mit erheblichen Stoffwechseleleistungen angesehen (MICHIELS 2003; NAPOLI et al., 2006). Eine wesentliche Besonderheit des Endothels stellt seine disseminierte Verteilung über den gesamten Organismus entlang der Gefäße dar. Dies führt dazu, dass Endothelzellen den entscheidenden Regulator der Gefäßhomöostase darstellen. Sie interagieren einerseits direkt mit den zirkulierenden Zellen des Blutes und andererseits mit den angrenzenden Zellen der Gefäßwand (insbesondere den glatten Muskelzellen). Als Grenze zwischen Blut und Gefäßwand sind sie den Veränderungen in der Blutzusammensetzung (z.B. Konzentrationen von Glukose, Fettsäuren, oxidiertem LDL, Gerinnungsaktivatoren) direkt ausgesetzt. Auf diese Veränderungen reagieren Endothelzellen hochsensitiv und spielen eine zentrale Rolle in den Pathomechanismen, die zur Entwicklung von Herz-Kreislaufkrankungen führen (CARMELIET 2003; RASK-

MADSEN & KING 2007). Neben Stickstoffmonoxid, auf das im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird, spielen noch andere vasoaktive Substanzen und Moleküle eine wichtige Rolle bei der Endothelfunktion, die in Tabelle 5 aufgelistet sind.

Tabelle 5 Vasoaktive Mediatoren des Endothels

Antithrombotisch	Prothrombotisch
Prostazyklin	Plättchen aktivierender Faktor
Thrombomodulin	Gewebefaktor
Heparin-Proteoglykane	Von Willebrand-Faktor
Gewebeplasminogenaktivator	Plasminogenaktivator-Inhibitor I
Vasorelaxantien	Vasokonstriktoren
Prostazyklin	Endothelin-1
Stickstoffmonoxid (EDRF)	Angiotensin II
	PDGF
Wachstumshemmer	Wachstumsfaktoren
TGF- β	VEGF
Stickstoffmonoxid	PDGF
Antiinflammatorisch	Proinflammatorisch
Stickstoffmonoxid	Zytokine (IL-1 α , IL-1 β)
Prostazyklin	Chemokine (IL-8)
	Oxidativ modifiziertes „Low-density-Lipoprotein“
Antioxidative Enzyme:	Prooxidative Enzyme:
Katalase	NADPH-Oxidase, entkoppelte NO-Synthase
Superoxiddismutase	

2.2 Stickstoffmonoxid (NO) – ein Molekül für die Funktion des Gefäßendothels

Stickstoffmonoxid ist ein zentrales Signalmolekül in Endothelzellen, das bei gestörter Endothelfunktion vermindert freigesetzt wird. FURCHGOTT & ZAWADZKI wiesen 1980 erstmals nach, dass Endothelzellen eine wesentliche Rolle bei der Gefäßerweiterung spielen (FURCHGOTT & ZAWADZKI 1980). Nur bei intakten Endothelzellen konnte eine Dilatation der isolierten Gefäße durch Acetylcholin oder Bradykinin gezeigt werden. In darauffolgenden Arbeiten wurde eine vom Endothel kontinuierlich freigesetzte gefäßerweiternde Substanz entdeckt, der man die Bezeichnung „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) gab. Sie wird durch die Stimulation vasoaktiver Mediatoren von Endothelzellen gebildet und bewirkt eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion. Spätere Untersuchungen zeigten, dass EDRF mit $\cdot\text{NO}$ identisch ist (IGNARRO et al., 1987; FURCHGOTT 1999; MURAD 2004).

2.3 Im Herz-Kreislaufsystem spielt die NO-Synthese durch die endotheliale NOS eine zentrale Rolle

Katalysatoren der •NO-Produktion sind die NO-Synthasen. Drei Isoformen sind im Endothel identifiziert worden: die endotheliale, die neuronale NO-Synthase und die induzierbare NO-Synthase (eNOS/nNOS/iNOS; NATHAN 2006, MALINSKI 2007). eNOS und nNOS einerseits und die iNOS andererseits weisen verschiedene Kinetik, Regulation und Verteilung im Gewebe auf. Tabelle 6 zeigt einige charakteristische Eigenschaften.

Tabelle 6 Isoformen und Eigenschaften der NO-Synthasen (BREDT & SNYDER 1990)

	nNOS (NOS I)	iNOS (NOS II)	eNOS (NOS III)
Subfamilie	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
Molekulargewicht	160 kDa	133 kDa	140 kDa
Vorkommen	Neuronen Epithelzellen Mesangialzellen Skelettmuskelzellen	Makrophagen Endothelzellen Mesangialzellen Glatte Muskelzellen	Endothelzellen Glatte Muskelzellen Epithelzellen etc.
Enzymlokalisation	cytosolisch	cytosolisch	cytosolisch, membrangebunden
Ca²⁺/Calmodulin- Abhängigkeit	ja	nein	ja
Stimulatoren	Glutamat Lithium etc.	TNF- α IL-1 β Angiotensin II Oxidativ modifiziertes LDL etc.	Acetylcholin Bradykinin „Shear stress“ Ionomycin etc.
NO-Produktion	pmol (sec)	nmol (h bis d)	pmol (sec)
Biologische Wirkung	Neurotransmission etc.	Cytotoxizität; kompensatorische Bildung von NO bei endothelialer Dysfunktion; DNA Schädigung etc.	Vasodilatation Thrombozytenaggregationsinhibition Proliferationsinhibition glatter Muskelzellen etc.

2.4 Die NO-Synthasen synthetisieren aus L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO)

•NO entsteht substratspezifisch aus der Aminosäure L-Arginin durch enzymatische Umwandlung der terminalen Guanidinogruppe mit Hilfe von NO-Synthasen, siehe Abbildung 3 (PALMER et al., 1987; CHEN et al., 2007).

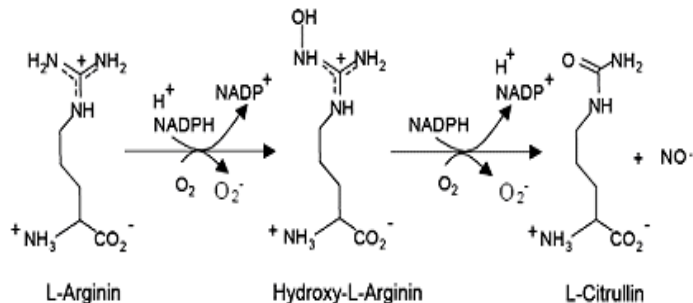


Abb.3
Biosynthese von Stickstoffmonoxid (modifiziert nach GROVES & WANG, 2000).

In einem ersten Oxidationsschritt wird aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff zunächst das Zwischenprodukt L-Hydroxyarginin gebildet, das dann in einem zweiten Oxidationsschritt wieder unter Verbrauch von Sauerstoff zu L-Citrullin und •NO umgewandelt wird. Wichtige Coenzyme beider Reaktionsschritte sind Tetrahydrobiopterin und NADPH (ANDREW & MAYER 1999; WERNER et al., 2003; KALINOWSKI & MALINSKI 2004).

2.5 Regulation des NO-Stoffwechsels

Die NO-Synthese wird auf verschiedenen Ebenen reguliert

Obwohl die eNOS konstitutiv exprimiert wird, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass sie nicht nur auf Proteinebene, sondern auch transkriptionell reguliert wird. Erhöhte Scherkräfte („shear stress“) bewirken eine eNOS-Phosphorylierung und damit eine Aktivierung der eNOS [5] (SESSA et al., 1994, HELLER et al., 2004). OxLDL, TNF-α und Hypoxie hingegen verringern die Menge der eNOS-Transkripte (FÖRSTERMANN et al. 1998). Die Halbwertszeit des eNOS-Proteins beträgt ca. 20 h. Die Behandlung von Endothelzellen mit oxLDL beschleunigt den eNOS-Abbau und senkt die Halbwertszeit [1] (LIAO et al., 1995; FÖRSTERMANN et al., 1998).

Acylierung durch Palmitin- und Myristinsäure

Die Translation der eNOS geht einher mit der Myristoylierung eines Glycinrests an ihrem N-terminalen-Ende und ist irreversibel (GOVERS & RABELINK 2001). Nach der Translation wird die eNOS an zwei Cysteinresten ihres N-terminalen-Endes palmitoyliert; dieser Vorgang ist reversibel (GOVERS & RABELINK 2001).

Die eNOS liegt im aktiven Zustand an Ca^{2+} /Calmodulin assoziiert vor. Das Caveola-Membranprotein Caveolin-1 ist ein direkter Antagonist von Ca^{2+} /Calmodulin, der mit Ca^{2+} /Calmodulin um die Bindung an der eNOS konkurriert und die eNOS Aktivität erniedrigt. Die eNOS Aktivität wird deshalb durch das Verhältnis an Ca^{2+} /Calmodulin-gebundener und Caveolin-1-gebundener eNOS bestimmt (GOVERS & RABELINK 2001). Calmodulin bindet an die eNOS nur nach Einlagerung von Ca^{2+} .

Regulation durch Phosphorylierung

Die eNOS-Aktivität kann über Protein-Phosphorylierung reguliert werden. Eine Phosphorylierung von Serin 1177 erhöht die Aktivität, während eine Phosphorylierung an Threonin 495 die Aktivität reduziert [5]. Die (De)phosphorylierungen können über Phosphatasen bzw. Kinasen als Antwort auf diverse Stimuli vermittelt werden. Die Signalkaskade der Proteinkinase A (PKA) erhöht die eNOS-Aktivität durch Phosphorylierung von Serin-1177 und über eine Dephosphorylierung von Threonin-495. Die Proteinkinase C (PKC) dagegen bewirkt über ihre Signalkaskade eine eNOS-Aktivitätshemmung, indem Serin-1177 dephosphoryliert und Threonin-495 phosphoryliert wird. Der Effekt von Scherstress auf die Phosphorylierung der eNOS am Ser-1177 wurde in eigenen Untersuchungen an Nabelschnurendothelzellen bestätigt und durch Behandlung der Zellen mit Epicatechin nicht beeinflusst [5].

Regulation des Expression der NO-Synthasen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass MPO/ H_2O_2 /Nitrit-oxLDL und Cu^{2+} -oxLDL nicht das Expressionsniveau der eNOS-mRNA, wohl aber das der iNOS-mRNA beeinflussen [3]. Eine Induktion der iNOS, ist auch für eine Reihe von proinflammatorischen Cytokinen (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β u.a.) bekannt. Dabei spielen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT1 eine zentrale Rolle. Andere Induktoren des iNOS-Gens sind Lipopolysaccharide und reaktive Sauerstoffverbindungen (LIEW 1994; PERSICHINI et al., 2006).

Proteasomaler Abbau des eNOS Proteins bei oxidativem Stress

In dieser Dissertation wird gezeigt, dass es unter oxidativem Stress zu Proteinmodifizierungen der eNOS kommt (Abschnitt 6). Vermutlich ist das oxidativ modifizierte eNOS-Protein funktionell geschädigt und damit für die Zelle unbrauchbar oder gar schädlich. Für die Eliminierung aberranter und geschädigter Polypeptide ist der proteasomale Proteinabbau verantwortlich [3]. Der in dieser Dissertation erbrachte Nachweis des proteasomalen Abbaus von eNOS-Protein in Endothelzellen nach oxLDL-Behandlung steht im Einklang mit dieser Funktion des Proteasoms.

2.6 Umwandlung des NO zu anderen Verbindungen und ihre Konsequenzen

Peroxynitrit (ONOO-) ist eine reaktive Verbindung, die aus dem Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) und Stickstoffmonoxid ($\cdot NO$) in einer diffusionslimitierten Reaktion ($k = \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) entsteht (PADMAJA & HUIE et al. 1993). In der deprotonierten Form ist Peroxynitrit relativ stabil. Durch Protonierung dagegen wird das Molekül instabil und isomerisiert zu Nitrat (NO_3^-) oder zerfällt zu hochreaktiven Hydroxylradikal und Stickstoffdioxid (BECKMAN et al., 1990). Auf diese Weise vermag Peroxynitrit mit jeder Klasse von Biomolekülen zu reagieren (KOPPENOL et al., 1992). Eigene Daten zeigen eine Proteinnitrierung von LDL und eNOS (Abschnitte 5 und 6) [3] (KRAEMER et al., 2003). Als spezifischer Marker für die Wirkung von Peroxynitrit wird die Nitrierung von Tyrosinresten zu 3-Nitrotyrosin angesehen (ISCHIROPOULOS 1998). Die OONO⁻-Bildung ist der Grund dafür, dass sich die stationären Konzentrationen von $\cdot NO$ und $O_2^{\cdot-}$ gegenläufig verhalten, d.h. wenn $O_2^{\cdot-}$ ansteigt, sinkt $\cdot NO$. Das Superoxidanionradikal kann $\cdot NO$ inaktivieren. Es stammt aus verschiedenen Quellen wie z.B. der endothelialen NAD(P)H-Oxidase oder der Xanthinoxidase. Andere Befunde zeigen, dass auch die endotheliale NOS selbst bei oxidativem Stress Superoxidanionradikale bildet, wenn das Coenzym Tetrahydrobiopterin oder das Substrat L-Arginin für die NO-Synthese begrenzend sind oder fehlen. Die Kapazität der Bildung von $\cdot NO$ wird auch durch die Coenzyme, BH_4 (Tetrahydrobiopterin) und NADPH, bestimmt.

(-)-Epicatechin schützt mehrfach vor Peroxynitrit

(-)-Epicatechin und seine Oligomeren bieten Schutz gegen Peroxynitrit sowohl im Sinne der Prävention durch Abfangen des Superoxidanionradikals (ROBAK und GRYGLEWSKI 1988) und damit der Unterbindung der Entstehung von Peroxynitrit, als auch im Sinne des Abfangens und Entgiftens entstandenen Peroxynitrits (ARTEEL und SIES 1999). Eigene Daten zeigen, dass durch Behandlung von Endothelzellen mit (-)-Epicatechin die NADPH-Oxidaseaktivität, eine der Hauptquellen von Superoxidanionen, gehemmt wird [3]. Als wichtiges physiologisches Schutzsystem gegenüber Peroxynitrit wurden die Glutathionperoxidasen (GPx) identifiziert (SIES et al., 1997). Eigene Beobachtungen zeigen, dass bei oxidativem Stress die Aktivität der GPx durch oxLDL gesteigert wird, anscheinend als kompensatorischer Mechanismus auf den durch oxLDL vermittelten Stress. Es gibt jedoch Stoffwechselsituationen, wie z.B. im oxidativen Stress oder beim Selenmangel, wo die Kapazität der GPx nicht ausreicht. Hier kann der endogene Schutzfaktor GPx durch den exogenen Schutzfaktor (-)-Epicatechin ergänzt werden, wodurch der Oxidationsschutz verstärkt wird.

2.7 Mangel an NO führt zur endothelialen Dysfunktion

Bei einer endothelialen Dysfunktion kommt es durch die unterschiedlichen Risikofaktoren wie Nikotin, Hyperlipoproteinämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus zu einer Schädigung des Endothels und zu einer Abnahme der endothelabhängigen Vasodilatation (ROSS 1993, RASK-MADSEN & KING 2007). Diese Abnahme kann durch eine verminderte Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$)-Bioverfügbarkeit erklärt werden (NAPOLI et al. 2006).

2.8 Wie kann einer endothelialen Dysfunktion entgegengewirkt werden ?

Im gesunden Gefäßendothel besteht ein Gleichgewicht zwischen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und deren Beseitigung. Dies betrifft auch das Verhältnis der Aktivitäten antioxidativer (z.B. SOD) und prooxidativer Enzymsysteme (z.B. die NAD(P)H-Oxidase) und beeinflusst die stationäre Konzentration von biologisch aktivem $\cdot\text{NO}$. Ein Ungleichgewicht durch ein Überwiegen von ROS führt zu einer Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit. Ein gemeinsamer Pathomechanismus dieses multifaktoriellen Geschehens ist eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies –der oxidative Stress– in der Gefäßwand. Oxidativer Stress ist das Ergebnis einer Störung des "normalen" Gleichgewichts zwischen Pro- und Antioxidanzien. (SIES 1986; 1991a und 1991b). Daraus folgt, dass eine gezielte Unterdrückung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine sinnvolle Strategie zur Prävention und Therapie der endothelialen Dysfunktion ist.

2.9 Methodische Aspekte der Untersuchung des NO-Stoffwechsels;

Nachweismöglichkeiten von Stickstoffmonoxid und seiner Folgeprodukte

Zur Analytik des Stickstoffmonoxids kommen sowohl direkte als auch indirekte Messmethoden zur Anwendung, welche sich z.T. unmittelbar aus dem NO-Stoffwechsel (Abbildung 4) ableiten. Die Tabellen 7a und b geben einen Überblick über ausgewählte Methoden.

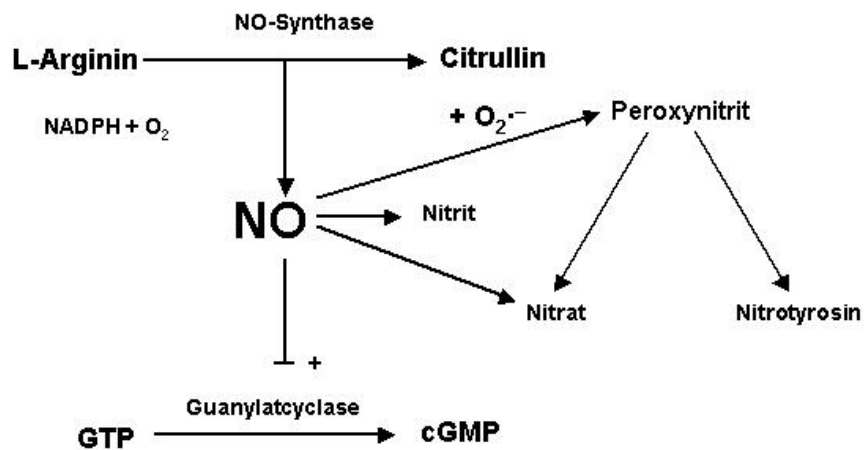


Abbildung 4

Bildung von $\cdot\text{NO}$ und seinen Folgeprodukten

Tabelle 7a Methoden zur direkten ·NO Bestimmung

direkte NO-Bestimmung	Prinzip	Nachweisgrenze	Bemerkungen
DAF-2 Fluoreszenz (NAKATSUBO et al., 1998)	Der membrangängige Indikator DAF-2 DA (4,5-Diaminofluoreszeindiacetat) wird durch intrazelluläre Esterasen gespalten u. fängt NO ab unter Bildung des fluoreszierenden Farbstoff Triazolofluoreszein (DAF-2T)	5 nM	Bestes Verfahren zur Messung der intrazellulären stationären NO-Konzentration, die nicht nur durch die Geschwindigkeit der NO-Bildung (wie oft fälschlich behauptet), sondern auch durch die Geschwindigkeit des Abbaus bestimmt wird.
ISO-NO-Elektrode (BERTSCH 1996)	aus dem Endothel freigesetztes NO diffundiert durch eine relative Polymermembran und wird an der Elektrode oxidiert. Das elektrische Stromsignal ist proportional zur freien NO-Konzentration an der äußeren Oberfläche der Membran	1,5 nM	Nur das extrazellulär freigesetzte NO wird gemessen, welches aber nur bedingt die Bioverfügbarkeit des intrazellulären NO widerspiegelt. Diese Methode eignet sich sehr gut für Zellsuspensionen oder -homogenate, während die Anwendung auf Zell-Monolayer mit erheblichen methodischen Schwierigkeiten verbunden ist.
Elektronenspinresonanz-Messung (EPR) (BATZ et al., 1999; KOPPENOL 1996; 1998) direkt oder nach Abfangen mit Spintraps	erfasst Moleküle mit ungepaarten Elektronen (Radikale) darunter NO•	4 µM/l	Oftmals nicht sensitiv genug. Dies kann durch integrale Messung über die Zeit mittels Spintraps überbrückt werden.

Tabelle 7b Methoden zur indirekten ·NO Bestimmung

Indirekte NO-Bestimmung	Prinzip	Nachweisgrenze	Bemerkungen
L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay (HELLER et al., 1999)	Bildung von Citrullin aus radioaktivem L-Arginin. Diese erfolgt stöchiometrisch zur NOS-abhängigen NO-Brutto-Synthese	1-10 nM	Die Bruttobildung von NO ist naturgemäß höher als die resultierende NO-Konzentration, da ein bedeutender Teil in Folgeprodukte umgewandelt wird.
Griess-Assay (PRIVAT et al., 1997, ROMITELLI et al., 2007)	Umsetzung von Griess-Reagenz (Sulfanilsäure/N-(1-naphthyl)ethyldiamin) mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff, dessen Absorption im sichtbaren Bereich bei 548 nm bestimmt wird	300 nM	Daten der vorliegenden Dissertation (6.4) zeigen, dass ein Anstieg des Nitrat/Nitrit-Quotienten einen oxidativen Stress in kultivierten Nabelschnurendothelzellen anzeigt.
cGMP Assay (MURAD et al., 1994)	Die NO-induzierte Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase wird durch Quantifizierung des cyclischen Guanosinmonophosphates (cGMP) durch einen ELISA gemessen	1-100 nM	Der cGMP-Assay ist ein guter Parameter für bioverfügbares ·NO
3-Nitrotyrosin Immunoblot (HINSON et al., 2000)	Nachweis nitrierter Polypeptide durch Immundetektion (Westernblot mit Anti-Nitrotyrosin-Antikörper)		Durch Immunopräzipitation können nitrierte Proteine identifiziert werden

3 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

3.1 Die endotheliale Dysfunktion als Frühstadium der Atherogenese

Atherosklerose ist die häufigste systemische Erkrankung der Arterien und die Haupttodesursache in Industrieländern. Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören erhöhter Blutdruck, Diabetes mellitus, Störungen des Plasma-Lipoproteinstoffwechsels, Rauchen und Übergewicht (ROSS 1995). Die Pathogenese der Atherosklerose ist nicht eindeutig geklärt. Von zentraler Bedeutung sind jedoch reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS), die bei Patienten mit Risikofaktoren und klinisch manifester Atherosklerose vermehrt gebildet werden (REILLY et al., 1998). Initial werden Endothelzellen, welche die Gefäßwand auskleiden, wiederholten oder kontinuierlichen Schädigungen ausgesetzt, die ihre Homöostase- und Schutzfunktion beeinträchtigen. Dadurch können Plasmabestandteile, wie z.B. Lipoproteine, in die Gefäßwand eindringen, dort oxidiert werden und inflammatorische Reaktionen auslösen, die zur Bildung atherosklerotischer Plaques führen („response to injury“-Theorie) (ROSS und GLOMSET 1973).

3.2 LDL-Oxidation und Endothelzellschädigung

Epidemiologische Untersuchungen haben ergeben, dass die Hypercholesterolämie und hierbei insbesondere die Erhöhung der Plasmakonzentration an oxidativ modifizierten Low-Density-Lipoprotein (oxLDL) ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose ist (HOLVOET et al., 2003; HANSSON et al., 2005; MOR et al., 2007). Für einen Zusammenhang zwischen der Entstehung der Atherosklerose und der Hypercholesterolämie spricht die *in vitro* beobachtete Oxidation von LDL (Abschnitte 5 und 6) [1,9] (ESTERBAUER et al., 1992; KOSTYUK et al., 2003, KRÄMER et al., 2003). Lipoproteine niedriger Dichte sind die Hauptquelle der Lipide in atherosklerotischen Läsionen (STEINBERG & WITZTUM 2002) und von Bedeutung für die Entstehung der Atherosklerose. Sie transportieren etwa 60% des Serumcholesterols und versorgen damit Zellen unterschiedlicher Gewebe, die zum Aufbau ihrer Zellmembran oder zur Biosynthese von Steroidhormonen auf Cholesterol angewiesen sind. (Abbildung 5).

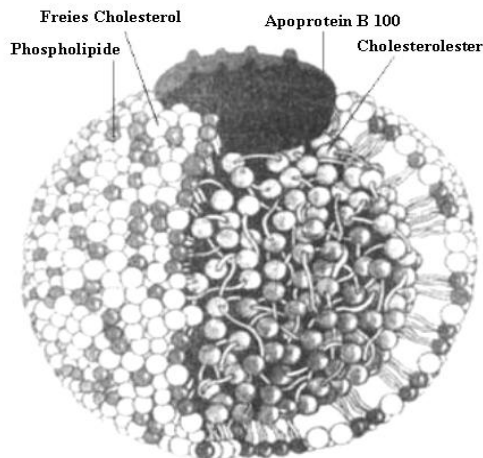


Abb. 5
Schematische Darstellung des Low-Density-Lipoproteins (LDL) (BROWN & GOLDSTEIN 1979).

Es bezeichnet Vertreter einer von mehreren Klassen der Lipoproteine. Es dient als Transportvehikel für im Blutplasma lipophile Substanzen wie Cholesterol, Cholesterolester, Triglyceride, Fettsäuren und Phospholipide sowie fettlösliche Vitamine, etwa Vitamin E und Vitamin A.

Einen Überblick zum Metabolismus, der Struktur und der Zusammensetzung von LDL geben die Übersichtsarbeiten von ESTERBAUER (1992), LaRosa (2007) und MAY (2007). Die Oxidation von LDL führt zu Reaktionen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Innern sowie zu Veränderungen des Apolipoproteins B-100 auf der LDL-Oberfläche. Modifiziertes oxLDL wird deswegen nicht mehr über den regulierten Weg via Apo B-Rezeptor aufgenommen, sondern über „Scavenger-Rezeptoren“ (HANSSON et al., 2005). Dieser Prozess unterliegt, im Gegensatz zur Aufnahme von nativem LDL, keiner negativen Rückkopplung. Große Mengen von Lipiden reichern sich daher in Makrophagen und glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäßwand an und führen zu Schaumzellbildung und Tod der phagozytierenden Zellen (ROSS et al., 1993; NAKAJIMA et al., 2006), Vorgänge bei der Atheroskleroseentwicklung.

Tabelle 8 Rolle von oxLDL an der Atheroskleroseentstehung

Hinweis	Literatur
Erhöhte oxLDL-Spiegel korrelieren mit kardiovaskulären Ereignissen.	HOLVOET 2003; HANSSON 2005
Isoliertes LDL aus atherosklerotischen Gefäßläsionen ähnelt in vitro erzeugtem oxLDL.	STEWART et al., 2007
Epitope, charakteristisch für oxLDL, sind in atherosklerotischen Läsionen zu finden.	PALINSKI 1989; STEWART et al., 2007
Atherosklerotische Läsionen enthalten Immunglobuline, die oxLDL erkennen.	YLÄ-HERTTUALA et al., 1994; LOPEZ et al., 2007
Serum enthält Auto-Antikörper gegen oxLDL.	PALINSKI et al., 1989; NILSSON et al., 2007
Antioxidative Behandlung vermindert die Entstehung von Atherosklerose in Tierexperimenten.	STEINBERG 1997; WIKLUND et al., 2007

3.3 Wirkungen von „nativem“ LDL und oxLDL auf Endothelzellen

In dieser Dissertation wird gezeigt, dass sowohl MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL als auch Cu²⁺-oxLDL für Endothelzellen cytotoxisch sind, im Gegensatz zu unbehandeltem LDL

(„natives LDL“). Erstmals wurde auch eine Senkung sowohl durch MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL als auch durch Cu²⁺-oxLDL auf das Expressionsniveau des eNOS-Proteins gezeigt, ohne dass dabei der Spiegel der mRNA verändert wurde. „Natives LDL“ übte dagegen kaum einen Einfluß auf den Gehalt an eNOS-Protein aus [1]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die oxLDL-induzierte Abnahme des eNOS-Proteins die Folge selektiven Abbaus ist, worauf in Abschnitt 2.5 bereits hingewiesen wurde. Eine erhöhte DCFA Fluoreszenz (Abschnitt 6.3) und insbesondere die Bildung von Proteincarbonylen (Abschnitt 6.4) zeigen, dass die beiden Formen des oxLDL einen oxidativen Stress in Endothelzellen auslösen. Unbehandeltes LDL ist unter diesen Bedingungen hingegen unwirksam. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Befunden anderer Autoren (GALLE et al., 2005; MÜLLER et al., 2006). Weitergehende Untersuchungen belegen, dass dies über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase und dadurch bedingte O₂^{•-}-Bildung erfolgt (Abschnitt 6.4). Identische Ergebnisse wurden mit Angiotensin II anstelle von oxLDL erhalten. Daher wurde die Angiotensin II-Behandlung von Zellen als einfacher handhabbares und reproduzierbares Modell in die Untersuchungen einbezogen.

4 Myeloperoxidase (MPO) und Atherogenese

4.1 Die biologische Rolle der MPO ist umfassender als früher angenommen

Die Myeloperoxidase (MPO) ist eine Häm-Peroxidase, die einer Proteinfamilie zugeordnet ist, zu der auch die Eosinophilenperoxidase, die Laktoperoxidase, die Schilddrüsenperoxidase und die Cyclooxygenasen gehören. Sie besteht aus einem glykosylierten Homodimer mit einer Molekulargröße von 150 kDa, verbunden durch eine einzige Disulfidbrücke. Die Myeloperoxidase spielt in neutrophilen Granulozyten und anderen Phagozyten bei der Abwehr von Pathogenen eine Rolle. Mit Hilfe von Wasserstoffperoxid vermag die MPO Chlorid in das starke Oxidationsmittel Hypochlorit zu oxidieren, welches für die Tötung und den oxidativen Abbau der Bakterien und Viren verantwortlich ist (HANSSON et al., 2006).

4.2 Reaktionen und Reaktionsmechanismus

Die Vielfältigkeit der Rolle der MPO ergibt sich unter anderem aus der Heterogenität der Substrate, die durch die MPO in Gegenwart von H₂O₂ umgesetzt werden können. Diese lassen sich entsprechend den Reaktionstypen mindestens vier Gruppen zuordnen:

- Halogenide (Cl⁻ und Br⁻) und Pseudohalogenide (SCN⁻)
- Stickstoffmonoxid (NO)
- Nitrit

➤ Phenole (Tyrosin, Polyphenole)

Das MPO-System umfasst zwei Hauptreaktionen: Während des katalytischen Zyklus der MPO bildet das Wasserstoffperoxid mit der MPO die aktivierte Redox-Zwischenstufe Compound I. In Schritt zwei oxidiert Compound I Chloridionen zur unterchlorigen Säure (HOCl). Die Reaktionen der MPO laufen in einem katalytischen Zyklus mit mehreren aktiven Zwischenstufen ab (BURNER et al., 2000; FURTMÜLLER et al., 2000) (Abb. 10). Die Gesamtheit der Reaktionen dieses Enzyms mit all seinen Substraten, Co-Substraten und Liganden ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Einen guten Überblick über die Reaktionen der MPO bietet der Übersichtsartikel von SCHEWE & SIES (2005) und PATTISON & DAVIS (2006).

Eigene Daten zeigen, dass (–)-Epicatechin LDL einen multiplen Schutz vor einer Modifizierung durch Myeloperoxidase bietet. Dieser Schutz übertrifft sogar den des als herkömmliches Antioxidanz verwendeten Vitamin C (Ascorbat), das sich hier als wirkungslos erwies [8]. Der Wirkmechanismus der Flavonoide mit MPO und Nitrit ist noch nicht genau verstanden. Mögliche Angriffspunkte sind Compound I und Compound II; die Interaktion führt zur Oxidation der Flavonoide.

4.3 Was spricht für eine Rolle der MPO bei endothelialer Dysfunktion und Atherogenese?

In Tabelle 9 sind einige Argumente für die Rolle der MPO bei der Entwicklung einer Atherosklerose zusammengestellt.

Tabelle 9 Rolle der MPO in der Atherogenese

Hinweis	Literatur
Die MPO und ihre Reaktionsprodukte wurden in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen, aber nicht in intakter Arterienintima.	DAUGHERTY et al., 1994; MALLE et al., 2000
MPO bindet an LDL und kann dieses zu oxLDL modifizieren, wie in vitro gezeigt werden konnte.	CARR et al., 2000a
Der Plasmaspiegel von MPO ist erhöht bei Personen die kurz vor einem Myokardinfarkt stehen, lange vor den anderen Parametern wie Troponin T. MPO ist hier ein hochsensitiver Marker, der neuerdings auch klinisch benutzt wird, um Hochrisikopatienten zu identifizieren.	BRENNAN et al., 2003

5 Wechselwirkungen der Myeloperoxidase mit LDL

5.1 Reaktion des MPO/H₂O₂/Nitrit/-Systems mit LDL als besondere Form der Modifizierung des LDL

In Abschnitt 4.3 wurde bereits auf die potenzielle Rolle der MPO für die Entstehung der Atherogenese eingegangen. In der vorliegenden Arbeit kamen die Cu²⁺-Katalyse und das MPO/H₂O₂/Nitrit-System für die Modifizierung des LDL zur Anwendung. Beide Systeme lösten eine Bildung konjugierter Diene im LDL aus, die sich sowohl im

Gesamtansatz als auch im Lipidextrakt des Reaktionsansatzes spektrophotometrisch gut quantifizieren ließen, sowie die Bildung von thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS), die die Gegenwart von Hydroperoxylipiden anzeigen. Das MPO/H₂O₂/Nitrit-System wurde von Kraemer et al (2003) etabliert. Um die MPO-vermittelte Lipidperoxidation zu quantifizieren, wurde die Extinktionsänderung der Verlaufskurven bei 234 nm verfolgt. Dies ist das Absorptionsmaximum der konjugierten Diene in den veresterten und nicht-veresterten Hydro(pero)xypolyen-Fettsäuren. Durch UV-spektrophotometrische Bestimmung der Menge an konjugierten Dienen im Lipidextrakt wurde sichergestellt, dass die beobachtete Extinktionsänderung bei 234 nm im kompletten Reaktionsansatz wirklich auf die Lipidperoxidation und nicht etwa auf Veränderungen der Absorption des Apo B-100 oder Trübungseffekte zurückzuführen war. Das von vielen Autoren benutzte Modell der Lipidperoxidation des LDL durch Cu²⁺-Ionen wurde zum Vergleich herangezogen. In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass sich bei beiden Lipidperoxidationssystemen die Menge an TBARS nicht stöchiometrisch zur Menge an gebildeten konjugierten Dienen verhält. Ursache dafür könnte eine begrenzte Zugänglichkeit der lipophilen Hydroperoxydiene gegenüber dem hydrophilen TBARS-Reagenz sein. Hydroperoxydiene können außerdem partiell zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen reduziert worden sein. Der geringere Anteil an TBARS im MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL im Vergleich zum Cu²⁺-oxLDL könnte auf die Hydroperoxidaseaktivität der Myeloperoxidase zurückzuführen sein (FURTMULLER et al. 2000). Mit dem Cu²⁺-System entstanden unter den hier angewendeten experimentellen Bedingungen mehr Hydroperoxide und konjugierte Diene als mit dem MPO/H₂O₂/Nitrit-System. So war im MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL die Menge an konjugierten Dienen nur etwa halb so hoch wie im Cu²⁺-oxLDL. [1, 2].

5.2 (–)-Epicatechin unterdrückt die Lipidperoxidation im LDL durch das MPO/H₂O₂/Nitrit-Reaktionssystem; Vergleich mit anderen vasoprotektiven Verbindungen

In der vorliegenden Dissertation wurden zum erstenmal mit diesem System die Wirkungen von (–)-Epicatechin, Vitamin C, dem wasserlöslichen Vitamin E Analogon Trolox und Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin) verglichen. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen hinsichtlich der Hemmung der Lipidperoxidation des LDL durch das MPO/H₂O₂/Nitrit-System. Schon ab einer Konzentration von vier µM wurde eine vollständige Hemmung der Bildung konjugierter Diene durch (–)-Epicatechin erreicht und war damit genauso wirksam wie Trolox. Vitamin C bewirkte in dieser Konzentration lediglich eine leichte Verlängerung der Lag-Phase, während Aspirin selbst bei einer Konzentration von 100

μM unwirksam war. Obwohl sowohl Aspirin als auch die Flavonoide der dunklen Schokolade eine Hemmung der Plättchenaggregation zeigen (PEARSON et al., 2005), scheinen ihre Wirkmechanismen verschieden zu sein. Aspirin ist ein nicht selektiver Inhibitor beider COX-Isoformen. Durch eine irreversible Acetylierung der COX hemmt ASS schon in geringen Konzentrationen ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) die TXA_2 -Bildung (Thromboxan 2). Da die kernlosen Thrombozyten über einen limitierten Proteinsyntheseapparat verfügen, kann die COX nur begrenzt nachsynthetisiert werden. Flavanoide wie z.B. (+)-Catechin zeigen eine vergleichbare Wirkung in vitro erst bei relativ hohen Konzentrationen ($\text{IC}_{50} = 200 \pm 12 \mu\text{M}$) (GROSSER et al., 2000). Dagegen scheint ein enger Zusammenhang mit der NO-konservierenden Eigenschaft von Flavonoiden zu bestehen (Abschnitt 1.7). Mittels Citrullin-Assay und cGMP-Bestimmung wurde gezeigt, dass ASS zu einer Steigerung der endothelialen NO-Synthese führt. Das Expressionsniveau der endothelialen NO-Synthase wurde nicht beeinflusst. Die Stimulation NO/cGMP-abhängiger Signalwege durch ASS lässt sich, im Gegensatz zur (–)-Epicatechinbehandlung, mit einem direkten Effekt auf die Aktivität der NO-Synthase erklären. (GROSSER et al., 2000; GROSSER & SCHRODER 2003). Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und konnte durch den NO-Synthase-Inhibitor L-NAME inhibiert werden.

5.3 (–)-Epicatechin schützt auch vor oxidativer Modifizierung des Apoproteins des LDL

Neben Untersuchungen, die der Lipidkomponente des LDL gewidmet waren, wurde auch die Tyrosinnitrierung des ApoB-100 Proteins im LDL durch MPO/ H_2O_2 /Nitrit mittels „Dot-Blot“ untersucht. Das MPO/ H_2O_2 /Nitrit-System zeigte bei einer Nitritkonzentration von $50 \mu\text{M}$ eine deutliche Bildung von konjugierten Dienen, aber nur eine sehr geringe Tyrosinnitrierung. Dies war erst bei höheren Nitritkonzentrationen ($100\text{--}1000 \mu\text{M}$) nachweisbar. Die Oxidation von LDL beeinflusst nicht nur die Lipidkomponente des LDL, sondern auch verschiedene Eigenschaften der Lipoproteine, unter anderem die elektrophoretische Mobilität. Eigene Untersuchungen ergaben eine erhöhte elektrophoretische Mobilität des LDL nach Oxidation durch Cu^{2+} oder MPO/ H_2O_2 /Nitrit. Dies ist auf eine Oxidation der positiv geladenen Lysinreste der Apoproteine zum entsprechenden Aldehyd oder durch Kondensation der Lysinreste mit reaktiven Aldehyden, die bei der Lipidperoxidation entstehen, zu Azomethinen zurückzuführen, so dass das Molekül zunehmend negativer wird und die anionische elektrophoretische Mobilität steigt. Diese Veränderung lässt sich in der Agarose-Gelelektrophorese nachweisen (ESTERBAUER et al., 1989). Bei der MPO/ H_2O_2 /Nitrit-vermittelten LDL-

Oxidation nimmt die elektrophoretische Mobilität des LDL im Vergleich zum unbehandelten LDL zu. (-)-Epicatechin schützte konzentrationsabhängig vor dieser Veränderung [8]. Die Protein-Tyrosinnitrierung des LDL wurde durch (-)-Epicatechin und Trolox gehemmt. Vitamin C und Aspirin erwiesen sich unter diesen Bedingungen als wirkungslos [8]. Das (-)-Epicatechin schützte nicht nur vor einer Veränderung des Lipidanteils des LDL, sondern auch vor einer Modifizierung des Proteinanteils [1, 8] (KRAEMER et al., 2003).

5.4 Vergleich der Cytotoxizitäten des Cu²⁺-oxLDL und des MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL

Ausgehend von der Überlegung, dass die Wechselwirkung zwischen MPO, NO-Stoffwechsel und LDL eine Schlüsselrolle bei der Schädigung des Gefäßendothels und damit auch für den vermutlichen Schutzeffekt der Flavonoide spielen könnte, wurden die Wirkungen von MPO/H₂O₂/Nitrit-behandeltem LDL des Menschen auf kultivierte Endothelzellen untersucht. Dabei wurde mittels des MTT-Tests die allgemeine Zellvitalität geprüft. Der MTT-Test (MOSMANN et al. 1983) gibt ein Bild über die mitochondriale Funktionstüchtigkeit von Zellen und lässt außerdem auf ihre Zellproliferation schließen. In dieser Arbeit wurde der MTT-Test ausschließlich als Vitalitätstest verwendet, da den Versuchsansätzen kein serumhaltiges Nährmedium zugesetzt wurde, das für die Zellproliferation essenziell wäre. In Tabelle 10 sind einige andere ausgewählte Methoden zur Erfassung der Zellvitalität aufgeführt.

Tabelle 10 Methoden zur Messung der Zellvitalität bzw. -proliferation

Test	Aussage	Besonderheiten
MTT Test	Mitochondriale Energiekonservierung	Gibt die Anzahl der funktionstüchtigen Mitochondrien an und findet als Proliferationstest und Vitalitätstest Anwendung
Lactatdehydrogenase (LDH)	Integrität der Plasmamembran	Nachweis zur Unterscheidung von Apoptose u. Nekrose
BrdU Test	Funktionelle Intaktheit der DNA	Messung erfolgt in einer Zellpopulation, Nachweis der Zellproliferation
Trypanblau Test	Trypanblau wird aufgrund der Zellmembrandurchlässigkeit nur von den toten Zellen aufgenommen	reiner Vitalitätstest

Es wurden drei Linien von Endothelzellen hinsichtlich der Cytotoxizität von oxLDL untersucht und gezeigt, dass das MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL gegenüber Maus-Aorta-Endothelzellen (MAEC) weitaus toxischer als Cu²⁺-oxLDL ist. Während das MPO/H₂O₂/Nitrit-oxidierte LDL innerhalb von 24 h stark cytotoxisch wirkte, traten mit Cu²⁺-oxidiertem LDL nach dieser Zeitspanne noch keine wesentlichen Zellschädigungen auf. Protein-Tyrosin-Nitrierungen als Ursache der höheren Cytotoxizität des MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL waren kaum wahrscheinlich, da diese bei der hier eingesetzten Konzentration an Nitrit in der Regel nicht auftraten (KRAEMER et al., 2004). Möglicherweise kommt der schädigende Effekt beider Formen des oxidierten LDL nicht nur durch eine Modifizierung im Lipidanteil, sondern auch im Proteinanteil des LDL zustande. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung gestützt, dass weder der Hydroperoxid-Gehalt noch der Gehalt an konjugierten Dienen mit der Cytotoxizität beider Formen des oxLDL korrelierte. Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, da im MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL die Mengen an konjugierten Dienen, TBARS und dem bei 223 nm absorbierenden Oxidationsprodukt deutlich niedriger waren als im Cu²⁺-oxLDL [1]. Als Ursache für diese Diskrepanz konnte die Zusammensetzung an Oxysterolen im oxLDL, d.h. das Verhältnis 7 β -Hydroxycholesterol/7-Ketocholesterol als bestimmenden Faktor für die Cytotoxizität identifiziert werden (Abschnitt 8) [2].

6 Wirkungen von oxLDL auf Endothelzellen

6.1 MPO/Nitrit-oxLDL ist cytotoxisch für Endothelzellen und fördert in Endothelzellen einen proteasomalen Abbau von eNOS-Protein; (–)-Epicatechin unterdrückt diesen Prozess, ist aber selbst kein Proteasomeninhibitor

Eigene Daten zeigten eine Regulation des Expressionsniveaus von NO-Synthasen durch oxLDL in Endothelzellen. Während der Gehalt an eNOS-Protein durch proteasomalen Abbau nach oxLDL-Behandlung abnahm, stieg der Gehalt an iNOS-Protein an (Abschnitt 6.4). Eigene Daten belegten einen proteasomal vermittelten Abbau von eNOS-Protein in oxLDL-behandelten Endothelzellen [1, 3]. Die Hemmung des durch oxLDL induzierten

proteasomalen Abbaus von eNOS Protein steht im Einklang mit Daten anderer Autoren (MEINERS et al. 2006). Um die modifizierten Proteine zu bestimmen, wurden sowohl carbonylierte als auch nitrierte Proteine immunpräzipitiert. Folgende Beobachtungen wurden gemacht und wie folgt interpretiert: (-)-Epicatechin verhindert den Abfall des Expressionsniveaus der endothelialen NO-Synthase, indem es den proteasomalen Abbau des Enzyms unterdrückt, der durch oxidativen Stress ausgelöst wird. Die Proteasomenaktivität ist aber selbst nicht der Angriffspunkt von (-)-Epicatechin. Dem proteasomalen Abbau ging eine Modifikation des eNOS-Proteins voraus, welches von den Proteasomen als Zielobjekt erkannt wurde. Die proteasomale Aktivität ist vermutlich der begrenzende Schritt im oxLDL-vermittelten Abbau der eNOS, so dass modifiziertes eNOS-Protein vorübergehend akkumuliert wird, bevor es durch den Proteasomenapparat vollständig abgebaut wird. Diese Vorstellung wurde durch eigene Untersuchungen mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop sowie durch Immunpräzipitation gestützt, die eine enge Nachbarschaft von eNOS Protein, Proteasomen und carbonylierten Proteinen bzw. einen erhöhten relativen Gehalt an modifiziertem eNOS-Protein zeigten (Abb 6 und 7).

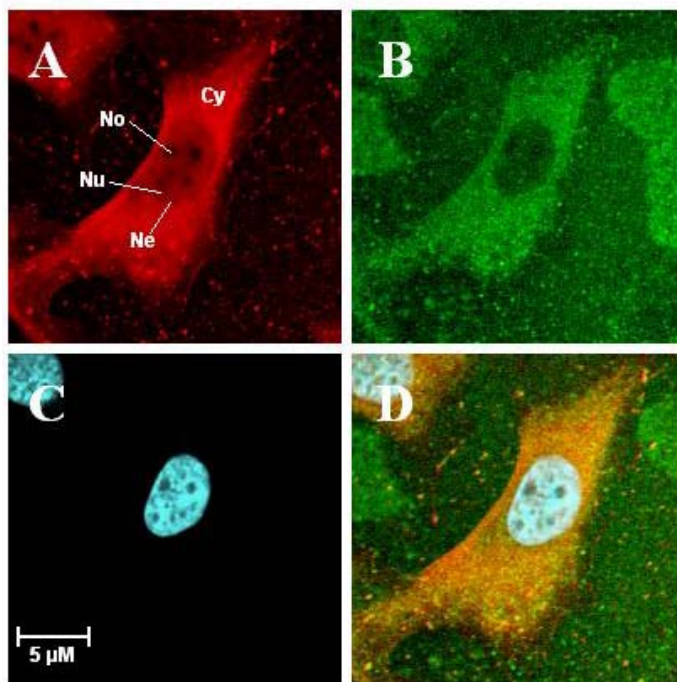


Abb. 6

Bild A: Lokalisation der 20S Proteasomen.

Bild B: Proteincarbonyle.

Bild C: DNA des Nucleus gefärbt mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).

Bild D: „Overlay“. Die gelb gefärbten Bereiche zeigen Co-Lokalisationen von Proteincarbonylen und Proteasomen an [3].

Cy = Cytoplasma

Nu = Nucleoplasma

No = Nucleolen

Ne = Kernhülle (nuclear envelope).

Aus eigenen Untersuchungen sowie Literaturdaten geht hervor, dass oxLDL den proteasomalen Abbauweg in humanen Endothelzellen auf vielfältige Weise beeinflusst (VIEIRA et al., 2000). Die durch oxLDL induzierte Hochregulation der iNOS könnte ein Schutzmechanismus von Endothelzellen gegenüber oxidativen Stress sein, denn $\cdot\text{NO}$

reguliert die proteasomalen Untereinheiten LMP2 und LMP7 hoch (KOTAMRAJU et al., 2006). Andererseits bewirkt oxLDL einen verstärkten Abbau des eNOS-Proteins [1, 3].

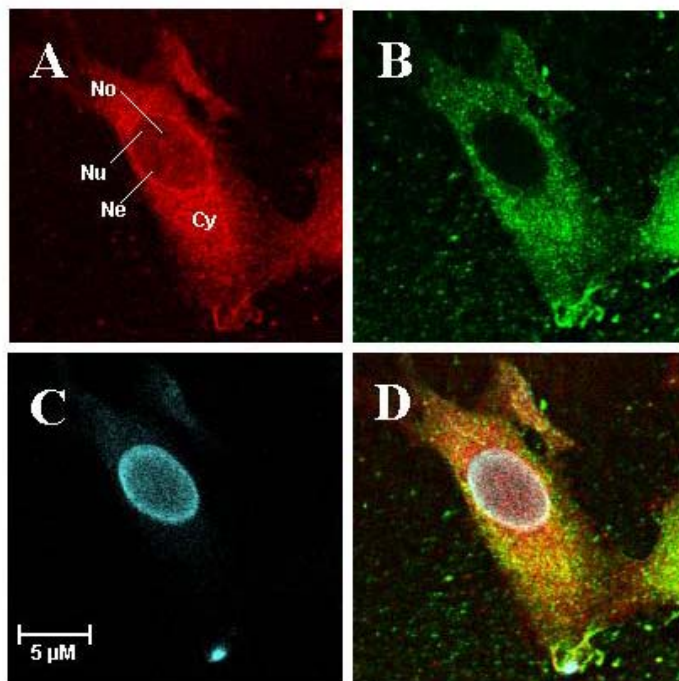


Abb. 7

Bild A: endothelialen NO Synthase
 Bild B: Proteincarbonyle
 Bild C: DNA des Nukleus gefärbt mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI).
 Bild D: einen „Overlay“. Die gelb gefärbten Bereiche zeigen Co-Lokalisationen von eNOS und Proteincarbonylen an [3].

Cy = Cytoplasma

Nu = Nucleoplasma

No = Nucleolen

Ne = Kernhülle (nuclear envelope).

Der durch oxLDL-vermittelte proteasomale Abbau bezieht nach Auffassung anderer Autoren den NFκB -Weg ein (ROBBESYN et al., 2003). Der proteasomale Proteinabbau in Endothelzellen stellt demnach eine Kombination aus vorteilhaften und nachteiligen Prozessen dar. Der Einsatz von niedrig dosierten Proteasomenhemmern könnte zur Behandlung einer endothelialen Dysfunktion (POON et al., 2006) und anderen Herzgefäß-Störungen beitragen.

6.2 (–)-Epicatechin schützt vor Schädigung kultivierter Endothelzellen durch oxLDL

Eigene Daten belegen, dass (–)-Epicatechin vor einer Vielzahl an cytotoxischen Wirkungen in Endothelzellen schützt [1,3,8] und die Oxidation von LDL sowohl durch das MPO/H₂O₂/Nitrit-Reaktionssystem, als auch durch das Cu²⁺ Reaktionssystem hemmt [1,3,8] (KOSTYUK et al., 2003; KRAEMER et al., 2003). Es scheint sowohl die Bildung als auch die Wirkung von schädlichem oxLDL zu hemmen und so einer endothelialen Dysfunktion entgegenzuwirken. Bei einer Übertragung von *In-vitro*-Daten auf mögliche *In-vivo*-Prozesse sollten folgende Fakten berücksichtigt werden: Bislang war der Metabolismus von (–)-Epicatechin in Endothelzellen noch weitgehend unbekannt. Auch existieren kaum Daten über die wirklich erreichten Konzentrationen von (–)-Epicatechin oder seiner Metaboliten in Endothelzellen. Dagegen sind die Wirkungen des (–)-Epicatechins nach oraler Einnahme auf die Endothelfunktion *in vivo* ausreichend untersucht worden und liefern eine Erklärung für eine günstige Beeinflussung der

Endothelfunktion durch polyphenolreichen Kakao. Die *in vivo* nachgewiesenen Schutzwirkungen von (–)-Epicatechin auf das Endothel legen nahe, dass (–)-Epicatechin dort in seiner bioaktiven Form in ausreichend hohen Konzentrationen akkumuliert werden kann. Ein Vergleich mit Plasmakonzentrationen *in vivo* ist nicht hilfreich, ja sogar irreführend, da (–)-Epicatechin *in vitro* akkumuliert werden kann (SCHROEDER et al., 2003). Die Wirkung von (–) Epicatechin auf die Endothelfunktion *in vivo* legt auch eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit und- aktivität von $\cdot\text{NO}$ nahe (SCHROETER et al., 2006).

Die in der vorliegenden Dissertation nachgewiesenen Effekte von (–)-Epicatechin auf das Expressionsniveau der eNOS- und iNOS-Proteine und die Nitrit/Nitrat-Quotienten in oxLDL-behandelten Endothelzellen sprechen für eine NO-konservierende Rolle. Das breite Wirkungsspektrum von (–)-Epicatechin in Endothelzellen beruht zu einem großen Teil auf einer Hemmung der NADPH-Oxidaseaktivität und damit einer Unterdrückung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung bzw. oxidativen und nitrosativen Stress, wobei die zusätzliche Beteiligung anderer antioxidativer Wirkungen des (–)-Epicatechins nicht ausgeschlossen werden kann.

6.3 (–)-Epicatechin schützt vor oxLDL-vermittelter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Endothelzellen

In der vorliegenden Dissertation wird gezeigt, dass zwei verschiedene als Modelle für oxidativ modifiziertes LDL herangezogenen Präparationen (MPO/ H_2O_2 /Nitrit-oxLDL und Cu^{2+} -oxLDL) oxidativen Stress in Gefäßendothelzellen auslösen (Abschnitt 3), welcher anhand des Auftretens von DCF-DA-Fluoreszenz (Dichlorofluoreszeindiacetat), Proteincarbonylen, Tyrosin-nitrierten Proteinen und 4-HNE-Addukten erstmals überzeugend nachgewiesen wurde (Abschnitt 6.4) [3]. DCF-DA ist eine neutrale Verbindung, die leicht durch Diffusion in die Zelle gelangt. In der Zelle hydrolysiert es zum nichtfluoreszierenden geladenen Spaltprodukt DCFH, welches nicht mehr zellpermeabel ist und daher in der Zelle akkumuliert wird. Bei Vorliegen von prooxidativen Prozessen in der Zelle wird das DCFH zu dem fluoreszierendem 2',7'-Dichlorofluoreszein (DCF) (ROYALL & ISCHIROPOULUS 1993) oxidiert. Eigene Untersuchungen ergaben, dass (–)-Epicatechin vor oxidativem Stress in der Zelle, angezeigt durch eine deutliche Abnahme der DCF-Fluoreszenz, schützt. Da die DCF-Fluoreszenz ein unspezifischer Marker für oxidativen Stress in der Zelle ist, wurden zusätzlich spezifischere Marker des oxidativen Stresses verfolgt. Darauf wird in den nachfolgenden Abschnitten eingegangen. Tabelle 11 fasst einige Schutzwirkungen des

(-)-Epicatechin vor oxidativem Stress in Endothelzellen zusammen, die in der vorliegenden Dissertation nachgewiesen wurden.

Tabelle 11 Schutzwirkungen des Epicatechin vor oxidativem Stress in Endothelzellen

	Zelllinie	Testsystem	Schutz durch Epicatechin-behandlung	Literatur
Integrität der Plasmamembran	HUVEC	LDH-Freisetzung	+	8
Mitochondriale Energiekonservierung	HUVEC, BAEC, EA.hy 926	MTT-Reduktion	+	1, 8
Zellproliferation	HUVEC	BrdU-Proliferation	+	8
Integrität der DNA	HUVEC	DNA-Fragmentierung	+	5, 8
Proteinoxidation	BAEC	Glutathion Spiegel	+	3
Proteinnitrierung	HUVEC	Proteincarbonylierung	+	3
Redox Status in der Zelle	HUVEC	3-Nitrotyrosin	+	8

6.4 (-)-Epicatechin unterdrückt Kennzeichen von oxLDL-vermitteltem oxidativen und nitrosativen Stress

Modulierung des GSH-Stoffwechsels

Wie in Abschnitt 2.5 erwähnt bewirkt oxLDL in Endothelzellen eine Abnahme des endogenen antioxidativen Schutzstoffs GSH (Glutathion). (-)-Epicatechin schützt dagegen vor einem Abbau von GSH und unterstützt so das endogene Abwehrsystem.

Unterdrückung der Bildung von Proteincarbonylen

ROS (reaktive Sauerstoffspezies) können Proteine unter anderem durch Oxidation oder Nitrierung modifizieren. Proteinmodifizierungen in Gefäßendothelzellen wurden zuvor vom Kooperationspartner dieser Arbeit beschrieben (GRUNE et al., 2005; JUNG et al., 2006). Angiotensin II, ein physiologischer Vermittler von Gefäßfunktionen, führt zur Bildung von Proteincarbonylen und nitrierten Proteinen. Es stimuliert sowohl die NO-Bildung durch die iNOS als auch die $O_2^{\cdot-}$ -Freisetzung durch die NADPH-Oxidase in Endothelzellen [3]. Diese Beobachtungen belegen zugleich grundlegende Gemeinsamkeiten der Wirkungen von Angiotensin II und verschiedenen Formen des oxLDL. Insbesondere die Oxidation der Proteine kann direkt durch Schäden am Molekül und Ausfall der Katalysatorfunktion eine weitergehende pathologische Folge haben. Oxidierte Proteine können funktionell beeinträchtigt sein und sind dann für die Zelle unbrauchbar. Zugleich wird die Empfindlichkeit gegenüber Proteinasen erhöht, wodurch sie durch Proteasomen selektiv eliminiert werden können (GRUNE et al. 1998, POPPEK et al. 2006). Auf diese Weise können die Zellen oxidierte Proteine entfernen. Carbonyl-Gruppen werden auf Protein-Seitenketten (besonders Pro, Arg, Lys, und Thr) gebildet, wenn sie oxidiert werden. Der Gehalt an Proteincarbonylen ist ein allgemeines Kennzeichen und der am häufigsten verwendete Indikator für eine Proteinoxidation und damit ein guter Parameter für oxidativen Stress in Endothelzellen (Abb 6 u. 7). In dieser Dissertation wird gezeigt, dass sowohl die Verstärkung der DCF-Fluoreszenz, als auch die Bildung von modifizierten Proteinen Parameter für oxidativen Stress in Endothelzellen, durch den NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin unterdrückt werden [3]. Damit wird eine Beteiligung der NADPH-Oxidase in Endothelzellen beim Entstehen prooxidativer Effekte durch oxLDL und Angiotensin II sehr wahrscheinlich gemacht. Eine Beteiligung der durch NADPH-Oxidase gebildeten Superoxidanionen in BAEC wurde von anderen Autoren für oxidiertes Phosphatidylcholin gezeigt (ROUHANIZADEH et al., 2005). Mindestens zwei Mitglieder der gp91phox Familie NOX2 und NOX4, katalytische Untereinheiten von NADPH-Oxidasen, sind in vaskulären Endothelzellen vorhanden (VAN BUUL et al., 2005). Die

Daten der intrazellulären Verteilung der modifizierten Proteine [3] lassen eine vorrangige Rolle der Isoform NOX4 vermuten. Diese wird in vaskulären Endothelzellen stärker exprimiert als die NOX2 und trägt sowohl zur basalen $O_2^{\cdot-}$ - als auch zur TGF- β induzierten ROS-Bildung bei (MURILLO et al., 2007). In Gefäßendothelzellen ist die NOX4 in der Zellkernhülle lokalisiert. So wurden die höchsten Konzentrationen an modifizierten Proteinen in unbehandelten und oxLDL-behandelten Zellen in der perinukleären Zone gefunden [3]. Erstaunlicherweise wurde ein bevorzugtes Auftreten von modifizierten Proteinen an der zum Cytoplasma hin angrenzenden Seite der perinukleären Zone der Endothelzellen gefunden. In der Kernmembran sitzt eine katalytische Untereinheit der NADPH-Oxidase. Diese in der Nukleusmembran gebundene Untereinheit kann mit anderen cytosolischen Untereinheiten wie 47phox, p67phox, p40phox und dem kleinen G-Protein Rac 1 zu einem enzymatisch aktiven Multienzymkomplex assoziieren. Dieser setzt dann $O_2^{\cdot-}$ zur Cytoplasmaseite hin frei. $O_2^{\cdot-}$ diffundiert nur über kurze Distanzen und reagiert diffusionskontrolliert mit $\cdot NO$ zum starken Oxidanz Peroxynitrit (KRÖNCKE et al., 2002; SUSCHEK et al., 2006). In nicht-endothelialen Zellen ist hingegen eine Co-Lokalisation des Cytoskeletts mit Proteincarbonylen beschrieben worden (THOMAS & ADVANI 2006, DIVALD et al., 2006), z.B. eine Carbonylierung von Actin. Dies konnte in eigenen Untersuchungen an Gefäßendothelzellen nicht festgestellt werden. Die NADPH-Oxidase-Aktivität ist in Endothelzellen anscheinend hauptsächlich auf die Umgebung des Zellkerns beschränkt (RAJAGOPALAN et al., 1996). Die Tatsache, dass zwei unterschiedliche Formen des oxLDL, MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL und Cu²⁺-oxLDL, ähnliche Effekte in Endothelzellen auslösen, lässt auf eine universelle Wirkung verschiedener Formen des oxLDL unabhängig von deren Genese schließen. Die Bildung von modifizierten Proteinen nach oxLDL-Behandlung hängt *in vitro* von verschiedenen Parametern ab. Dazu gehören der Oxidationsgrad des LDL, die Menge an oxLDL pro definierter Anzahl von Zellen und die Dauer der Inkubation der Endothelzellen mit oxLDL. Bei der Interpretation dieser Daten ist zu berücksichtigen, dass das Ausmaß der prooxidativen Effekte innerhalb einer so kurzen Zeitspanne nicht *in vivo* erzielt werden kann. Hinzu kommt die Tatsache, dass hinsichtlich der Entstehung des oxLDL *in vivo* noch Unklarheit herrscht, zumal eine Anzahl mechanistisch sehr unterschiedlicher endogener prooxidativer Faktoren dafür potenziell in Frage kommt. Eigene Daten zeigen, dass bei oxLDL-vermitteltem Stress in Endothelzellen Radikale mit vinyloger Doppelbindung und HNE (4-Hydroxy-2-nonenal)-Addukte gebildet werden. HNE wird als Begleitprodukt der Lipidperoxidation gebildet, ist gentoxisch, mutagen und bildet promutagene DNA-Addukte, die zur Krebsentstehung

führen können. Eine (-)-Epicatechinbehandlung der Zellen schützt vor der Bildung von HNE-Protein-Addukten, vermutlich über die Unterdrückung der HNE-Bildung.

Unterdrückung der Nitrierung von Proteinen

Eigene Daten belegen eine Regulation des Expressionsniveaus von NO-Synthasen durch oxLDL in Endothelzellen [3]. Während der Gehalt an eNOS-Protein durch proteasomalen Abbau nach oxLDL-Behandlung abnahm, stieg der Gehalt an iNOS Protein an. Es erfolgte dadurch eine Umkehr des eNOS/iNOS-Quotienten im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Einerseits ist •NO wichtig für die Tonusregulation von Gefäßen und Apoptoseprozesse, andererseits demonstrieren Experimente, dass die destruktiven Eigenschaften des Stickstoffmonoxids nicht, wie längere Zeit angenommen, diesem selbst innewohnen, sondern vielmehr seinen Folgeprodukten, darunter dem Peroxynitrit (ONOO-). Ein Marker für nitrosativen Stress ist das 3-Nitrotyrosin. Die Zunahme an nitrierten Proteinen nach Behandlung mit oxLDL sowie die Wirkung des selektiven iNOS-Hemmers L-NIO sprechen für eine durch iNOS vermittelte NO-Bildung. Der Arbeitskreis um Ischiropoulos postulierte, dass die NO-abhängige Proteintyrosinnitrierung ein physiologisch relevanter Prozess in spezifisch speziellen Kompartimenten in der Nähe der iNOS und anderer ROS-bildender Enzyme ist (HEIJNEN et al., 2006). Die oxLDL-vermittelte Hochregulation der iNOS sowie die iNOS-abhängige Nitritbildung in Endothelzellen könnte mit dem Auftreten von nitrierten Proteinen in atherosklerotischen Läsionen im Zusammenhang stehen (LUOMA et al. 1998, DEPRE et al. 1999, CROMHEEKE et al. 1999). Auf diese Weise könnte die Proteinnitrierung in Endothelzellen am Frühstadium der Entstehung von Atherosklerose beteiligt sein.

7 Oxysterole

7.1 Vorkommen und Entstehung der Oxysterole

Oxysterole sind oxygenierte Cholesterolderivate, die neben der Hydroxylgruppe am C-Atom 3 ein weiteres Sauerstoffatom als Carbonyl-, Hydroxyl- oder Epoxidgruppe am Ring A oder B oder an der Seitenkette des Cholesterols aufweisen. Sie werden im Organismus entweder endogen gebildet oder exogen über die Nahrung zugeführt. Zum einen erfolgt die endogene Bildung von Oxysterolen im Organismus auf enzymatischem Wege entweder durch Oxygenasen der Cytochrom P450-Familie kurz CYP-Enzyme genannt oder durch Nichthämeisen-Enzyme wie der Cholesterol-25-Hydroxylase (LEONARDUZZI et al., 2007). Zum anderen entstehen Oxysterole im Organismus auch auf nicht-enzymatischem Weg durch direkte Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (SMITH 1996), insbesondere aber als Folge der Peroxidation polyungesättigter

Fettsäuren (PUFA) (SEVANIAN & MCLEOD 1987). Deshalb werden vor allem 7 β -Hydroxycholesterol (7 β -OH-Chol) (Abb. 8), aber auch 7-Ketocholesterol (7-Keto-Chol) (Abb. 8), Cholestantriol (= 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxycholestane) und die epimeren Cholesterol-5,6-epoxide als *In-vivo*-Parameter der Lipidperoxidation, bzw. als Marker für oxidativen Stress, herangezogen (ISHII et al., 2001, IULIANO et al., 2000, IULIANO et al., 2003).

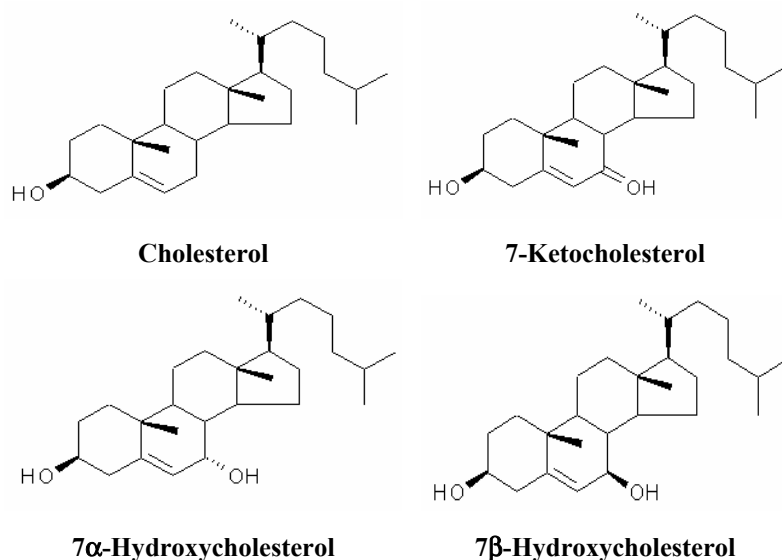


Abb. 8

Ausgewählte Oxysterole im Humanplasma (BJÖRKHEM et al., 2002)

Die Bildung von Oxysterolen im Zuge der Lipidperoxidation erfolgt wahrscheinlich dadurch, dass eine Wasserstoffabstraktion an der besonders reaktiven bis-allylständigen-Methylengruppe der PUFA und nachfolgende Anlagerung von Sauerstoff zur Bildung eines Fettsäureperoxylradikals führt (FRANKEL 1991; GUTTERIDGE 1995). Dieses Fettsäureperoxylradikal kann nun ein Wasserstoffatom am Brücken-C-Atom 5 des Cholesterols abstrahieren. Das dabei entstehende alizyklische Radikal isomerisiert dann sofort zum thermodynamisch stabileren Radikal, das dann mit Sauerstoff zum entsprechenden 7-Peroxyradikal und schließlich unter H-Aufnahme zu epimeren Hydroperoxycholesterolen (7-OOH-Chol) reagiert. Diese sind chemisch sehr reaktiv und werden über verschiedene Mechanismen wie Radikal-Kombinierung und/oder – Disproportionierung zu den stabileren Endprodukten 7 α - und 7 β -OH-Chol und 7-Keto-Chol weiter reagieren (GARDNER 1987). Darauf deutet unter anderem die 7-OOH-Chol-Bildung in der Frühphase und die 7-OH-Chol-Bildung in der Spätphase der LDL-Oxidation hin (BROWN et al. 1997). Die Dominanz des 7 β -Hydroxycholesterols gegenüber dem 7 α -Hydroxycholesterol (Abb. 8) in biologischen Systemen könnte durch Isomerisierung des 7 α -OOH-Cholesterols in das thermodynamisch stabilere 7 β -OOH-Cholesterol vor der Umwandlung zum entsprechenden OH-Cholesterol erklärt werden.

7.2 Methodische Probleme der Oxysterolanalytik im oxLDL

Das Oxysterolmuster in ox-LDL-Präparationen, die mittels Katalyse durch Cu^{2+} bzw. Myeloperoxidase/ H_2O_2 /Nitrit erhalten wurde, unterschied sich ebenso wie ihre Cytotoxizität gegenüber vaskulären Endothelzellen. Für einen präzisen Vergleich war es erforderlich, die für Analysen im Blutplasma etablierte Methodik für die Analytik im oxLDL zu adaptieren. Notwendige Adaptationen waren die Reduktion der Hydroperoxysterole und Hydroperoxyfettsäuren, die im Plasma nicht nennenswert auftreten, im oxLDL jedoch sekundäre Umlagerungen während der Probenaufbereitung bedingen würden. Als Reduktionsmittel für oxLDL-gebundene Hydroperoxide hat sich Triphenylphosphin bewährt, wohingegen Natriumborhydrid aufgrund seines hydrophilen Charakters versagte. Außerdem konnte als zusätzliches Oxysterol das 7α -Hydroxycholesterol detektiert und quantifiziert werden.

7.3 MPO/ H_2O_2 /Nitrit-oxLDL und Cu^{2+} -oxLDL zeigen unterschiedliche Oxysterol-Muster

Im Abschnitt 5.1 wurde beschrieben, dass MPO/ H_2O_2 /Nitrit-oxLDL trotz geringeren Gehaltes an TBARS und konjugierten Dienen stark cytotoxisch war. Zu dieser erhöhten Toxizität könnte das Oxysterolmuster beitragen. Im MPO/ H_2O_2 /Nitrit-oxLDL war der Gehalt an 7β -Hydroxycholesterol gegenüber 7-Ketocholesterol 5 bis 11 fach höher, wohingegen im Cu^{2+} -oxLDL 7β -Hydroxycholesterol und 7-Ketocholesterol in etwa gleichen Mengen vorlagen. Die Ursache für diesen Unterschied könnte in der Hydroperoxidaseaktivität der Myeloperoxidase liegen (FURTMULLER et al., 2000). Bei der Lipidperoxidation von Cholesterol entsteht als erstes fassbares Produkt 7-Hydroperoxycholesterol, das durch Umlagerungsreaktionen zum stabileren 7-Ketocholesterol isomerisieren kann. Durch die Hydroperoxidaseaktivität der MPO wird das 7-Hydroperoxid zum entsprechenden Hydroxid reduziert. Diese Reaktion kommt der Umlagerung zum 7-Ketocholesterol zuvor und unterdrückt diese somit. Bei der Cu^{2+} -katalysierten LDL-Modifizierung ist diese Möglichkeit hingegen nicht gegeben. Die Hydroperoxidaseaktivität der MPO gegenüber Hydroperoxypolyenfettsäuren gibt außerdem eine mögliche Erklärung, weshalb MPO/ H_2O_2 /Nitrit-oxLDL deutlich weniger TBARS als Cu^{2+} -oxLDL enthielt; denn der TBARS-Assay erfasst unter anderem die Hydroperoxypolyenfettsäuren.

7.4 Biologische Wirkungen der Oxysterole; Oxysterole als proinflammatorische und atherogene Mediatoren

Eine Vielzahl von Studien sind den biologischen Wirkungen spezifischer Oxysterole, die im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen (Atherogenese, Kanzerogenese, Mutagenese) diskutiert werden, gewidmet (MOREL et al., 1996). Die meisten Beobachtungen stammen jedoch aus *In-vitro*-Studien, in denen die Wirkungen isoliert verabreichter Oxysterole untersucht wurden. *In vitro*-Studien lieferten Hinweise, dass Oxysterole wie 7 β -Hydroxycholesterol und 7-Ketocholesterol oxidativen Stress induzieren (O'CALLAGHAN et al., 2002; LARSSON et al., 2007). Die Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Rolle der Oxysterole bei der Entstehung von Atherosklerose.

Die biologische Rolle von 7 β -Hydroxycholesterol wird weiterhin gestützt durch eine von Rimner und Mitarbeiter durchgeführte Studie (RIMNER et al., 2005). Diese Autoren stellten eine signifikant höhere Cytotoxizität von 7 β -Hydroxycholesterol gegenüber menschlichen Endothelzellen als 7 α -Hydroxycholesterol fest. Allerdings wurde gezeigt, dass 7 α -Hydroxycholesterol und nicht 7 β -Hydroxycholesterol zu einer Hochregulation von proinflammatorischen Mediatoren in U937-Zellen führt (Leonarduzzi et al. 2005). Die biologische Rolle des 7-Ketocholesterols dagegen erscheint widersprüchlich. Im Gegensatz zu Annahmen anderer Autoren (BROWN et al., 1997; HAYDEN et al., 2002; SHIMOZAWA et al., 2004) sprechen die Daten dieser Dissertation eher für eine antiatherogene Aktivität (Abschnitte 7.2 und 7.3).

Tab.12 Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Oxysterole an der Atheroskleroseentstehung

Hinweis	Literatur
In frühen und fortgeschrittenen atheromatösen Läsionen konnten Oxysterole in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden.	BROWN et al., 1997; GARCIA-CRUSET et al., 1999 und 2001 ; VAYA et al., 2001
7 β -OH-Chol und 7-Keto-Chol wurden neben dem Intermediat 7 β -Hydroperoxycholesterol als Komponenten mit der höchsten Cytotoxizität im oxidierten LDL identifiziert.	CHISOLM et al., 1994
Oxysterole wirken zelltoxisch und/oder apoptose-induzierend auf Endothelzellen [2], glatte Muskelzellen und Fibroblasten, aber auch auf Monocyten bzw. Macrophagen.	O'CALLAGHAN et al., 1999 und 2002; RIMNER et al., 2005
Oxysterole führen zu einer erhöhten Sekretion von Interleukin-1 β und zu einer erhöhten endothelialen Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin).	LEMAIRE et al., 1998 ; LIZARD et al., 1997
Humanstudien konnten belegen, dass erhöhte Plasmakonzentrationen an 7 β -OH-Chol ein erhöhtes Atheroskleroserisiko und eine erhöhte <i>in vivo</i> Lipidperoxidation anzeigen.	ZIEDEN et al., 1999

7.5 Zytotoxische Wirkungen von Oxysterolen auf kultivierte Endothelzellen

7 β -Hydroxycholesterol und Ketocholesterol erwiesen sich, allein zugesetzt, als äußerst toxische Komponenten gegenüber vaskulären Endothelzellen, indem sie oxidativen Stress auslösen. Die Cytotoxizität war von einer DNA-Fragmentierung begleitet und wurde durch den NADPH-Oxidase-Hemmstoff Apocynin verhindert, was auf eine Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Oxysterole schliessen ließ [2]. Dies wurde an einem anderen zellulären System (Maus-Makrophagen) bereits gezeigt (LEONARDUZZI et al., 2006). Mit (–)-Epicatechin ließ sich der Schutzeffekt des Apocynins simulieren, was auf einen ähnlichen Wirkmechanismus hindeutet (Abschnitt 9.5). 7-Ketocholesterol erwies sich allein zwar cytotoxisch, wenn auch weniger als 7 β -Hydroxycholesterol, schützte aber in Mischungen mit 7 β -Hydroxycholesterol vor den toxischen Wirkungen [2]. Die in der vorliegenden Dissertation erarbeiteten Daten belegen, dass (–)-Epicatechin auf mehreren Ebenen die Schädigungen von oxLDL und seiner Oxidationsprodukte unterdrückt. Es ist denkbar, dass sich das Oxysterolmuster als klinischer Parameter für Herz-Kreislaufkrankheiten eignet, jedoch bedarf dies der Überprüfung durch klinische Studien. Der Vorteil der Oxysterole besteht darin, dass es sich um einen Plasmalipoprotein-bezogenen Parameter handelt und damit eine größere Nähe zur Atherogenese gegeben ist. Darüber hinaus bestätigen die erhaltenen Daten, dass die biologische Wirksamkeiten von einzelnen Oxysterolen und einem Oxysterolmix verschieden sind (AUPEIX et al., 1995, BIASI et al. 2004).

7.6 Neubewertung der biologischen Rolle der Oxysterole

In der Literatur wurde vielfach über die cytotoxische Wirkung von Oxysterolen geschrieben. Es wurden jedoch fast ausschließlich Einzelkomponenten getestet, die sich auch in eigenen Experimenten als äußerst cytotoxisch erwiesen. Von Mitarbeitern der Gruppe Poli (Turin) wurde erstmals beobachtet, dass anscheinend in der Oxysterolmischung das als Einzelkomponente cytotoxische 7-Ketocholesterol die zellschädigenden Wirkungen des 7 β -Hydroxycholesterol aufhob (BIASI et al., 2004). Somit scheint hinsichtlich der physiologischen Funktion das 7-Ketocholesterol eine Art Gegenspieler für das 7 β -Hydroxycholesterol zu sein. Dies sollte bei zukünftigen Oxysterolstudien berücksichtigt werden.

8 (–)-Epicatechin und •NO-Spiegel in Endothelzellen

8.1 (–)-Epicatechinbehandlung erhöht den intrazellulären Spiegel an •NO in Endothelzellen

In den Abschnitten 2 und 6 wurde bereits beschrieben, dass eine Vorbehandlung von Endothelzellen mit (–)-Epicatechin vor oxidativem Stress schützt, indem es den NO-Spiegel in der Zelle aufrechterhält. Die direkte Bestimmung der intrazellulären Konzentration an •NO erwies sich lange als methodisch schwierig. Auch die Anwendung von NO-Sensoren ist schwierig und unzuverlässig, da ein solcher Sensor nur das von der Zelle abgegebene •NO erfassen kann (Abschnitt 2.8). Ein Durchbruch brachte die Einführung des Fluoreszenzfarbstoffes DAF-2 DA (Abb.9). Während unbehandelte Endothelzellen nur ein schwaches NO-Signal zeigten, führte eine Vorbehandlung der Zellen mit (–)-Epicatechin oder Apocynin zu einem signifikant erhöhten intrazellulären NO-Spiegel, wahrscheinlich, wie im Abschnitt 6 beschrieben, durch Unterdrückung der O₂^{•-}-Bildung durch die NADPH-Oxidase. Angiotensin II, ein Aktivator der NADPH-Oxidase, hob hingegen diesen Effekt auf, da das gebildete •NO mit O₂^{•-} zu ONOO⁻ reagiert. Auch der NO-Synthaseinhibitor L-NAME führte zu einer Abnahme der DAF-2 DA-Fluoreszenz, ein Beleg dafür, dass der NO-Spiegel von einer eNOS-und/oder iNOS-NO-Bildung abhängig ist [4].

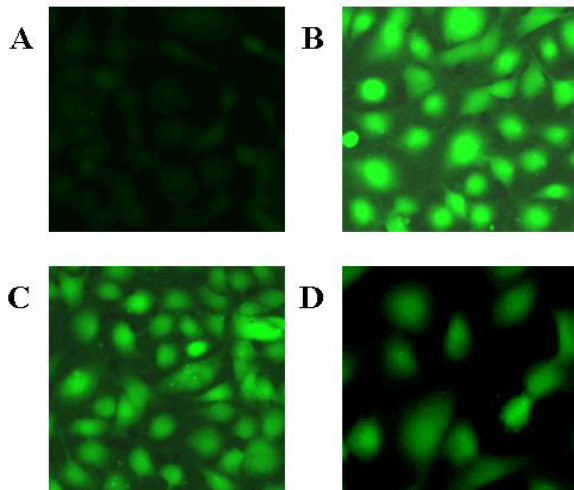


Abb. 9

NO-Spiegel in humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC). Gefärbt mit einem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF-2DA.

Bild A: basale NO-Produktion in unbehandelten HUVEC;

Bild B: PAPANONaOat induzierte NO-Produktion

Bild C: (-)-Epicatechin induzierte NO-Produktion;

Bild D: Wirkung von (-)-Epicatechin unter Inhibition der eNOS durch L-NAME.

8.2 Endotheliale COMT wandelt (-)-Epicatechin in B-Ring-Monomethylether um und trägt massgeblich zum Endothelschutz bei

In Abschnitt 1.6 wurde bereits erwähnt, dass das Endothel das Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) exprimiert und in der Lage ist, (-)-Epicatechin zu Monomethylethern zu verstoffwechseln. Die Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität nach Vorinkubation von Endothelzellen mit (-)-Epicatechin ist auf eine O-Methylierung des (-)-Epicatechins im B-Ring durch COMT zurückzuführen [6]. Dieses Enzym wurde in Endothelzellen nachgewiesen. Die Schutzeffekte des (-)-Epicatechins ließen sich mit 3'- und 4'-O-Methyl-Epicatechin simulieren, eine mehrstündige Vorbehandlung der Zellen war in diesen Fällen nicht erforderlich. Aus diesen Daten zeigt sich eine spezifische Rolle der COMT im endothelialen Flavonoidstoffwechsel. Da Endothelzellen die durch die Nahrung aufgenommenen Flavonoide aus dem Plasma aufnehmen können, könnte diese Wirkung der COMT dem Schutz des Endothels dienen, indem sie hoch wirksame Inhibitoren eines Hauptweges der ROS-Bildung, die NADPH-Oxidasen, erzeugt. In dieser Dissertation wurde diese Schutzwirkung bereits für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und den Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR) gezeigt [3]. In Tabelle 13 sind ausgewählte Effekte des (-)-Epicatechins auf den NO-Stoffwechsel von HUVEC zusammengestellt.

Tabelle 13 Wirkungen der Vorbehandlung von HUVEC mit (–)-Epicatechin auf verschiedene Parameter des NO-Stoffwechsels

Aktivität/Parameter	Effekt	Referenz
Intrazellulärer NO-Spiegel	↑	[5]
cGMP-Spiegel	↑	[4, 5]
NOS-Aktivität	=	[5]
Guanylatcyclaseaktivität	=	[5]
eNOS-Phosphorylierung	=	[5]
Tetrahydrobiopterin	=	[5]
Angiotensin II vermittelte $O_2^{\cdot-}$ -Freisetzung	↓	[3, 4, 5]
NADPH-Oxidaseaktivität	↓	[3, 4, 5]
OxLDL-vermittelter ox. Stress	↓	[1, 2, 3]
Arginaseexpression	↓	BROSSETTE et al. 2007

↑ Erhöhung; = kein Effekt; ↓ Abnahme

8.3 Der COMT-Inhibitor 3,5 Dinitrocatechol schwächt die (–)-Epicatechinwirkung ab

3,5-Dinitrocatechol, ein COMT-Hemmer, hob den Schutzeffekt durch (–)-Epicatechin auf. Die Hemmung der NADPH-Oxidaseaktivität durch O-methylierte Umwandlungsprodukte des (–)-Epicatechins erwies sich somit als die physiologisch vermutlich bedeutsamere Wirkung. Durch dieses Wirkungsprinzip wird bereits die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ verhindert, wohingegen die Fängerwirkung erst auf einer nachfolgenden Stufe der NADPH-Oxidase-vermittelten Kausalkette der Zellschädigung über oxidativen Stress eingreifen kann. Dabei können schädliche Reaktionen des $O_2^{\cdot-}$ stattfinden, bevor sie durch (–)-Epicatechin abgefangen werden. Die Hemmung des Schutzeffektes der (–)-Epicatechinbehandlung durch den COMT-Inhibitor sowie der ausgeprägtere Schutzeffekt der Langzeitbehandlung gegenüber einer Kurzzeitbehandlung stehen im Einklang mit dieser Interpretation [4, 5].

8.4 Der durch (–)-Epicatechin vermittelte Anstieg des intrazellulären $\cdot NO$ in Endothelzellen geht mit einem Anstieg des cGMP-Spiegels einher

Parallel zur Erhöhung des NO-Spiegels (Abschnitt 9.2) wurde auch eine Erhöhung der cGMP-Freisetzung beobachtet [5]. Eigene Beobachtungen ergaben, dass (–)-Epicatechin und (+)-Catechin (40 μM , 24 h) sowohl den basalen als auch den shear-stress-induzierten cGMP-Spiegel erhöhen. Die Eigeneffekte der Flavanoole auf cGMP-Spiegel und die Verstärkung der shear-stress-Effekte waren zeit- und konzentrationsabhängig [5], dabei hemmte L-NAME die Effekte nur partiell. Die Erhöhung des cGMP-Spiegels in Endothelzellen spricht eindeutig für eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit des $\cdot NO$. Diese Beobachtung steht in Einklang mit *In vivo*-Daten (Abschnitt 1.7, HEISS et al.,

2003), die von zwei anderen Arbeitsgruppen (FISHER et al., 2003; ENGLER et al., 2006) bestätigt wurden.

8.5 NOS-Aktivität ist vermutlich kein Angriffspunkt von (–)-Epicatechin und seiner Metabolite

Trotz erhöhten cGMP-Spiegels wurden keine Effekte des (–)-Epicatechins auf die *de novo*-Synthese von $\cdot\text{NO}$, gemessen durch Citrullinbildung, gefunden [5]. Außerdem wurde gezeigt, dass (–)-Epicatechin und Catechin keinen Einfluss auf die shear-stress-induzierte Phosphorylierung der eNOS an den Serinresten 1177 und 635 sowie auf die basale Lokalisation der eNOS ausüben. Außerdem wurde weder eine Erhöhung des Nitrosothiolspiegels als zusätzliche NO-Quelle bzw. des Tetrahydrobiopterins, noch eine Steigerung der Guanylatcyclase (Abschnitt 2.8) nachgewiesen. Diese Beobachtungen ließen einen stimulierenden Effekt der Flavanoide auf die Bildung von $\cdot\text{NO}$ in Endothelzellen wenig wahrscheinlich erscheinen. Dies würde bedeuten, dass der Spiegel an bioverfügbarem und bioaktivem $\cdot\text{NO}$ nicht allein von der NOS-Aktivität abhängt, wie etliche Autoren vermuteten (HEISS et al., 2003, SCHROETER et al., 2006), sondern auch auf andere Weise durch Wirkstoffe verändert werden kann. Mit der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Dissoziation von Citrullinbildung aus L-Arginin und cGMP-Spiegel wurde ein Beleg dafür erhalten [5]. Der Anstieg des cGMP sollte mit einem erhöhten NO-Spiegel einhergehen. Dies wurde durch Bestimmung der DAF-Fluoreszenz in lebenden Zellen gezeigt (Abschnitt 9.2) [4]. Dies belegt, dass die Monomethylether des (–)-Epicatechins die Bioverfügbarkeit von $\cdot\text{NO}$ in Endothelzellen durch Hemmung der NADPH-Oxidase erhöhen.

9 (–)-Epicatechin-Monomethylether und andere Flavonoide als NADPH-Oxidasehemmer

9.1 Kurz- und Langzeitbehandlung von Endothelzellen mit (–)-Epicatechin hemmt die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Freisetzung aus Endothelzellen

Wie in Abschnitt 6.4 erläutert wurde, lösen oxLDL und Angiotensin II oxidativen Stress in Zellen aus. Es galt nun zu überprüfen, wie diese Wirkung zustande kommt, da $\text{O}_2^{\cdot-}$ als wichtige schädliche Noxe von Endothelzellen bekannt ist. Es wurde eine Schlüsselrolle des NADPH-Oxidasewegs postuliert und schließlich bewiesen [3]. Die endotheliale NADPH-Oxidase spielt eine wichtige regulatorische Rolle z. B. bei der Angiogenese von Endothelzellen (CAI et al., 2005). Die Wirkung von ROS als Signalmoleküle erfordert fein abgestimmte Kontrollmechanismen, damit nicht bei übermäßiger NADPH-Oxidase-Aktivität proinflammatorische und cytotoxische Prozesse ausgelöst werden. Ernährungsrelevante Polyphenole und ihre Metaboliten könnten durch Absenken der

Superoxidanionenkonzentration und durch Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität eine wichtige Regulatorfunktion im Endothel übernehmen (RAY & SHAH 2005). Neben der NADPH-Oxidase ist noch eine zweite $O_2^{\cdot-}$ -bildende Quelle bekannt, die Xanthinoxidase (XO). Für diese wurde eine Hemmung durch Flavonoide bereits beschrieben (COS et al., 1998; SELLOUM et al., 2001), die vorwiegend auf der $O_2^{\cdot-}$ -Fängerwirkung beruht. In dieser Disseration wurde die Xanthinoxidase als Testsystem zusätzlich herangezogen, um zu prüfen, wie Radikalfängereigenschaften und NADPH-Oxidasehemmung sich unterscheiden. Im Falle des (-)-Epicatechins erwies sich die Fängerwirkung nur von sekundärer Bedeutung. In diesem System (Angiotensin II-Behandlung der Endothelzellen) wird der weitaus überwiegende Anteil an $O_2^{\cdot-}$ von der NADPH-Oxidase (NOX) gebildet. Wie später noch ausgeführt wird sind die Effekte der (-)-Epicatechinbehandlung von Endothelzellen auf eine NADPH-Oxidasehemmung zurückzuführen (Abschnitt 10). In dieser Arbeit wurde zum erstenmal die Hemmung der endothelialen NADPH-Oxidase (vermutlich NOX4) durch Flavonoide gezeigt [6]. In HUVEC scheint dabei die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch die Xanthinoxidase nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da der Xanthinoxidase-Hemmer Allopurinol auf die $O_2^{\cdot-}$ -Freisetzung keine Wirkung zeigte. Wie in Abschnitt 6.4 bereits beschrieben, bewirken oxLDL und Angiotensin II Carbonylierung und Nitrierung von Proteinen im perinukleären Bereich von Endothelzellen. Dieser Effekt kann durch eine 24 h-Vorbehandlung der Zellen mit (-)-Epicatechin aufgehoben werden. Da die Effekte des (-)-Epicatechins zeitabhängig waren, spricht dies schon gegen eine reine Fängerwirkung. Untersuchungen mit dem herkömmlichen NADPH-Oxidasehemmer Apocynin und 2-Desoxyglucose, ein Hemmer des Pentosephosphatweges, deuten auf eine NADPH-Oxidase-Hemmung hin. Literaturdaten sprechen dafür, dass die NOX4 durch oxidativ modifiziertes LDL und Angiotensin II hochreguliert wird. Sie scheint eine Schlüsselrolle in der Entstehung von oxidativem Stress zu spielen [3] (BERRY et al., 2000; GALLE et al., 2000).

9.2 Methodische Strategie zur Messung der NADPH-Oxidaseaktivität

Nachdem der NADPH-Oxidaseweg in Endothelzellen als Ursache des oxidativen Stresses identifiziert worden war, waren nun Untersuchungen am Enzymkomplex notwendig. Dazu war es erforderlich, im subzellulären System die Enzymaktivität zu messen. In dieser Dissertation wurde eine von JOHNSON (2002) beschriebene Methode modifiziert, die es erlaubt, im Zelllysate die NADPH-Oxidation direkt zu messen (Tabelle 14). Parallel dazu wurden noch andere Methoden zur Messung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung angewendet, deren Vor- und Nachteile in Tabelle 14 aufgeführt sind.

Tabelle 14 Methoden zur Messung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung

	Prinzip	Nachweisgrenze	Bemerkungen
Cytochrom C Assay	Messung von Superoxidanionbildung durch Reduktion von Ferri- zu Ferrocycytochrome c über die Extinktionszunahme bei 550 nm	Min. 10^6 Zellen im Monolayer (HUVEC)	Zuverlässiges Verfahren zur Messung der $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration im Zellüberstand. Keine Unterscheidung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch NOX und XO
Xanthinoxidase Assay	$O_2^{\cdot-}$ wird mittels dem Xanthin/Xanthin-Oxidase-System erzeugt und die Superoxidanionenbildung mittels Cytochrome C-Reduktion gemessen		Ermöglicht die Unterscheidung von $O_2^{\cdot-}$ -Fängerwirkung und NOX-Hemmung in vitro
NADPH-Oxidase-Assay	Messung der NADPH Oxidation im Zelllysate bei 340 nm nach Zusatz von NADPH und dem amphiphilen NADPH-Oxidase-Aktivator SDS	Min. 10^7 Zellen im Zelllysate (HUVEC)	Erlaubt die Differenzierung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung im Zelllysate

9.3 Methylether des (–)-Epicatechins hemmen die NADPH-Oxidation

Es wurden die Wirkungen monomethylierter Catechole auf die NADPH-Oxidase-Aktivität und die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch die Xanthinoxidase untersucht. Diese Verbindungen sind potenzielle Analoga des bekannten NADPH-Oxidase-Hemmers Apocynin. Isorhamnetin erwies sich als wirksamster Hemmer der NADPH-Oxidase-Aktivität unter den monomeren Flavonoiden. Es kommt im Sanddorn, aber auch als in 3'-Position methylierter Plasmametabolit des Quercetins vor. Erstaunlicherweise war die Wirkung des Isorhamnetins auf die NADPH-Oxidase 18-fach stärker als die des Apocynins. In der Literatur wurde bereits eine Hemmung der Xanthinoxidaseaktivität durch Isorhamnetin beschrieben (COS et al. 1998). Somit verhindert es die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch die Hemmung zweier wichtiger $O_2^{\cdot-}$ generierender Enzymsysteme, nämlich der NADPH-Oxidase und der Xanthinoxidase [6]. Mit Ausnahme des Isorhamnetins, dessen Wirkung auf $O_2^{\cdot-}$ -Radikale aufgrund der XO-Hemmung nicht ermittelt werden konnte, zeigten alle getesteten Methylether der Flavonoide ebenso wie das Apocynin im XO-System keine

Anti-O₂^{•-}-Wirkung. Somit erwies sich deren NADPH-Oxidasehemmung als hoch selektiv.

9.4 Struktur-Wirkungsbeziehungen von 46 Polyphenolen in Bezug auf die Hemmung der NADPH-Oxidase

Substanzen mit einer Catecholgruppe, wie z.B. das (-)-Epicatechin, (+)-Catechin, Quercetin, Fisetin und Luteolin erwiesen sich erwartungsgemäß als gute Radikalfänger. Die O-Methylierung des B-Rings oder Entfernen einer Hydroxylgruppe eines Catechols im Flavonoidmolekül führten zu einem Verlust der Radikalfängereigenschaft, jedoch erwiesen sich diese Substanzen als wirksame Hemmer der NADPH-Oxidase [6]. Einige dieser monomethylierten Flavonoide wurden als Plasmametabolite beim Menschen nachgewiesen u.a. (-)-Epicatechin-3'-O-Methylether, (-)-Epicatechin-4'-O-Methylether und Isorhamnetin, (MANACH & DONOVAN 2005).

Flavanole, bei denen die Alkoholgruppe in C-3 Position mit Gallussäure verestert ist, gehören zur Gruppe der „Teecatechine“ (TIPOE et al. 2007). Dabei stellt Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) die häufigste und in einer Reihe von Testsystemen biologisch wirksamste Substanz in der Gruppe der Catechine dar. Eigene Daten zeigten, dass die „Teecatechine“, insbesondere EGCG, auch wirksame NADPH-Oxidase-Hemmer sind [6]. Am Beispiel des Epigallocatechins zeigt sich, dass schon das Einführen einer zusätzlichen vicinalen OH-Gruppe in das (-)-Epicatechinmolekül die Eigenschaft der Hemmung der NADPH-Oxidase hervorruft.

Interessanterweise beeinflusst ebenso die Position einer zusätzlichen Carboxylgruppe am aromatischen Ring der Polyphenole die Wirksamkeit der Substanz (3-Methoxy-Salicylsäure im Vergleich zur Vanillinsäure). Außerdem ist eine Carbonylgruppe (Apocynin, Isorhamnetin und Diosmetin) oder eine Doppelbindung (Ferulasäure) im zusätzlichen Substituenten des monomethylierten Catecholorings die Voraussetzung für inhibitorische Eigenschaften (Homovanillinalkohol im Vergleich zum Hydroxytyrosol). Bemerkenswerterweise führt der Verlust einer der beiden Hydroxylgruppen im Catecholoring (Tyrosol sowie Kaempferol) zu einer gesteigerten Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität. Durch parallel durchgeführte Messungen der NADPH-Oxidase-Aktivität konnte gezeigt werden, dass einige Verbindungen zwei voneinander unabhängige Wirkungen in sich vereinen: Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität und Hemmung der Xanthinoxidase-Aktivität. Zu den Substanzen, die zwei Wirkungen in sich vereinen, gehört das (-)-Epicatechinglucuronid ebenso wie das (-)-Epicatechindimer Procyanidin B2. Diese Verbindungen hemmen die Aktivität der NADPH-Oxidase und

sind gleichzeitig in der Lage, $O_2^{\cdot-}$ -Radikale abzufangen. Die stärkste Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität wurde mit Isorhamnetin erzielt. Dies lässt darauf schließen, dass Flavonoide, insbesondere Isorhamnetin, besser fähig sind, die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung in Endothelzellen zu senken als Apocynin. Wie in 9.3. bereits erwähnt, erwiesen sich die im B-Ring O-methylierten Flavan-3-ole hingegen als selektive NADPH-Oxidase-Inhibitoren ohne die Fähigkeit zum Abfangen von $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen. Unter den apocynin-analogen monomethylierten Nicht-Flavonoiden waren ebenfalls einige wirksamere NADPH-Oxidase-Hemmer als das Apocynin, wie z.B. die Ferulasäure. Dagegen zeigten typische Superoxidanionenradikalfänger wie Vitamin C, Vitamin E oder Trolox keinerlei NADPH-Oxidase-hemmende Eigenschaften [6]. In Tabelle 15 sind einige grundsätzliche Aussagen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen zusammengestellt.

Tabelle 15 Struktur-Wirkungsbeziehungen der NADPH-Oxidasehemmung durch Polyphenole

Strukturmerkmal	Beispiele	NADPH-Oxidase-Hemmer	$O_2^{\cdot-}$ -Fänger
3-Methoxy-4-hydroxyphenyl	Apocynin, Ferulasäure, Vanillinsäure,	+	–
Flavonoide mit einer unsubstituierten Catecholgruppe am B-Ring	(–)-Epicatechin, (+)-Catechin, Quercetin, Luteolin	–	+
Mono-O- Methylierung der Catecholgruppe am B-Ring	Isorhamnetin, Diosmetin, 3'- and 4'-O-Methyl-Epicatechin	+	–
Flavonoide vom Nicht-Catecholtyp mit einer einzelnen 4'-OH Gruppe am B-Ring	Apigenin, Kaempferol	+	–
Hydrierung der C2–C3-Doppelbindung (im C-Ring)	Taxifolin, Dihydrokaempferol, Dihydrotamarixetin, Naringenin	+	–/+
Flavan-3-ole vom Gallus-Typ	Epicatechingallate, Epigallocatechin, Epigallocatechin gallate	+	+
Procyanidin-ähnliche Flavan-3-ole (Dimere)	Procyanidin B2, Myeloperoxidase-katalysiertes (–)-Epicatechindimer	+	+

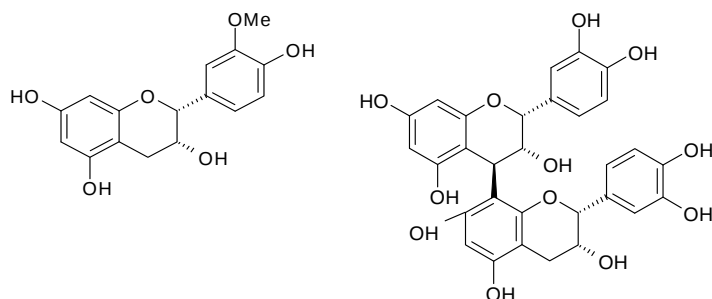
9.5 Wirken (–)-Epicatechinmetabolite in analoger Weise wie der NADPH-Oxidase-hemmer Apocynin ?

Jüngste Untersuchungen des Arbeitskreises von H. Sies in Düsseldorf stützen die Vermutung, dass die Hemmung der endothelialen NADPH-Oxidase ein wichtiger Angriffspunkt des (–)-Epicatechins ist, der über einen verminderten Spiegel an Superoxidanionenradikalen und somit verminderten Bildung von Peroxynitrit zur Erhöhung des NO-Spiegels in den Endothelzellen führt, wodurch das Gefäßendothel geschützt wird [3, 4]. (–)-Epicatechin wird dabei in den Gefäßendothelzellen durch die in ihnen enthaltene Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu 3'- und 4'-O-Methyl-Epicatechin

metabolisiert, die als die eigentlichen NADPH-Oxidase-Inhibitoren identifiziert wurden [4].

Wie eigene Untersuchungen ergaben, scheint nicht das NOX4-Protein selbst der Angriffspunkt der Flavonoide zu sein, sondern die Flavonoide blockieren eher die Assemblierung (Zusammenlagerung) des NADPH-Oxidase-Multi-proteinkomplexes. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für das Apocynin (4-Hydroxy-3-methoxy-acetophenon), einen bekannten Hemmer sowohl der leukozytären als auch der endothelialen NADPH-Oxidase, postuliert (JOHNSON et al., 2002). Danach unterdrückt Apocynin die Translokation des cytosolischen p47phox-Proteins an den Multiproteinkomplex der NADPH-Oxidase. Kürzlich wurde berichtet, dass der Feinmechanismus der Hemmung durch Apocynin eine MPO-katalysierte Oxidation zum Apocynin-Phenoxy-Radikal und schließlich zum Dimer (Abb. 10) einbezieht (XIMENES et al., 2007). Mit diesem System wurde in der vorliegenden Dissertation die Bildung von Dimeren des (–)-Epicatechins und des 3'-O-Methyl-Epicatechins (Abb. 10) nachgewiesen (unveröffentlichte Daten). Dies lässt die Existenz von Stoffwechselwegen für die Bildung procyanidinähnlicher Oxidationsprodukte der Flavan-3-ole auch in nicht-pflanzlichen Zellen vermuten. Wie schon erwähnt, sind bestimmte Monomethylether des Quercetins und des (–)-Epicatechins wirksamere NADPH-Oxidase-Inhibitoren als Apocynin (Abschnitt 10.4) [6]. Das gemeinsame Strukturmerkmal ist ein monomethyliertes Catechol. Die Autorin postuliert daher, dass (–)-Epicatechin nach dessen COMT-abhängiger Biotransformation über einen apocynin-analogen Mechanismus wirkt. In Analogie zur Studie von Ximenes et al. (2007) könnte die Reaktion der MPO mit (–)-Epicatechin und anderen Flavonoiden als Modell für die Biotransformation der Flavan-3-ole im Säugerorganismus dienen. Bei der Reaktion von (+)-Catechin mit Meerrettich-Peroxidase wurde von mehreren Autoren die Bildung von Dehydrodicatechin und anderen Catechin-Oligomeren neben wenig Catechin-Chinon-methid nachgewiesen (HAMADA et al., 1995; LÓPEZ-SERRANO & ROS BARCELÓ 2002; HOSNY & ROSAZZA 2002). Die Oligomeren sind anders als beim Quercetin, über C–C-Bindungen zwischen den Ringen der Monomeren verknüpft und entsprechen damit dem Strukturprinzip, der unter anderem im Rotwein, Kakao und Äpfeln vorkommenden Procyanidine. Es ist naheliegend, dass auch bei der Reaktion der MPO mit Flavan-3-olen Verbindungen mit Procyanidin-Struktur gebildet werden. Dies könnte vorteilhafte Konsequenzen haben, da Procyanidine weitaus wirksamere Inhibitoren bestimmter Funktionen der Leukozyten sind als das entsprechende Monomer (CARINI et al., 2001)

und darüber hinaus intakte Aorten stärker dilatieren als das Monomer (ALDINI et al., 2003). Niedrige Konzentrationen an den Procyanidinen B2 (Abb. 10) und B5 wurden nach Gabe flavan-3-ol-reichen Kakaos beschrieben, wobei nicht geklärt wurde, ob dies auf eine direkte Resorption oder auf systemische Oxidation von (–)-Epicatechin (Abb. 10) zurückzuführen war, das im Gegensatz zu den Procyanidinen der Nahrung gut resorbiert wird und von allen Flavan-3-olen die höchsten Plasmakonzentrationen seiner Metabolite liefert (MANACH & DONOVAN, 2004).

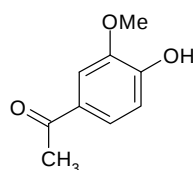


3'-O-Methyl-Epicatechin
IC₅₀ = 7.9 ± 2.6 μM

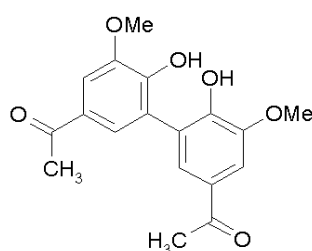
Procyanidin B2
IC₅₀ = 3.8 ± 0.8 μM

Abb. 10

Strukturformeln von
Polyphenolen, die die NADPH-
Oxidase hemmen



Apocynin
IC₅₀ = 50 μM



Apocynin Dimer
IC₅₀ = 10.3 ± 2.5 μM

Methylether der Flavonoide hemmen die endotheliale NADPH-Oxidase vermutlich über einen apocynin-analogen Mechanismus. Die im B-Ring mono-O-methylierten Flavan-3-ole wurden im Gegensatz zu ihren Aglykonen als selektive NADPH-Oxidase-Inhibitoren ohne die Fähigkeit zum Abfangen von O₂^{•-}-Radikalen identifiziert (IC₅₀-Werte der NADPH-Oxidasehemmung; gemessen durch NADPH-Oxidation in HUVEC-Zelllysaten bei 340 nm).

Als bisher einzige Peroxidase des Säugerorganismus wurde die Myeloperoxidase hinsichtlich der Reaktion mit Apocynin, (–)-Epicatechin und 3'-O-Methyl-Epicatechin untersucht [6]. Dabei wurden Oxidationsprodukte beobachtet, die ein breites Absorptionsmaximum bei 340 nm, 435 nm und 320 bzw. 475 nm aufwiesen. Diese wurden strukturell nicht identifiziert, erwiesen sich aber in eigenen Untersuchungen als wirksamere NADPH-Oxidase-Hemmer als ihre Monomere. Die Annahme eines solchen Mechanismus stößt auf die Schwierigkeit, dass Endothelzellen keine MPO enthalten. Diese Funktion könnte die Cyclooxygenase-2 (COX-2) übernehmen (SCHILDKNECHT et al. 2006)

9.6 Die endotheliale NADPH-Oxidaseaktivität spielt eine zentrale Rolle bei der Modulation des NO-Stoffwechsels

Superoxidanionen spielen eine regulatorische Rolle bei der Angiogenese von Endothelzellen (CAI et al., 2005, USHIO-FUKAI 2006). Die Wirkung von $O_2^{\cdot-}$ als Signalmolekül erfordert sensitive Kontrollmechanismen, damit nicht bei übermäßiger NADPH-Oxidaseaktivität die Rolle dieses Enzymsystems zu proinflammatorischen und cytotoxischen Wirkungen umschlägt. Ernährungsrelevante Polyphenole und ihre Metaboliten könnten durch Absenken der $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration und durch Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität eine wichtige Regulatorfunktion im Endothel ausüben. Dies würde eine Stabilisierung des stationären Spiegels von NO in Zellen nach sich ziehen [4]. Andererseits führt $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch die diffusionskontrollierte Bildung von Peroxynitrit zu einer Abnahme von NO (Abschnitt 2.6). Somit scheint das NO/ $O_2^{\cdot-}$ -Verhältnis eine Regulatorfunktion im Endothel auszuüben, d.h. eine Gleichgewichtsverschiebung in Richtung des $O_2^{\cdot-}$ könnte letztendlich zu einer endothelialen Dysfunktion führen.

10 Einordnung der Befunde dieser Dissertation in die gegenwärtige Flavonoidforschung

10.1 (–)-Epicatechin als „Prodrug“ von NADPH-Oxidasehemmern

In dieser Dissertation wird gezeigt, dass eine Behandlung mit (–)-Epicatechin Endothelzellen vor oxidativem Stress und seinen schädlichen Wirkungen schützt. Es scheint, dass das (–)-Epicatechin selbst, wenn überhaupt, nur in untergeordnetem Maße zum direkten Schutz vor $O_2^{\cdot-}$ sowie Peroxynitrit (ARTEEL et al. 1999) beiträgt, indem es gebildete Superoxidradikale abzufangen vermag. Als weitaus wichtigere Rolle erwies sich die Wirkung als Vorstufe („Prodrug“) für hochwirksame NADPH-Oxidasehemmer. Diese Beobachtungen stehen auch im Einklang mit den *in vivo* beobachteten Wirkungen des (–)-Epicatechins. Nach Gabe eines (–)-epicatechin-reichen Schokotrunk wurde ein Anstieg des Nitrit-Spiegels im Plasma der Probanden beobachtet (HEISS et al., 2007). Dieser wurde von verschiedenen Autoren (HEISS et al., 2007; SCHROETER et al., 2007) als Ausdruck erhöhter eNOS-Aktivität interpretiert, ohne dass dafür experimentelle Beweise erbracht wurden. Auf dieser Basis stellt sich die Frage, ob und wenn ja, wie (–)-Epicatechin die eNOS-Aktivität steigern könnte. Eine Erhöhung der Expression der NO-Synthase konnte weder für (–)-Epicatechin noch für (–)-Epicatechinmetabolite festgestellt werden (Abschnitt 8) [1, 5]. Auch konnte keine Steigerung der Aktivität der NO-Synthase in eigenen Experimenten gefunden werden; dies spricht ebenfalls gegen einen durch (–)-Epicatechin vermittelten Anstieg der Menge an aktivem Enzymprotein

aus [5]. Diese Umstände lassen vermuten, dass der Mechanismus des erhöhten NO-Spiegels sowohl im Plasma als auch in Zellen auf einer anderen Ebene zu suchen ist, nämlich in der Unterdrückung der $O_2^{\cdot-}$ -Bildung durch die NADPH-Oxidase. Die Umwandlung des (–)-Epicatechins zum eigentlichen Schutzstoff erfolgt durch die Endothelzellen selbst und zwar durch das Enzym COMT (Abbildung 11) [4].

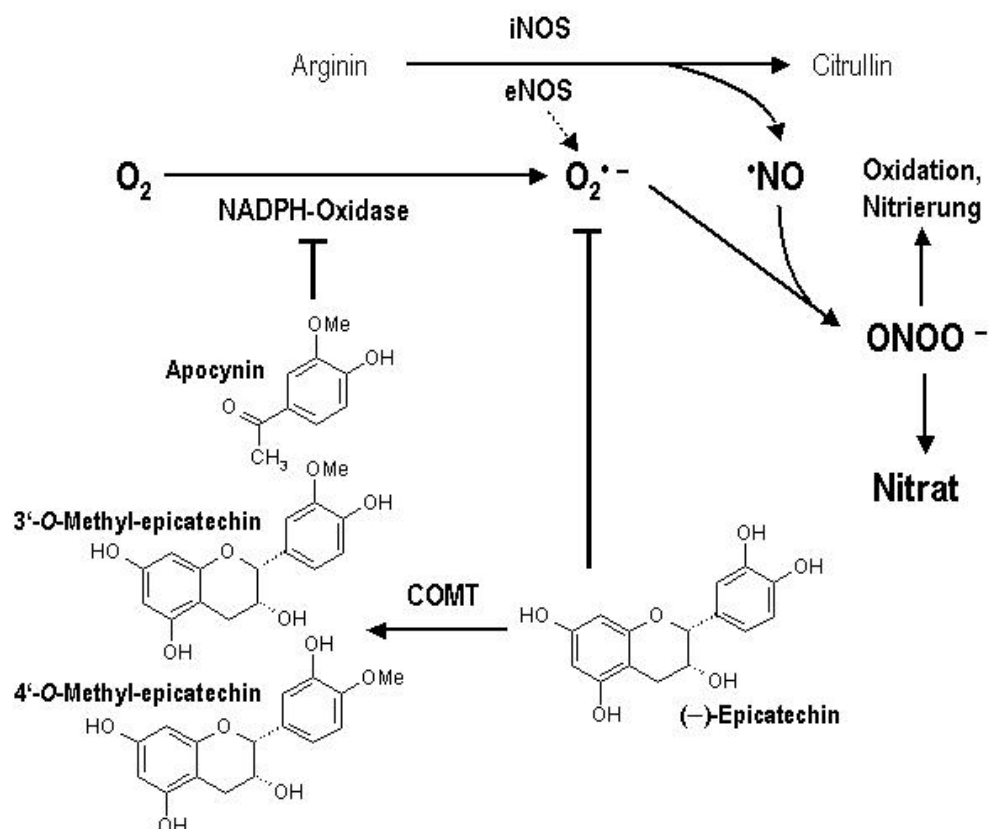


Abb. 11 Mögliche Angriffspunkte im NO-Stoffwechsel von Endothelzellen.

(–)-Epicatechin wird von der COMT in Endothelzellen verstoffwechselt und wirkt dadurch als „Prodrug“ für deren Methylether als eigentliche Wirkstoffe. Eine Mono-O-Methylierung der Catecholgruppe verstärkt die Wirksamkeit vieler Verbindungen auf die NADPH-Oxidase-Aktivität, geht aber einher mit dem Verlust der Radikalfängereigenschaft.

Neben diesen Reaktionen kommen auch oxidative Umwandlungen des (–)-Epicatechins in Betracht. Eigene Daten und vorhergehende Untersuchungen ergaben, dass Myeloperoxidase (MPO) in Gegenwart von H_2O_2 , eine Oxidation von (–)-Epicatechin bewirkt (Abschnitt 9.5, KOSTYUK et al., 2003). Das Oxidationsprodukt ist im Gegensatz zum (–)-Epicatechin hochwirksame NADPH-Oxidase-Hemmer [6]. In Endothelzellen ist zwar keine MPO vorhanden, jedoch wird dieses Enzym in atherosklerotisch geschädigten Gefäßarealen infolge inflammatorischer Leukozytenrekrutierung in enzymatisch aktiver Form angereichert (DAUGHTERY et al., 1994). In der vorliegenden Dissertation wurden bei verschiedenen Gefäßendothelzelllinien Schutzwirkungen gegenüber der cytotoxischen Wirkung von oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL) nachgewiesen, die

eine mehrstündige Vorinkubation der Zellen mit (–)-Epicatechin erforderten [1,3,5,6]. Möglicherweise greifen diese Metaboliten auch an anderer Stelle in den NO-Synthase-Stoffwechsel ein. So könnte eine verstärkte NO-Freisetzung auch durch einen verringerten Abbau des eNOS-Proteins durch das Proteasomensystem bedingt sein (Abschnitt 6.1) [3].

10.2 Glucuronide scheinen eher dem Transport des (–)-Epicatechins und seiner Metabolite zu dienen als der Harnausscheidung

In dieser Dissertation wird gezeigt, dass das Aglykon des (–)-Epicatechins im Gegensatz zu (–)-Epicatechinglucuroniden nicht vor oxidativem Stress in Endothelzellen schützt, wenn dem Zellmedium 1% Serumalbumin zugesetzt wird. Diese Konzentration entspricht etwa der physiologischen Konzentration an Albumin im Humanplasma. Eigene Beobachtungen und die anderer Autoren zeigen, dass das Albumin das freie (–)-Epicatechin im Medium bindet und so eine Akkumulation des (–)-Epicatechins in den Zellen verhindert. Wahrscheinlich besitzen (–)-Epicatechinglucuronide eine niedrigere Bindungsaffinität zu Albumin als das Aglykon. Somit könnte (–)-Epicatechin *in situ* am oder im Zielgewebe aus systemisch vorliegenden Glucuroniden freigesetzt werden. Die so freigesetzten Aglykone können dann in den Endothelzellen gespeichert und von der COMT verstoffwechselt werden (Abschnitt 8.1). Die Glucuronide würden nicht, wie ursprünglich angenommen, renale Ausscheidungsprodukte, sondern Transportmetabolite im Blut des Säugerorganismus sein (MORILLAS et al., 2007). Polyphenole bzw. ihre Metaboliten zirkulieren nämlich nicht in freier Form im Blutkreislauf, sondern gehen zum größten Teil eine Bindung mit Plasmaproteinen ein. Am Beispiel von Quercetin ist diese Interaktion mit diesen Transportproteinen eingehend untersucht worden (BOULTON et al., 1998, SENGUPTA & SENGUPTA 2002; ZSILA et al., 2003). Dabei stellte sich heraus, dass das Quercetinaglykon *in vitro* fast ausschließlich (~99 %) an menschliches Serumalbumin gebunden wird, eine Kopplung an andere Proteine und LDL dagegen eine untergeordnete Rolle spielt. Von größerer Bedeutung ist jedoch die Untersuchung des Bindungsverhaltens der konjugierten Metabolite, die nach Aufnahme polyphenolhaltiger Nahrung in der Blutbahn zirkulieren. Ihre Affinität zum Albumin bestimmt letztendlich, in welchem Maße sie als biologisch aktive Verbindungen von peripheren Geweben aufgenommen, verteilt und weiter verstoffwechselt werden. Nach Untersuchungen von Dufour & Dangles (2005) zur Bindungsaffinität von Quercetinkonjugaten ist davon auszugehen, dass auch diese im Kreislauf zum größten Teil als Komplex mit Albumin zirkulieren, obwohl ihre Affinität zu dem Plasmaprotein verglichen mit dem Aglykon, weitaus schwächer ist. Literaturdaten zeigen, dass die Bindungsaffinität von (–)-Epi-

catechin und (+)-Catechin zu Rinderserumalbumin geringer ist als die von Quercetin (PAPADOPOULOU et al., 2005). Dies könnte eine im Vergleich zu den Flavonolen bessere Bioverfügbarkeit der Flavan-3-ole nachsichziehen.

Schlussbemerkung:

Die systematische Erforschung des Flavonoid-Stoffwechsels begann etwa in den Fünziger Jahren (CLARK et al., 1950). Erste Untersuchungen beschäftigten sich hauptsächlich mit der Frage, ob Flavonoide intakt im Urin oder in der Faeces ausgeschieden werden (CLARK et al., 1950). Danach verlagerte sich der Schwerpunkt der Forschung auf die Identifizierung und den Nachweis der Flavonoid-Abbauprodukte in den Ausscheidungsprodukten des Körpers (SCHELINE 1991). Später kamen zunehmend quantitative Betrachtungen hinzu. So wurde erforscht, in welchem Ausmaß Flavonoide resorbiert werden, welche Blutspiegelwerte erreicht werden können und welche Substanzen renal oder biliär ausgeschieden werden. Die Daten dieser Dissertation könnten zu einer neuen Herangehensweise hinsichtlich der Flavonoidforschung führen, da in dieser Dissertation einige neue Gesichtspunkte beleuchtet werden, die in Tabelle 16 aufgeführt sind.

Tabelle 16 Gegenüberstellung von alten und neuen Aspekten der Flavonoidforschung

	Alte Vorstellung	Neue Erkenntnis
Flavonoide als Radikalfänger	entscheidende Wirkung	untergeordnet, sofern überhaupt <i>in vivo</i> relevant
Flavonoide sind Antioxidanzien	uneingeschränkt ja	Ja, aber nur im erweiterten Sinne (Hemmung prooxidativer Enzyme: NADPH-Oxidasen, Lipoxxygenasen, Myeloperoxidase)
Flavonoide sind Enzymhemmer	viele Enzyme	Wenige Schlüsselenzyme, insbesondere NADPH-Oxidasen
Angriffspunkt im Stoffwechsel	Lipidperoxidation	NO-Stoffwechsel
Angriffspunkt im NO-Stoffwechsel	eNOS ↑	NO-Abbau ↓

Die Autorin hofft, dass mit diesen Aspekten zusätzliche Impulse für die internationale Flavonoidforschung gegeben werden.

11 Literaturverzeichnis

- Agullo,G., Gamet-Payraastre,L., Manenti,S., Viala,C., Remesy,C., Chap,H., and Payraastre,B. 1997. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmacol.* 53: 1649-1657.
- Aherne,S.A. and O'Brien,N.M. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18: 75-81.
- Aldini,G., Carini,M., Piccoli,A., Rossoni,G., and Facino,R.M. 2003. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci.* 73: 2883-2898.
- Alspach,G. 2007. The truth is often bittersweet...: chocolate does a heart good. *Crit Care Nurse* 27: 11-15.
- Andrew,P.J. and Mayer,B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43: 521-531.
- Arteel,G.E. and Sies,H. 1999. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Lett.* 462: 167-170.
- Arts,I.C., Hollman,P.C., and Kromhout,D. 1999. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 354: 488.
- Arts,I.C., van De,P.B., and Hollman,P.C. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric. Food Chem.* 48: 1752-1757.
- Arts,I.C. and Hollman,P.C. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81: 317S-325S.
- Aupeix,K., Weltin,D., Mejia,J.E., Christ,M., Marchal,J., Freyssinet,J.M., and Bischoff,P. 1995. Oxysterol-induced apoptosis in human monocytic cell lines
1. *Immunobiology* 194: 415-428.
- Baba,S., Osakabe,N., Natsume,M., and Terao,J. 2002. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in rats. *Free Radic. Biol Med* 33: 142-148.
- Batz,M., Korth,H.G., Meineke,P., and Sustmann,R. 1999. Fluorescence detection of nitric oxide based on cheletropic spin traps. *Methods Enzymol.* 301: 532-539.
- Beckman,J.S., Beckman,T.W., Chen,J., Marshall,P.A., and Freeman,B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 1620-1624.

- Bertsch A 1996. Stimulation endothelialer Stickstoffmonoxid (NO)- Bildung durch Calciumantagonisten im Vergleich zu Bradykinin. Dissertation, Universität zu Köln
- Berry,C., Brosnan,M.J., Fennell,J., Hamilton,C.A., and Dominiczak,A.F. 2001. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10: 247-255.
- Bitsch R. 2006. Polyphenole in der Ernährung des Menschen *Ernährung & Medizin* 21: 173-177
- Bors,W., Michel,C., and Schikora,S. 1995. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol Med* 19: 45-52.
- Bors,W., Michel,C., and Stettmaier,K. 1997. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* 6: 399-402.
- Bors,W. and Michel,C. 2002. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 957: 57-69.
- Boulton,D.W., Walle,U.K., and Walle,T. 1998. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 243-249.
- Bredt,D.S. and Snyder,S.H. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 682-685.
- Brennan,M.L. and Hazen,S.L. 2003. Amino acid and protein oxidation in cardiovascular disease. *Amino. Acids* 25: 365-374.
- Brown,A.J., Leong,S.L., Dean,R.T., and Jessup,W. 1997. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res.* 38: 1730-1745.
- Brown,M.S. and Goldstein,J.L. 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 3330-3337.
- Brossette,T. 2007 MOLECULAR LIFE SCIENCES 2007 Herbsttagung der GBM September 16 – 19
- Burner,U., Krapfenbauer,G., Furtmuller,P.G., Regelsberger,G., and Obinger,C. 2000. Oxidation of hydroquinone, 2,3-dimethylhydroquinone and 2,3,5-trimethylhydroquinone by human myeloperoxidase. *Redox. Rep.* 5: 185-190.
- Burner,U., Furtmuller,P.G., Kettle,A.J., Koppenol,W.H., and Obinger,C. 2000. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J Biol Chem.* 275: 20597-20601.
- Cabrera,C., Artacho,R., and Gimenez,R. 2006. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am. Coll. Nutr.* 25: 79-99.
- Cai,H., Griendling,K.K., and Harrison,D.G. 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 471-478.
- Carini,M., Stefani,R., Aldini,G., Ozioli,M., and Facino,R.M. 2001. Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds inhibit the respiratory burst of activated human neutrophils and lysosomal enzyme release. *Planta Med* 67: 714-717.

Carr,A.C. and Frei,B. 2001. The nitric oxide congener nitrite inhibits myeloperoxidase/H₂O₂/Cl⁻-mediated modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 276: 1822-1828.

Chang,Y.H., Abdalla,D.S., and Sevanian,A. 1997. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein
16. *Free Radic. Biol. Med.* 23: 202-214.

Chen,D., Wang,C.Y., Lambert,J.D., Ai,N., Welsh,W.J., and Yang,C.S. 2005. Inhibition of human liver catechol-O-methyltransferase by tea catechins and their metabolites: structure-activity relationship and molecular-modeling studies. *Biochem. Pharmacol* 69: 1523-1531.

Chen,D., Wang,C.Y., Lambert,J.D., Ai,N., Welsh,W.J., and Yang,C.S. 2005. Inhibition of human liver catechol-O-methyltransferase by tea catechins and their metabolites: structure-activity relationship and molecular-modeling studies. *Biochem. Pharmacol* 69: 1523-1531.

Chen,H.I., Chang,H.R., Wu,C.Y., Kao,S.J., Wang,D., Hsieh,N.K., and Hsu,Y.H. 2007. Nitric oxide in the cardiovascular and pulmonary circulation--a brief review of literatures and historical landmarks. *Chin J Physiol* 50: 43-50.

Chisolm,G.M., Ma,G., Irwin,K.C., Martin,L.L., Gunderson,K.G., Linberg,L.F., Morel,D.W., and DiCorleto,P.E. 1994. 7 beta-hydroperoxycholest-5-en-3 beta-ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91: 11452-11456.

CLARK,W.G. and MacKAY,E.M. 1950. The absorption and excretion of rutin and related flavonoid substances. *J Am. Med. Assoc.* 143: 1411-1415.

Cos,P., Ying,L., Calomme,M., Hu,J.P., Cimanga,K., Van Poel,B., Pieters,L., Vlietinck,A.J., and Vanden Berghe,D. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61: 71-76.

Cromheeke,K.M., Kockx,M.M., De Meyer,G.R., Bosmans,J.M., Bult,H., Beelaerts,W.J., Vrints,C.J., and Herman,A.G. 1999. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc. Res.* 43: 744-754.

Crozier,A., Burns,J., Aziz,A.A., Stewart,A.J., Rabiasz,H.S., Jenkins,G.I., Edwards,C.A., and Lean,M.E. 2000. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol Res* 33: 79-88.

Da Silva,P.M., Lajolo,F.M., and Genovese,M.I. 2007. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Strawberry Jams. *Plant Foods Hum. Nutr.*

Daugherty,A., Dunn,J.L., Rateri,D.L., and Heinecke,J.W. 1994. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest* 94: 437-444.

Day,A.J., Gee,J.M., DuPont,M.S., Johnson,I.T., and Williamson,G. 2003. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.* 65: 1199-1206.

Depre,C., Havaux,X., Renkin,J., Vanoverschelde,J.L., and Wijns,W. 1999. Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc. Res.* 41: 465-472.

- Ding, E.L., Hutfless, S.M., Ding, X., and Girotra, S. 2006. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab (Lond)* 3: 2.
- Divald, A. and Powell, S.R. 2006. Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 156-164.
- Donovan, J.L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., and Remesy, C. 2001. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J Nutr* 131: 1753-1757.
- Dufour, C. and Dangles, O. 2005. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1721: 164-173.
- Engler, M.B., Engler, M.M., Chen, C.Y., Malloy, M.J., Browne, A., Chiu, E.Y., Kwak, H.K., Milbury, P., Paul, S.M., Blumberg, J., and Mietus-Snyder, M.L. 2004. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults
1. *J. Am. Coll. Nutr.* 23: 197-204.
- Engler, M.B. and Engler, M.M. 2006. The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutr Rev.* 64: 109-118.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., and Rotheneder, M. 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* 6: 67-75.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jurgens, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 341-390.
- Feng, W.S., Zheng, X.K., Liu, Y.B., and Kuang, H.X. 2007. Three new C-flavonoids from *Corallodiscus flabellata*. *J Asian Nat. Prod. Res* 9: 85-89.
- Feng, W.Y. 2006. Metabolism of green tea catechins: an overview. *Curr. Drug Metab* 7: 755-809.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., and Comporti, M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* 416: 123-129.
- Fisher, N.D., Hughes, M., Gerhard-Herman, M., and Hollenberg, N.K. 2003. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans
1. *J. Hypertens.* 21: 2281-2286.
- Forstermann, U., Boissel, J.P., and Kleinert, H. 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12: 773-790.
- Friedman, P., Horkko, S., Steinberg, D., Witztum, J.L., and Dennis, E.A. 2002. Correlation of antiphospholipid antibody recognition with the structure of synthetic oxidized phospholipids. Importance of Schiff base formation and aldol condensation. *J Biol. Chem.* 277: 7010-7020.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.

- Furchgott,R.F. 1999. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci. Rep.* 19: 235-251.
- Furtmuller,P.G., Obinger,C., Hsuanyu,Y., and Dunford,H.B. 2000. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. *Eur. J Biochem.* 267: 5858-5864.
- Furtmuller,P.G., Burner,U., Jantschko,W., Regelsberger,G., and Obinger,C. 2000. The reactivity of myeloperoxidase compound I formed with hypochlorous acid. *Redox. Rep.* 5: 173-178.
- Furtmuller,P.G., Burner,U., Jantschko,W., Regelsberger,G., and Obinger,C. 2000. Two-electron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase. *FEBS Lett.* 484: 139-143.
- Galle,J., Lehmann-Bodem,C., Hubner,U., Heinloth,A., and Wanner,C. 2000. CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O(2)(-) formation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 339-346.
- Galle,J., Hansen-Hagge,T., Wanner,C., and Seibold,S. 2006. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 185: 219-226.
- Garcia-Cardena,G., Martasek,P., Masters,B.S., Skidd,P.M., Couet,J., Li,S., Lisanti,M.P., and Sessa,W.C. 1997. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* 272: 25437-25440.
- Garcia-Cruset,S., Carpenter,K.L., Guardiola,F., and Mitchinson,M.J. 1999. Oxysterols in cap and core of human advanced atherosclerotic lesions. *Free Radic. Res.* 30: 341-350.
- Garcia-Cruset,S., Carpenter,K.L., Guardiola,F., Stein,B.K., and Mitchinson,M.J. 2001. Oxysterol profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lesions. *Free Radic. Res.* 35: 31-41.
- Gardner. 1987. Reactions of hydroperoxides – products of high molecular weight. In: *Autoxidation of unsaturated lipids.* Chan, H.W.-S. (Ed.). Academic Press, London. 51-93.
- Geleijnse,J.M., Launer,L.J., Hofman,A., Pols,H.A., and Witteman,J.C. 1999. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arch. Intern. Med* 159: 2170-2174.
- Geleijnse,J.M., Witteman,J.C., Launer,L.J., Lamberts,S.W., and Pols,H.A. 2000. Tea and coronary heart disease: protection through estrogen-like activity? *Arch. Intern. Med* 160: 3328-3329.
- Geleijnse,J.M., Launer,L.J., Van der Kuip,D.A., Hofman,A., and Witteman,J.C. 2002. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 75: 880-886.
- Govers,R. and Rabelink,T.J. 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F193-F206.
- Grosser,N. and Schroder,H. 2000. A common pathway for nitric oxide release from NO-aspirin and glyceryl trinitrate. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 274: 255-258.

Grosser,N. and Schroder,H. 2003. Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide-cGMP pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1345-1351.

Grune,T., Blasig,I.E., Sitte,N., Roloff,B., Haseloff,R., and Davies,K.J. 1998. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 273: 10857-10862.

Grune,T., Merker,K., Jung,T., Sitte,N., and Davies,K.J. 2005. Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 1208-1215.

Gutteridge,J.M. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41: 1819-1828.

Halle,W. and Hecker,D. 1981. [Histochemical demonstration of beta-glucuronidase and leucine aminopeptidase in cultivated aortic endothelial cells (author's transl)]. *Acta Histochem.* 68: 188-192.

Hamada,S., Kontani,M., Hosono,H., Ono,H., Tanaka,T., Ooshima,T., Mitsunaga,T., and Abe,I. 1996. Peroxidase-catalyzed generation of catechin oligomers that inhibit glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 143: 35-40.

Hammerstone,J.F., Lazarus,S.A., and Schmitz,H.H. 2000. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* 130: 2086S-2092S.

Hansson,G.K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685-1695.

Hansson,M., Olsson,I., and Nauseef,W.M. 2006. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 445: 214-224.

Hayden,J.M., Brachova,L., Higgins,K., Obermiller,L., Sevanian,A., Khandrika,S., and Reaven,P.D. 2002. Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol
1. *J. Lipid Res.* 43: 26-35.

Hazen,S.L., Zhang,R., Shen,Z., Wu,W., Podrez,E.A., MacPherson,J.C., Schmitt,D., Mitra,S.N., Mukhopadhyay,C., Chen,Y., Cohen,P.A., Hoff,H.F., and Abu-Soud,H.M. 1999. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo. *Circ Res* 85: 950-958.

Heijnen,H.F., van Donselaar,E., Slot,J.W., Fries,D.M., Blachard-Fillion,B., Hodara,R., Lightfoot,R., Polydoro,M., Spielberg,D., Thomson,L., Regan,E.A., Crapo,J., and Ischiropoulos,H. 2006. Subcellular localization of tyrosine-nitrated proteins is dictated by reactive oxygen species generating enzymes and by proximity to nitric oxide synthase. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1903-1913.

Heinecke,J.W. 1987. Free radical modification of low-density lipoprotein: mechanisms and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 3: 65-73.

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

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

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

Heiss,C., Schroeter,H., Balzer,J., Kleinbongard,P., Matern,S., Sies,H., and Kelm,M. 2006. Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols. J Cardiovasc. Pharmacol. 47 Suppl 2: S128-S135.

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

Heller,R., Munscher-Paulig,F., Grabner,R., and Till,U. 1999. L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. J Biol Chem. 274: 8254-8260.

Hertog,M.G., Hollman,P.C., Katan,M.B., and Kromhout,D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutr Cancer 20: 21-29.

Hertog,M.G., Feskens,E.J., Hollman,P.C., Katan,M.B., and Kromhout,D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet 342: 1007-1011.

Hertog,M.G., Feskens,E.J., Hollman,P.C., Katan,M.B., and Kromhout,D. 1994. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. Nutr Cancer 22: 175-184.

Hertog,M.G. 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. Proc. Nutr Soc. 55: 385-397.

Hertog,M.G. and Hollman,P.C. 1996. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. Eur. J Clin Nutr 50: 63-71.

Hertog,M.G., Feskens,E.J., and Kromhout,D. 1997. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. Lancet 349: 699.

Hinson,J.A., Michael,S.L., Ault,S.G., and Pumford,N.R. 2000. Western blot analysis for nitrotyrosine protein adducts in livers of saline-treated and acetaminophen-treated mice. Toxicol. Sci. 53: 467-473.

Hollman,P.C., de Vries,J.H., van Leeuwen,S.D., Mengelers,M.J., and Katan,M.B. 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am J Clin Nutr 62: 1276-1282.

Hollman,P.C., Hertog,M.G., and Katan,M.B. 1996. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. Biochem. Soc. Trans. 24: 785-789.

Holt,R.R., Lazarus,S.A., Sullards,M.C., Zhu,Q.Y., Schramm,D.D., Hammerstone,J.F., Fraga,C.G., Schmitz,H.H., and Keen,C.L. 2002. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. Am J Clin Nutr 76: 798-804.

- Holvoet,P., Harris,T.B., Tracy,R.P., Verhamme,P., Newman,A.B., Rubin,S.M., Simonsick,E.M., Colbert,L.H., and Kritchevsky,S.B. 2003. Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging, and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1444-1448.
- Hosny,M. and Rosazza,J.P. 2002. Novel oxidations of (+)-catechin by horseradish peroxidase and laccase. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5539-5545.
- Ignarro,L.J., Buga,G.M., Wood,K.S., Byrns,R.E., and Chaudhuri,G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84: 9265-9269.
- Ischiropoulos,H. 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 356: 1-11.
- Ishii,K., Adachi,J., Tomita,M., Kurosaka,M., and Ueno,Y. 2002. Oxysterols as indices of oxidative stress in man after paraquat ingestion. *Free Radic. Res.* 36: 163-168.
- Iuliano,L., Micheletta,F., Maranghi,M., Frati,G., Diczfalusy,U., and Violi,F. 2001. Bioavailability of vitamin E as function of food intake in healthy subjects: effects on plasma peroxide-scavenging activity and cholesterol-oxidation products. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: E34-E37.
- Iuliano,L., Micheletta,F., Natoli,S., Ginanni,C.S., Iappelli,M., Elisei,W., Giovannelli,L., Violi,F., and Diczfalusy,U. 2003. Measurement of oxysterols and alpha-tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status. *Anal. Biochem.* 312: 217-223.
- Johnson,D.K., Schillinger,K.J., Kwait,D.M., Hughes,C.V., McNamara,E.J., Ishmael,F., O'Donnell,R.W., Chang,M.M., Hogg,M.G., Dordick,J.S., Santhanam,L., Ziegler,L.M., and Holland,J.A. 2002. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium* 9: 191-203.
- Jung,T., Engels,M., Kaiser,B., Poppek,D., and Grune,T. 2006. Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1303-1312.
- Kalinowski,L. and Malinski,T. 2004. Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. *Acta Biochim. Pol.* 51: 459-469.
- Kandaswami,C. and Middleton E Jr 1994. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med Biol* 366: 351-376.
- Keli,S.O., Hertog,M.G., Feskens,E.J., and Kromhout,D. 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch. Intern. Med* 156: 637-642.
- Kelm,M. 2002. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1-H5.
- Kelm,M.A., Johnson,J.C., Robbins,R.J., Hammerstone,J.F., and Schmitz,H.H. 2006. High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *J Agric. Food Chem.* 54: 1571-1576.

- Khokhar,S., Venema,D., Hollman,P.C., Dekker,M., and Jongen,W. 1997. A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Lett.* 114: 171-172.
- Knekt,P., Jarvinen,R., Reunanen,A., and Maatela,J. 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 312: 478-481.
- Knekt,P., Jarvinen,R., Reunanen,A., and Maatela,J. 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 312: 478-481.
- Knekt,P., Jarvinen,R., Seppanen,R., Hellovaara,M., Teppo,L., Pukkala,E., and Aromaa,A. 1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol.* 146: 223-230.
- Kojima,H., Nakatsubo,N., Kikuchi,K., Kawahara,S., Kirino,Y., Nagoshi,H., Hirata,Y., and Nagano,T. 1998. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 70: 2446-2453.
- Kojima,H., Urano,Y., Kikuchi,K., Higuchi,T., Hirata,Y., and Nagano,T. 1999. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 38: 3209-3212.
- Koppenol,W.H. and Butler,J. 1977. Mechanism of reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *FEBS Lett.* 83: 1-6.
- Koppenol,W.H., Moreno,J.J., Pryor,W.A., Ischiropoulos,H., and Beckman,J.S. 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res Toxicol.* 5: 834-842.
- Kostyuk,V.A., Kraemer,T., Sies,H., and Schewe,T. 2003. Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids
2. *FEBS Lett.* 537: 146-150.
- Kotamraju,S., Matalon,S., Matsunaga,T., Shang,T., Hickman-Davis,J.M., and Kalyanaraman,B. 2006. Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic. Biol Med* 40: 1034-1044.
- Kraemer,T., Prakosay,I., Date,R.A., Sies,H., and Schewe,T. 2004. Oxidative modification of low-density lipoprotein: lipid peroxidation by myeloperoxidase in the presence of nitrite
1. *Biol. Chem.* 385: 809-818.
- Kromhout,D. 1999. Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids* 34 Suppl: S27-S31.
- Kroncke,K.D., Klotz,L.O., Suschek,C.V., and Sies,H. 2002. Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. Unique role for NO. *J. Biol. Chem.* 277: 13294-13301.
- Kurowska,E.M. 2002. Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr. Pharm. Des* 8: 155-166.
- LaRosa,J.C. 2007. Low-density lipoprotein cholesterol reduction: the end is more important than the means. *Am. J Cardiol.* 100: 240-242.

Larsson,H., Bottiger,Y., Iuliano,L., and Diczfalusy,U. 2007. In vivo interconversion of 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 43: 695-701.

Lazarus,S.A., Adamson,G.E., Hammerstone,J.F., and Schmitz,H.H. 1999. High-performance liquid Chromatography/Mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J Agric. Food Chem.* 47: 3693-3701.

Lemaire,S., Lizard,G., Monier,S., Miguët,C., Gueldry,S., Volot,F., Gambert,P., and Neel,D. 1998. Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett.* 440: 434-439.

Leonarduzzi,G., Gamba,P., Sottero,B., Kadl,A., Robbesyn,F., Calogero,R.A., Biasi,F., Chiarpotto,E., Leitinger,N., Sevanian,A., and Poli,G. 2005. Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells
5. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 1152-1161.

Leonarduzzi,G., Poli,G., Sottero,B., and Biasi,F. 2007. Activation of the mitochondrial pathway of apoptosis by oxysterols. *Front Biosci.* 12: 791-799.

Liao,J.K., Shin,W.S., Lee,W.Y., and Clark,S.L. 1995. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol. Chem.* 270: 319-324.

Liew,F.Y. 1994. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 43: 95-98.

Lin,J., Rexrode,K.M., Hu,F., Albert,C.M., Chae,C.U., Rimm,E.B., Stampfer,M.J., and Manson,J.E. 2007. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am J Epidemiol.* 165: 1305-1313.

Lizard,G., Lemaire,S., Monier,S., Gueldry,S., Neel,D., and Gambert,P. 1997. Induction of apoptosis and of interleukin-1beta secretion by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett.* 419: 276-280.

Lopez-Serrano,M. and Barcelo,A.R. 2002. Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxidation. Their possible implications in strawberry (*Fragaria x ananassa*) browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1218-1224.

Lopez,L.R., Buckner,T.R., Hurley,B.L., Kobayashi,K., and Matsuura,E. 2007. Determination of oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) versus ox-LDL/beta2GPI complexes for the assessment of autoimmune-mediated atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1109: 303-310.

Luoma,J.S., Stralin,P., Marklund,S.L., Hiltunen,T.P., Sarkioja,T., and Yla-Herttuala,S. 1998. Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 157-167.

Malle,E., Waeg,G., Schreiber,R., Gröne,E.F., Sattler,W., and Gröne,H.J. 2000. Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human

- atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur. J Biochem.* 267: 4495-4503.
- Manach,C., Texier,O., Morand,C., Crespy,V., Regerat,F., Demigne,C., and Remesy,C. 1999. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic. Biol Med* 27: 1259-1266.
- May,P., Woldt,E., Matz,R.L., and Boucher,P. 2007. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann. Med.* 39: 219-228.
- Meiners,S., Ludwig,A., Lorenz,M., Dreger,H., Baumann,G., Stangl,V., and Stangl,K. 2006. Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free Radic. Biol Med* 40: 2232-2241.
- Michiels,C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196: 430-443.
- Miura,T., Muraoka,S., Ikeda,N., Watanabe,M., and Fujimoto,Y. 2000. Antioxidative and prooxidative action of stilbene derivatives. *Pharmacol. Toxicol.* 86: 203-208.
- Monagas,M., Bartolome,B., and Gomez-Cordoves,C. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit Rev. Food Sci. Nutr* 45: 85-118.
- Mor,A., Planer,D., Luboshits,G., Afek,A., Metzger,S., Chajek-Shaul,T., Keren,G., and George,J. 2007. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 893-900.
- Morel,D.W., Edgerton,M.E., Warner,G.E., Johnson,W.J., Phillips,M.C., and Rothblat,G.H. 1996. Comparison of the intracellular metabolism and trafficking of 25-hydroxycholesterol and cholesterol in macrophages. *J. Lipid Res.* 37: 2041-2051.
- Mosmann,T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays
1. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Muller,G., Catar,R.A., Niemann,B., Barton,M., Knels,L., Wendel,M., and Morawietz,H. 2006. Upregulation of endothelin receptor B in human endothelial cells by low-density lipoproteins. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 231: 766-771.
- Murad,F. 1994. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog. Horm. Res* 49: 239-248.
- Murad,F. 2004. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci. Rep.* 24: 452-474.
- Murillo,M.M., Carmona-Cuenca,I., Del Castillo,G., Ortiz,C., Roncero,C., Sanchez,A., Fernandez,M., and Fabregat,I. 2007. Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor-beta in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Biochem. J* 405: 251-259.
- Mursu,J., Voutilainen,S., Nurmi,T., Rissanen,T.H., Virtanen,J.K., Kaikkonen,J., Nyyssonen,K., and Salonen,J.T. 2004. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic. Biol Med* 37: 1351-1359.

- Nakajima,K., Nakano,T., and Tanaka,A. 2006. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin. Chim. Acta* 367: 36-47.
- Napoli,C., de Nigris,F., Williams-Ignarro,S., Pignalosa,O., Sica,V., and Ignarro,L.J. 2006. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric. Oxide*. 15: 265-279.
- Nathan,C. 2006. Role of iNOS in human host defense. *Science* 312: 1874-1875.
- Nilsson,J., Nordin,F.G., Schiopu,A., Shah,P.K., Jansson,B., and Carlsson,R. 2007. Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des* 13: 1021-1030.
- O'Callaghan,Y.C., Woods,J.A., and O'Brien,N.M. 2001. Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell Biol. Toxicol.* 17: 127-137.
- Opara,E.C. and Rockway,S.W. 2006. Antioxidants and micronutrients. *Dis. Mon.* 52: 151-163.
- Ortega,R.M. 2006. Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutr.* 9: 1136-1140.
- Padmaja,S. and Huie,R.E. 1993. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 195: 539-544.
- Palinski,W., Rosenfeld,M.E., Yla-Herttuala,S., Gurtner,G.C., Socher,S.S., Butler,S.W., Parthasarathy,S., Carew,T.E., Steinberg,D., and Witztum,J.L. 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86: 1372-1376.
- Palmer,R.M., Ferrige,A.G., and Moncada,S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Pannala,A.S. and Rice-Evans,C. 2001. Rapid screening method for relative antioxidant activities of flavonoids and phenolics. *Methods Enzymol.* 335: 266-272.
- Papadopoulou,A., Green,R.J., and Frazier,R.A. 2005. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.* 53: 158-163.
- Pattison,D.I. and Davies,M.J. 2006. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr. Med. Chem.* 13: 3271-3290.
- Pearson,D.A., Holt,R.R., Rein,D., Paglieroni,T., Schmitz,H.H., and Keen,C.L. 2005. Flavonols and platelet reactivity. *Clin Dev. Immunol.* 12: 1-9.
- Pechanova,O., Rezzani,R., Babal,P., Bernatova,I., and Andriantsitohaina,R. 2006. Beneficial effects of Provinols: cardiovascular system and kidney. *Physiol Res.* 55 Suppl 1: S17-S30.
- Perez-Vizcaino,F., Duarte,J., and Andriantsitohaina,R. 2006. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic. Res.* 40: 1054-1065.

Persichini,T., Cantoni,O., Suzuki,H., and Colasanti,M. 2006. Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid. Redox. Signal.* 8: 949-954.

Pietta,P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat. Prod.* 63: 1035-1042.

Polte,T., Oberle,S., and Schroder,H. 1997. Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. *FEBS Lett.* 409: 46-48.

Poon,H.F., Vaishnav,R.A., Getchell,T.V., Getchell,M.L., and Butterfield,D.A. 2006. Quantitative proteomics analysis of differential protein expression and oxidative modification of specific proteins in the brains of old mice. *Neurobiol. Aging* 27: 1010-1019.

Poppek,D. and Grune,T. 2006. Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid. Redox. Signal.* 8: 173-184.

Privat,C., Lantoine,F., Bedioui,F., Millanvoye,v.B., Devynck,J., and Devynck,M.A. 1997. Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification. *Life Sci.* 61: 1193-1202.

Rajagopalan,S., Kurz,S., Munzel,T., Tarpey,M., Freeman,B.A., Griending,K.K., and Harrison,D.G. 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest* 97: 1916-1923.

Rask-Madsen,C. and King,G.L. 2007. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat. Clin Pract. Endocrinol. Metab* 3: 46-56.

Ray,R. and Shah,A.M. 2005. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin. Sci. (Lond)* 109: 217-226.

Reilly,M.P., Pratico,D., Delanty,N., DiMinno,G., Tremoli,E., Rader,D., Kapoor,S., Rokach,J., Lawson,J., and FitzGerald,G.A. 1998. Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 2822-2828.

Rimm,E.B., Katan,M.B., Ascherio,A., Stampfer,M.J., and Willett,W.C. 1996. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med* 125: 384-389.

Rimner,A., Al Makdessi,S., Sweidan,H., Wischhusen,J., Rabenstein,B., Shatat,K., Mayer,P., and Spyridopoulos,I. 2005. Relevance and mechanism of oxysterol stereospecificity in coronary artery disease
1. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 535-544.

Robak,J. and Gryglewski,R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37: 837-841.

Robbesyn,F., Garcia,V., Auge,N., Vieira,O., Frisach,M.F., Salvayre,R., and Negre-Salvayre,A. 2003. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J* 17: 743-745.

Romitelli,F., Santini,S.A., Chierici,E., Pitocco,D., Tavazzi,B., Amorini,A.M., Lazzarino,G., and Di Stasio,E. 2007. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and

serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 851: 257-267.

Ross, R. 1993. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant. Proc.* 25: 2041-2043.

Ross, R. 1995. Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol* 57: 791-804.

Rouhanizadeh, M., Hwang, J., Clempus, R.E., Marcu, L., Lassegue, B., Sevanian, A., and Hsiai, T.K. 2005. Oxidized-1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine induces vascular endothelial superoxide production: implication of NADPH oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 1512-1522.

Royall, J.A. and Ischiropoulos, H. 1993. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells

2. *Arch. Biochem. Biophys.* 302: 348-355.

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

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

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

Schildknecht, S., Bachschmid, M., Baumann, A., and Ullrich, V. 2004. COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 18: 757-759.

Schroeder, P., Klotz, L.O., Buchczyk, D.P., Sadik, C.D., Schewe, T., and Sies, H. 2001. Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 782-787.

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

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

Selloum, L., Reichl, S., Muller, M., Sebihi, L., and Arnhold, J. 2001. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 395: 49-56.

Sen, C.K., Traber, K.E., and Packer, L. 1996. Inhibition of NF-kappa B activation in human T-cell lines by anetholdithiolthione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 148-153.

Sengupta,B. and Sengupta,P.K. 2002. The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 400-403.

Sessa,W.C., Pritchard,K., Seyedi,N., Wang,J., and Hintze,T.H. 1994. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.* 74: 349-353.

Sevanian,A. and McLeod,L.L. 1987. Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers. *Lipids* 22: 627-636.

Sevanian,A. and McLeod,L.L. 1987. Cholesterol autoxidation in phospholipid membrane bilayers. *Lipids* 22: 627-636.

Shimozawa,M., Naito,Y., Manabe,H., Uchiyama,K., Kuroda,M., Katada,K., Yoshida,N., and Yoshikawa,T. 2004. 7-Ketocholesterol enhances the expression of adhesion molecules on human aortic endothelial cells by increasing the production of reactive oxygen species 1. *Redox. Rep.* 9: 370-375.

Sies, H. 1986 "Biochemistry of oxidative stress", *Angewandte Chemie Internationale Englische Ausgabe* 25: 1058-1071.

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

Sies,H. 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69: 965-968.

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

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

Smith,L.L. 1996. Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids* 31: 453-487.

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

Stangl,V., Dreger,H., Stangl,K., and Lorenz,M. 2007. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res* 73: 348-358.

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

Steinberg,D., Parthasarathy,S., Carew,T.E., Khoo,J.C., and Witztum,J.L. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320: 915-924.

Steinberg,D. 1997. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 131 Suppl: S5-S7.

- Steinberg,D. and Witztum,J.L. 2002. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 105: 2107-2111.
- Stewart,C.R., Wilson,L.M., Zhang,Q., Pham,C.L., Waddington,L.J., Staples,M.K., Stapleton,D., Kelly,J.W., and Howlett,G.J. 2007. Oxidized cholesterol metabolites found in human atherosclerotic lesions promote apolipoprotein C-II amyloid fibril formation. *Biochemistry* 46: 5552-5561.
- Suschek,C.V., Schewe,T., Sies,H., and Kroncke,K.D. 2006. Nitrite, a naturally occurring precursor of nitric oxide that acts like a 'prodrug'. *Biol. Chem.* 387: 499-506.
- Thomas,T.H. and Advani,A. 2006. Inflammation in cardiovascular disease and regulation of the actin cytoskeleton in inflammatory cells: the actin cytoskeleton as a target. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 4: 165-182.
- Tipoe,G.L., Leung,T.M., Hung,M.W., and Fung,M.L. 2007. Green tea polyphenols as an antioxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 7: 135-144.
- Tomas-Barberan,F.A., Cienfuegos-Jovellanos,E., Marin,A., Muguerza,B., Gil-Izquierdo,A., Cerda,B., Zafrilla,P., Morillas,J., Mulero,J., Ibarra,A., Pasamar,M.A., Ramon,D., and Espin,J.C. 2007. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric. Food Chem.* 55: 3926-3935.
- Ushio-Fukai,M. 2006. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* 71: 226-235.
- Vafeiadou,K., Vauzour,D., and Spencer,J.P. 2007. Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets.* 7: 211-224.
- Vaidyanathan,J.B. and Walle,T. 2003. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 745-752.
- van Acker,S.A., van den Berg,D.J., Tromp,M.N., Griffioen,D.H., van Bennekom,W.P., van der Vijgh,W.J., and Bast,A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol Med* 20: 331-342.
- van Buul,J.D., Fernandez-Borja,M., Anthony,E.C., and Hordijk,P.L. 2005. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid. Redox. Signal.* 7: 308-317.
- van,d., V, Eiserich,J.P., Halliwell,B., and Cross,C.E. 1997. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol. Chem.* 272: 7617-7625.
- Vaya,J., Aviram,M., Mahmood,S., Hayek,T., Grenadir,E., Hoffman,A., and Milo,S. 2001. Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. *Free Radic. Res.* 34: 485-497.
- Vieira,O., Escargueil-Blanc,I., Jurgens,G., Borner,C., Almeida,L., Salvayre,R., and Negre-Salvayre,A. 2000. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J.* 14: 532-542.

Wang,C.Y., Wang,S.Y., Yin,J.J., Parry,J., and Yu,L.L. 2007. Enhancing antioxidant, antiproliferation, and free radical scavenging activities in strawberries with essential oils. *J Agric. Food Chem.* 55: 6527-6532.

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

Wiklund,O., Haversen,L., Pettersson,C., and Hulten,L.M. 2007. How can we prevent cardiovascular disease in diabetes. *J Intern. Med.* 262: 199-207.

Williams,L.A., Rosner,H., Moller,W., Conrad,J., Nkurunziza,J.P., and Kraus,W. 2004. In vitro anti-proliferation/cytotoxic activity of sixty natural products on the human SH-SY5Y neuroblastoma cells with specific reference to dibenzyl trisulphide. *West Indian Med. J* 53: 208-219.

Williamson,G. and Manach,C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 243S-255S.

Wittig,J. Dissertation 2002. Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Flavonoiden. Universität Würzburg

Ximenes,V.F., Kanegae,M.P., Rissato,S.R., and Galhiane,M.S. 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 457: 134-141.

Yla-Herttuala,S., Palinski,W., Butler,S.W., Picard,S., Steinberg,D., and Witztum,J.L. 1994. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb.* 14: 32-40.

Zhu,Q.Y., Holt,R.R., Lazarus,S.A., Orozco,T.J., and Keen,C.L. 2002. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp. Biol Med* (Maywood.) 227: 321-329.

Zieden,B., Kaminskas,A., Kristenson,M., Kucinskiene,Z., Vessby,B., Olsson,A.G., and Diczfalussy,U. 1999. Increased plasma 7 beta-hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 967-971.

Zielinska,M., Kostrzewa,A., and Ignatowicz,E. 2000. Antioxidative activity of flavonoids in stimulated human neutrophils. *Folia Histochem. Cytobiol.* 38: 25-30.

Zielinska,M., Kostrzewa,A., Ignatowicz,E., and Budzianowski,J. 2001. The flavonoids, quercetin and isorhamnetin 3-O-acylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. *Acta Biochim. Pol.* 48: 183-189.

Zsila,F., Bikadi,Z., and Simonyi,M. 2003. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochem. Pharmacol.* 65: 447-456.

12 Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
BAEC	Rinder-Aorta-Endothelzellen
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CYP	Cytochrom P-450
DAF-2DA	4,5-Diaminofluoresceindiacetate
DCFA	Dichlorofluorescein acetate
EDRF	endothelium-derived relaxing Factor
EGCG	Epigallocatechingallat
EGFR	“endothelium-growth factor receptor”
eNOS	endotheliale NO-Synthase
GSH	Glutathion
GPx	Glutathion-Peroxidase
4-HNE	4-Hydroxynonenal
HUVEC	“human umbilical vein endothelial cells” (Nabelschnur-Endothelzellen)
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ICAM	“intercellular adhesion molecule-1”
nNOS	neuronale NO-Synthase
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
L-NAME	NG-Nitro-L-arginin-methylester
LPS	Lipopolysaccharid
MAEC	Maus-Aorta-Endothelzellen
MPO	Myeloperoxidase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-Tetrazoliumbromid
NF-κB	“nuclear factor kappa B”
NOS	NO-Synthase
NOX	katalytische Einheit der NADPH-Oxidase
oxLDL	oxidativ modifiziertes “Low Density Lipoprotein”
PBS	Phosphate buffered saline
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PUFA	polyungesättigte Fettsäuren
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RNS	Reaktive Stickstoff-Spezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxid-Dismutase
SGLT	„sodium-dependent glucose transporter“
STAT 1	“signal transducer and activator of transcription-1”
SULT	Phenolsulfotransferasen
TBARS	„thiobarbituric acid-reactive substances”
TGF	Tumor-Wachstums-Faktor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VCAM	„vascular cell adhesion molecule“
UDPGT	„Uridin-5`-diphosphat-glucuronyltransferase
XO	Xanthinoxidase

Zusammenfassung

Hintergrund und Zielstellung: Aus epidemiologischen und experimentellen Studien am Menschen geht hervor, dass eine Zufuhr von (–)-Epicatechin oder (–)-Epicatechin reicher Nahrungsmittel die Bioverfügbarkeit des NO für das Gefäßendothel erhöht und dadurch die Gefäßfunktion verbessert. Gegenstand der vorliegenden Dissertation waren mechanistische Untersuchungen zur Wirkungsweise von (–)-Epicatechin auf zellulärer Ebene.

Methodik: Untersuchungsobjekte waren kultivierte Nabelschnurendothelzellen oder Aortaendothelzellen verschiedener Spezies. Oxidativer Stress wurde entweder durch oxidativ modifiziertes LDL (über Myeloperoxidase/H₂O₂/Nitrit oder Cu²⁺) oder durch Angiotensin II ausgelöst. Als Parameter in intakten Zellen wurden verfolgt: Formazanbildung aus MTT, DCF-Fluoreszenz, Bildung von carbonylierten und nitrierten Proteinen sowie von 4-Hydroxynonenal (HNE)-Addukten *in situ*, DNA-Fragmentierung, O₂^{•-}-Freisetzung sowie Veränderungen des intrazellulären NO-Spiegels über DAF2-DA-Fluoreszenz *in situ*. In Zelllysaten wurden bestimmt: die NADPH-Oxidaseaktivität (nach Etablierung eines neuen effizienten Assays), NO-Synthase- und Guanylatcyclaseaktivitäten, der intrazelluläre cGMP-Spiegel sowie weitere Parameter.

Ergebnisse: Die Cytotoxizität von oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL) und seinen Oxidationsprodukten wie den Oxysterolen lösen zelltoxische Prozesse in Gefäßendothelzellen aus, u.a. Proteinnitrierung, Carbonylierung und Bildung von HNE-Addukten. Die Endothelzellcytotoxizität des MPO/H₂O₂/Nitrit-oxLDL ist aufgrund eines höheren 7β-Hydroxycholesterol/7-Ketocholesterol-Quotienten stärker als beim Cu²⁺-oxLDL. (–)-Epicatechin unterdrückt die Lipidperoxidation im LDL durch das MPO/H₂O₂/Nitrit-Reaktionssystem stärker als andere vasoprotektiven Verbindungen. MPO/Nitrit-oxLDL ist cytotoxisch für Endothelzellen und fördert in kultivierten Nabelschnurendothelzellen einen proteasomalen Abbau von endothelialen NO-Synthase-Protein und die Expression der induzierbaren NO-Synthase; (–)-Epicatechin unterdrückt diesen Prozess, ist aber selbst kein Proteasomeninhibitor. Langzeitbehandlung von Endothelzellen mit (–)-Epicatechin hemmt die O₂^{•-} Freisetzung aus Endothelzellen stärker als sofortiger Zusatz dieses Polyphenols. Die endotheliale Catechol-O-Methyltransferase wandelt (–)-Epicatechin in B-Ring-Monomethylether und damit zu selektiven NADPH-Oxidasehemmern um. Die (–)-Epicatechinmetabolite und andere Flavonoide wirken in analoger Weise wie der NADPH-Oxidasehemmer Apocynin. Der durch (–)-Epicatechinbehandlung vermittelte Anstieg des intrazellulären ·NO in Endothelzellen geht mit einem Anstieg des cGMP-Spiegels einher, der nicht auf eine erhöhte eNOS-Aktivität oder ihrer Coenzyme zurückzuführen ist.

Schlussfolgerung: (–)-Epicatechin hält nach Umwandlung zu 3'- und 4'-Methylethern bei oxidativer Belastung in kultivierten Nabelschnurendothelzellen einen hohen NO-Spiegel aufrecht, indem es durch Hemmung der NADPH-Oxidase der NO-eliminierenden Bildung von Peroxynitrit entgegenwirkt.

Summary

Background and objective: High-flavanol cocoa improves the function of the vascular endothelium through enhancement of the bioavailability of $\cdot\text{NO}$. (–)-Epicatechin has been identified as bioactive constituent of cocoa to exert these actions, but its mode of action is still a matter of debate.

Aim of this thesis was to elucidate the mode of actions of (–)-epicatechin in endothelial cells.

Experimental: Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) or aortic endothelial cells were used as model for vascular endothelial cells. Oxidative stress was elicited by LDL upon its oxidative modification by a myeloperoxidase (MPO)/ H_2O_2 /nitrite reaction system or angiotensin II; Exposure of endothelial cells to either oxLDL or angiotensin II following assessment of MTT reduction, BrdU proliferation, DNA fragmentation, caspase activities, cytochrome c reduction and 2'7'dichlorofluorescein (DCF) formation. Intracellular $\cdot\text{NO}$ level was visualized by DAF-2DA fluorescence. cGMP was estimated by enzyme immunoassay. NADPH oxidase activity was measured in disintegrated HUVEC.

Results: MPO/ H_2O_2 /nitrite-oxLDL exhibits higher cytotoxicity toward vascular endothelial cells than Cu^{2+} -oxLDL despite lower contents of conjugated dienes, TBARS and total oxysterols. 7 β -hydroxycholesterol is the decisive cytotoxic component of oxLDL and oxysterol mixtures toward vascular endothelial cells. (–)-Epicatechin suppressed not only oxidation and nitration of LDL by MPO/ H_2O_2 /nitrite but also prevented several signs of damage to vascular endothelial cells by MPO/ H_2O_2 /nitrite-oxLDL and, independently of that, loss of endothelial NO synthase protein via activation of a 20S proteasomal pathway. These actions were not or only partially shared by other antioxidants. While (–)-epicatechin scavenged $\text{O}_2^{\cdot-}$, its O-methylated metabolites prevented $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation through inhibition of endothelial NADPH oxidase activity, even more strongly than apocynin. From the effect of 3,5-dinitrocatechol, an inhibitor of catechol-O-methyltransferase (COMT), it is concluded that (–)-epicatechin serves as 'prodrug' for COMT-dependent conversion to apocynin-like NADPH oxidase inhibitors. These data indicate an $\cdot\text{NO}$ -preserving effect of (–)-epicatechin via suppression of $\text{O}_2^{\cdot-}$ -mediated loss of $\cdot\text{NO}$, whereas expression and activity of endothelial $\cdot\text{NO}$ synthase were not modulated by (–)-epicatechin or its metabolites under these conditions. The epicatechin-mediated increase in cellular $\cdot\text{NO}$ was paralleled by corresponding increase in cGMP, indicating that the elevated $\cdot\text{NO}$ is bioavailable.

Conclusions: (–)-Epicatechin protects vascular endothelial cells after conversion to bioactive B-ring O-monomethyl ethers that, in turn, suppress NADPH-oxidase-mediated superoxide and peroxynitrite generation. This anti-peroxynitrite effect may be responsible for the preservation of the nitric oxide level and, thus, may improve endothelial function.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ausserdem wurde diese Dissertation in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei keiner anderen Institution eingereicht.

Die verwendeten Methoden dieser Dissertation sind in den einzelnen Publikationen aufgeführt.

Die meisten der für die Anfertigung dieser Arbeit erforderlichen Methoden wurden von der Autorin selbständig durchgeführt.

Die Experimente zur konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wurden gemeinsam mit Tobias Jung (IUF, Düsseldorf) durchgeführt.

Folgende Methoden wurden von Co-Autoren der jeweiligen Publikationen durchgeführt:

Gaschromatographie der Oxysterole (Dr. I. Wiswedel und Mitarbeiter, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg)

Bestimmung der Proteasomenaktivität (Prof. T. Grune und Mitarbeiter, IUF Düsseldorf)

Immunopräzipitation des EGF-Rezeptors (PD. O. Klotz und Mitarbeiter, Heinrich-Heine Universität-Düsseldorf)

Erzeugung von Scherstress mittels Kegel-Platten-Viskosimeter (Prof. R. Heller und Mitarbeiter, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Citrullin-Assay (Prof. R. Heller und Mitarbeiter, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Phosphorylierungsexperimente der endothelialen NO-Synthase (Prof. R. Heller und Mitarbeiter, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Messung der Guanylatcyklaseaktivität (Prof. R. Heller und Mitarbeiter, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Düsseldorf, den 13.12.2007

Yvonne Steffen

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Sies herzlich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen. Er unterstützte mich mit vielen Tipps und Anregungen und hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen. Außerdem möchte ich mich für das große Vertrauen und die gewährten Freiheiten, sowie für seine weitreichende wissenschaftliche Förderung sehr herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Schewe für die exzellente Betreuung bei der Bearbeitung des Themas, für die stete motivierende Unterstützung und die unzähligen anregenden Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Schmitt möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Herrn Prof. Stahl, Frau Prof. Heller, Herrn Prof. Grune, PD. Dr. Klotz, Herrn Prof. Kröncke, Frau Dr. Wiswedel und Tobias Jung danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft möchte ich ein großes Dankeschön an meine Kollegen Norbert Mester, Thomas Becher, Tatjana Brossette und Tanja Portugall aussprechen.

Peter Graf gilt mein Dank für die intensive Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Danke an alle Mitarbeiter im Institut für Biochemie und Molekularbiologie I.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Ihr Interesse an meiner Arbeit war mir ein stetiger Ansporn.