

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

# **Einfluss von Drogenextrakten und Naturstoffen auf die endotheliale NO-Synthase**

von

Jürgen Friedrich Leikert

aus

Traunstein

2002

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau Prof. Dr. A. Vollmar betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 07.06.2002



(Jürgen Leikert)

Dissertation eingereicht am	11.06.2002
1. Gutachter	Prof. Vollmar
2. Gutachter	Prof. Biel
Mündliche Prüfung am	02.07.02

## Danksagung

Dem Freistaat Bayern und seinen Steuerzahlern danke ich für die ausgezeichneten Rahmenbedingungen auf dem neuen *High Tech Campus<sup>LMU</sup>*.

Für die stets großzügige Unterstützung, die immer motivierenden Gespräche, das große Vertrauen und die gewährten Freiheiten möchte ich mich bei „unserer Chefin“ Frau Prof. A. Vollmar sehr herzlich bedanken.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Dirsch danke ich ganz herzlich für die Auswahl des äußerst interessanten Themas meiner Arbeit, die gute Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, das stets in allen Stresssituationen offene Ohr für meine Fragen, die hilfreichen Ratschläge und für die interessanten fachlichen sowie gesellschaftlichen Diskussionen. Besonders danke ich Ihnen für die Verbreitung des guten Laborklimas durch die faire und gleiche Behandlung aller Doktoranden.

Herrn Christian Müller und Herrn Thomas Räthel danke ich für die hilfreichen und tiefgreifenden fachlichen Diskussionen. Darüberhinaus möchte ich mich bei Ihnen für die freundschaftliche Mithilfe bei der Entwicklung und Durchführung von schwierigen Experimenten ganz herzlich bedanken.

Herrn Dr. R. Samtleben danke ich für die äußerst gute und interessante Kooperation im Rotweinprojekt und für die interessanten Gespräche, in denen ich von seiner wissenschaftlichen Denkweise und seiner großen Erfahrung viel lernen konnte. Auch Herrn T. Gerwig und Herrn H. Keiss danke ich sehr für die freundschaftliche Hilfe in allen Fragen der EDV.

Allen technischen Angestellten, besonders Frau U. Kollmannsberger, Frau R. Socher, und Frau M. Kiss danke ich recht herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfe. Allen Kollegen vom PB II Praktikum und allen weiteren noch nicht erwähnten Kollegen des Arbeitskreises besonders Frau Antlsperger, Frau Haider, Herr Huber, Frau Bildner, Frau Förnges und Frau Weber danke ich für das gute Arbeitsklima und die lustigen Stunden in und auch oftmals nach der Arbeit.

Herrn Dr. Kleinert danke ich für die Bereitstellung von Zellen und Plasmiden und Herrn Prof. Langhals für wichtige Tipps in der Fluoreszenzspektroskopie.

Die Motivation für den Laboralltag lieferte oftmals das lustige „Campusleben“. Hier danke ich ganz herzlich besonders den Mitgliedern der Pharma-Fußballmannschaft und auch den Mitgliedern des PDM (Pharma-Doktoranden-Männerclub) für die gemeinsamen Erfolge und zahlreichen unvergesslichen lustigen Abende.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Antje, meinen Eltern, meinem Bruder Reiner, meiner Oma und meiner Tante Hilde für die liebevolle Unterstützung.

**Meiner Familie  
gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Übersicht und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Isoenzyme der NO-Synthasen .....</b>	<b>2</b>
2.1 Geschichtliches .....	2
2.2 Chemischer Aufbau der NO-Synthasen .....	3
2.3 Unterscheidungsmerkmale der NO-Synthasen .....	5
2.4 Mechanismus der NO-Synthese aus L-Arginin .....	5
2.5 NO-Synthasen können außer NO weitere Radikale produzieren .....	7
2.6 NO-Synthase Hemmer .....	7
<b>3 Stickstoffmonoxid .....</b>	<b>8</b>
3.1 Chemische Eigenschaften .....	8
3.2 Detektionsmöglichkeiten von NO .....	9
3.3 Physiologisch vermittelte Wirkungen .....	10
3.4 NO-Pharmaka .....	11
<b>4 Endotheliale NO-Synthase (eNOS) .....</b>	<b>12</b>
4.1 Schlüsselrolle für vaskuläre Homöostase .....	12
4.2 Regulierung der eNOS .....	13
4.2.1 Transkriptionell .....	13
4.2.2 Posttranskriptionell .....	14
4.2.3 Translationell .....	14
4.2.4 Co- und Postranslationell .....	14
4.2.4.1 Acylierung durch Palmitin und Myristin .....	14
4.2.4.2 Regulierung durch Protein-Protein Interaktionen .....	15
4.2.4.3 Regulierung durch Phosphorylierung .....	16
4.2.4.4 Regulierung durch den Cofaktor BH <sub>4</sub> .....	17
<b>5 Kardiovaskuläre Wirkungen von Drogenextrakten und Naturstoffen .....</b>	<b>19</b>
5.1 Knoblauch / isolierte Knoblauchinhaltsstoffe .....	19
5.2 Weißdorn .....	20
5.3 Phytoöstrogene aus der Sojabohne .....	20
5.4 Grüner Tee / isolierte Epicatechinderivate .....	21
5.5 Rotwein / isolierte Rotweinpolyphenole .....	22
5.6 Sonstige Beeren und Früchte mit roten Farbstoffen .....	23
<b>B. Material und angewandte Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>1 Eukaryontische Zellen, Bakterien, Plasmide .....</b>	<b>24</b>
1.1 Zellkultur .....	24

1.1.1	Nährmedien und Zusätze .....	24
1.1.2	Lösungen .....	25
1.1.3	Kultivierung .....	26
1.1.4	HUVEC-Primärkulturen .....	27
1.1.5	Eukaryontische Zelllinien .....	27
1.1.5.1	EA.hy926 Zellen .....	27
1.1.5.2	ECV304 Zellen .....	27
1.2	Bakterien .....	28
1.2.1	Eingesetzter Stamm .....	28
1.2.2	Nährmedien und Antibiotika .....	28
1.2.3	Kultivierung .....	29
1.3	Vektoren .....	29
1.3.1	Verwendete Plasmide .....	29
<b>2</b>	<b>Verwendete Drogenextrakte und Naturstoffe .....</b>	<b>30</b>
2.1	Knoblauchpulver/extrakt .....	30
2.2	Isolierte Knoblauchextraktinhaltsstoffe .....	30
2.3	Weißdornblüten- und Blätterextrakt (WS1442) .....	30
2.4	Isolierte Isoflavone der Sojabohne .....	32
2.5	Isolierte Catechingerbstoffe des grünen Tees .....	32
2.6	Pure Rotweine .....	32
2.7	Rotweinpolyphenolextrakt (RWPE) .....	33
2.8	Isolierte Rotweinpolyphenole .....	34
2.9	Eichenrindenfluidextrakt .....	34
2.10	Beeren- und Früchtepolyphenolextrakte .....	35
2.11	Herstellung der VF und PPF aus purem Rotwein und Fruchtsäften .....	35
<b>3</b>	<b>Ermittlung des optimalen Zellproliferationsgrads .....</b>	<b>36</b>
3.1	Ziel der Validierung der Zellproliferation .....	36
3.2	Kultivierung .....	36
3.3	Ernte und Zähltechnik .....	36
<b>4</b>	<b>Messung der eNOS Promotoraktivität mittels Luciferase-Reportergen- Assay .....</b>	<b>37</b>
4.1	Allgemeines zum Luciferase-Reportergen-Assay .....	37
4.1.1	Plasmidaufbau und Transkriptionsablauf .....	37
4.1.2	Luciferase-Reaktion .....	37
4.2	Lösungen .....	38
4.3	Durchführung .....	38
<b>5</b>	<b>Detektion von RNA mittels Northern Blot .....</b>	<b>38</b>
5.1	Isolierung von Ribonukleinsäuren .....	39
5.1.1	Lösungen .....	39
5.1.2	Guanidinium/Phenol/Chloroform RNA-Isolierung .....	39

5.1.3	Konzentrationsbestimmung von total RNA.....	40
5.2	Gelelektrophoretische Auftrennung der total RNA .....	40
5.2.1	Lösungen .....	41
5.2.2	Färbung und Visualisierung der totalen RNA.....	42
5.3	Amplifizierung einer cDNA-Northern Blot Probe .....	43
5.3.1	Präparation kompetenter Bakterienzellen .....	43
5.3.2	Transformation von E-coli DH5 $\alpha$ mit Plasmid cDNA .....	44
5.3.3	Schnellisolierung von Plasmid-DNA.....	44
5.3.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	45
5.3.5	Plasmidisolierung und Reinigung mittels Säulenchromatographie.....	45
5.3.6	Quantifizierung der Plasmid DNA über OD-Messung .....	47
5.3.7	Schneiden des Plasmids mit Restriktionsendonukleasen .....	47
5.3.8	Überprüfung der Plasmidrestriktion mittels Agarose Gelelektrophorese...	49
5.4	Herstellung einer radioaktiv markierten cRNA-Sonde .....	50
5.4.1	RNA-Polymerase Reaktion .....	50
5.4.2	Abtrennung der radioaktiven cRNA von den radioaktiven Nukleotiden....	50
5.5	Northern Blot .....	51
5.5.1	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Nylonmembran ..	51
5.5.2	Hybridisierung der total RNA mit der radioaktiven cRNA-Sonde.....	51
<b>6</b>	<b>eNOS Protein Detektion mittels Western Blot.....</b>	<b>53</b>
6.1	Probenaufarbeitung / Bradford-Proteinbestimmung.....	53
6.1.1	Lösungen .....	53
6.1.2	Durchführung .....	54
6.2	SDS-Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese .....	55
6.2.1	Lösungen .....	55
6.2.2	Durchführung .....	56
6.3	Protein-Transfer von SDS-Polyacrylamidgel auf PVDF-Membran .....	56
6.3.1	Lösungen .....	56
6.3.2	Durchführung .....	56
6.4	Immunologische Detektion mit Antikörpern.....	57
6.4.1	Verwendete Antikörper.....	57
6.4.2	Inkubation mit Antikörpern und Chemilumineszenzreaktion .....	57
<b>C.</b>	<b>Methodenentwicklungen .....</b>	<b>59</b>
<b>1</b>	<b>L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay in intakten Endothelzellen .....</b>	<b>59</b>
1.1	Grund der Methodenentwicklung .....	59
1.2	Zellvorbereitung .....	60
1.3	Lösungen / Substanzen .....	61
1.4	Optimierung verschiedener Versuchsparameter.....	61
1.4.1	Dünnschichtchromatographische Trennung.....	61
1.4.2	Menge an [ $^{14}$ C]L-Argininzugabe.....	61

1.4.3	Einsatz des Calciumionophors A23187.....	64
1.4.4	Reaktionsdauer.....	65
1.4.5	[ <sup>14</sup> C]L-Citrullin-/ [ <sup>14</sup> C]L-Argininextraktion aus den Zellen.....	66
1.4.6	Herauslösen der Aminosäuren aus einrotiertem Rückstand.....	67
1.5	Auswertung im Phosphoimager.....	67
1.6	Protokoll der Versuchsdurchführung.....	68
1.7	Bestätigung der Methode durch Positivkontrollen/Hemmer.....	68
<b>2</b>	<b>DAF-2 Fluoreszenzassay zur Messung der endothelialen NO-Freisetzung</b>	<b>70</b>
2.1	Grund der Methodenentwicklung.....	70
2.2	Zellvorbereitung.....	71
2.3	Mechanismus der Reaktion von DAF-2 zu DAF-2T mittels NO.....	71
2.4	Lösungen.....	72
2.5	Optimierung verschiedener Versuchsparameter.....	72
2.5.1	DAF-2 Konzentration.....	72
2.5.2	Subtraktion der DAF-2 Eigenfluoreszenz.....	74
2.6	Versuchsdurchführung.....	76
2.7	Bestätigung der Methode durch Positivkontrollen/Hemmer.....	76
<b>D.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>78</b>
<b>1</b>	<b>Ermittlung des optimalen Zellproliferationsgrads.....</b>	<b>78</b>
1.1	Zeitabhängige Zellproliferation.....	78
<b>2</b>	<b>Einfluss von Knoblauch auf die eNOS.....</b>	<b>79</b>
2.1	Einfluss von Knoblauchextrakt auf den eNOS mRNA-Level.....	79
2.2	Einfluss von isolierten Knoblauchinhaltsstoffen, -Metaboliten.....	80
2.2.1	Keine Wirkung auf die eNOS mRNA.....	80
2.2.2	Keine Wirkung auf die eNOS Aktivität/ L-Citrullinbildung.....	80
<b>3</b>	<b>Einfluss von Weißdornblüten- und Blätterextrakt (WS1442) auf die eNOS</b>	<b>83</b>
3.1	Langzeiteffekt von WS1442 auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.....	83
3.2	Kurzzeiteffekt von WS1442 auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.....	83
<b>4</b>	<b>Wirkung von Soja-Isoflavonen auf die eNOS.....</b>	<b>85</b>
4.1	Einfluss auf Promotoraktivität.....	85
4.1.1	Zeitabhängige Steigerung.....	85
4.1.2	Dosisabhängige Steigerung.....	85
4.2	Einfluss von Genistein auf die eNOS Proteinmenge.....	85
4.3	Einfluss von Genistein und Daidzein auf die eNOS Aktivität/ L-Citrullinbildung.....	86
4.4	Einfluss von Genistein auf die eNOS abhängige NO-Bildung.....	86
<b>5</b>	<b>Einfluss der Catechingerbstoffe des Grünen Tees EGC / ECG auf die eNOS.....</b>	<b>90</b>



5.1	Einfluss auf eNOS Promotoraktivität.....	90
5.2	Einfluss eNOS Aktivität/ L-Citrullinbildung.....	90
<b>6</b>	<b>Effekt von Rotwein(extrakten) und isolierten Inhaltsstoffen auf die eNOS</b>	<b>91</b>
6.1.1	Erhöhung der eNOS Promotoraktivität.....	92
6.1.2	Erhöhung der eNOS Proteinexpression .....	93
6.1.3	Erhöhung der eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.....	94
6.1.4	Erhöhung der eNOS abhängigen NO-Bildung .....	95
6.2	Effekt von puren Rotweinen und ihren Polyphenolfractionen.....	97
6.2.1	Einfluss von puren Rotweinen auf die eNOS Promotoraktivität .....	98
6.2.2	eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung .....	100
6.3	Beeinflussung der eNOS Promotoraktivität durch unterschiedliche Weinlagerung .....	102
6.3.1	Kein Effekt durch unterschiedliches Fassmaterial.....	103
6.3.2	Effekt von zugesetzten Tanninen und Eichenrindenextrakt auf die eNOS Promotoraktivität.....	103
6.4	Effekt von isolierten Rotweininhaltsstoffen.....	105
6.4.1	eNOS Promotoraktivität .....	105
6.4.2	eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung .....	105
<b>7</b>	<b>Effekt von Fruchtextrakten auf die eNOS</b> .....	<b>107</b>
7.1.1	Einfluss auf Promotoraktivität.....	107
<b>E.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>109</b>
<hr/>		
<b>1</b>	<b>Bestimmung der eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung mit dem L-Arginin/L- Citrullin Umwandlungsassay</b> .....	<b>109</b>
<b>2</b>	<b>Messung der eNOS bedingten NO-Produktion mittels des DAF-2 Fluoreszenzassays</b> .....	<b>110</b>
<b>3</b>	<b>Keinen Einfluss auf die eNOS in Endothelzellen haben: Knoblauchextrakt, isolierte Knoblauchextraktinhaltsstoffe, Weißdornextrakt (WS1442) und ECG/EGC des grünen Tees</b> .....	<b>111</b>
<b>4</b>	<b>Wirkung von Soja-Isoflavonen auf die eNOS</b> .....	<b>113</b>
<b>5</b>	<b>Wirkung von RWPE auf die eNOS</b> .....	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Wirkung von Beeren- und Fruchtextrakten auf eNOS</b> .....	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Mögliche wirksame Inhaltsstoffe(gruppen) im RWPE</b> .....	<b>116</b>
<b>F.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>117</b>
<b>G.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>119</b>
<hr/>		

<b>1</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>119</b>
<b>2</b>	<b>Alphabetische Firmenliste</b> .....	<b>122</b>
<b>H. Literaturverzeichnis</b> .....		<b>124</b>
<hr/>		
<b>1</b>	<b>Zitierte Veröffentlichungen</b> .....	<b>124</b>
<b>2</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b> .....	<b>133</b>
2.1	Originalpublikationen .....	133
2.2	Abstracts zu Postern .....	133
<b>I. Lebenslauf</b> .....		<b>134</b>
<hr/>		

## A. Einleitung

---

### 1 Übersicht und Fragestellung

In den achtziger Jahren wurden im menschlichen Organismus drei Isoenzyme entdeckt, welche L-Arginin in L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) umwandeln. Eines dieser Enzyme ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Die eNOS befindet sich im Endothel aller Blutgefäße und reguliert über ihre NO-Produktion in entscheidendem Maße die vaskuläre Homöostase. Das endotheliale NO ist ein sehr potenter Vasodilatator. Darüberhinaus vermittelt NO positive kardiovaskuläre Eigenschaften, wie eine reduzierte Leukocytenadhäsion an das Endothel, eine reduzierte Leukocytenmigration und Lipoproteinaufnahme in die Gefäßwand sowie eine verringerte Plättchenaggregation (Li and Förstermann, 2000).

Nach momentanen Stand der Wissenschaft stellt die endotheliale NO-Produktion die Basis für ein intaktes kardiovaskuläres System dar (Katusic, 2001). Diese These wird durch die Erkenntnis gestützt, dass kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck oftmals eine endotheliale Dysfunktion in Form einer gestörten endothelialen NO-Produktion oder reduzierten NO-Bioverfügbarkeit vorangeht (Li and Förstermann, 2000). Dies veranlasst die Forschung (auch unsere Arbeitsgruppe) nach Substanzen und Wegen zu suchen, welche die endotheliale NO-Produktion und/oder NO-Bioverfügbarkeit erhöhen.

Ziel dieser Arbeit war es Drogenextrakte und Naturstoffe zu finden, welche die endotheliale NO-Produktion *in vitro* in Endothelzellen erhöhen.

Dabei sollten bevorzugt solche Extrakte und Naturstoffe wie Knoblauch, Weißdorn, Soja-Isoflavone, Resveratrol und Rotwein getestet werden, bei denen bereits positive kardiovaskuläre Eigenschaften wie Vasodilatation bekannt bzw. in der Diskussion sind. Wenn Extrakte oder Naturstoffe, welche die eNOS abhängige NO-Produktion erhöhen, gefunden waren, sollte zudem geklärt werden, auf welcher zellulären Ebene (z.B. Transkription, Translation, Aktivität) sie die eNOS beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit war in unserer Arbeitsgruppe die erste, die sich mit dem Gebiet der eNOS beschäftigte. Deshalb mussten zunächst gängige Methoden zur Detektion der eNOS Promotoraktivität, eNOS mRNA- und Proteinmenge etabliert werden. Darüberhinaus mussten Methoden zur Messung der eNOS bedingten L-Citrullin- und NO-Produktion entwickelt werden.

## 2 Isoenzyme der NO-Synthasen

### 2.1 Geschichtliches

In den siebziger Jahren interessierten sich Krebsforscher für die Aufnahme und Ausscheidung von Nitrat und Nitrit im menschlichen Körper, denn aus beiden können im Organismus krebserregende Nitrosamine gebildet werden. Bilanzierungsstudien ergaben, dass der Mensch mehr Nitrat/Nitrit ausscheidet als er zu sich nimmt. Somit konnte die Nahrung nicht die einzige Quelle von Nitrat/Nitrit sein. Da Bakterien Nitrat und Nitrit bilden können, machte man die Darmflora für die Mehrproduktion verantwortlich. Diese Vorstellung musste jedoch revidiert werden, da 1981 eine Forschergruppe zeigte, dass keimfrei gezogene Ratten, die keine Darmflora hatten, ebenfalls mehr Nitrat im Urin ausschieden, als man ihnen zuführte (Green et al., 1981).

Darum begannen viele Forschergruppen die Suche nach endogenen Systemen, welche Stickstoff zu Nitrat und Nitrit oxidieren können. In den achtziger Jahren fanden unabhängig und relativ gleichzeitig mehrere Forschergruppen in drei Zelltypen Nitrat-/Nitritquellen.

So fand 1985 eine Gruppe, dass Makrophagen nach Behandlung mit bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid aus Bakterien) Nitrat und Nitrit bilden (Stuehr and Marletta, 1985). Zwei Jahre später konnte NO als primäres Syntheseprodukt dieser Zellen nachgewiesen werden. Als Stickstoffquelle für die NO-Synthase wurde einer der Guanidinostickstoffe von L-Arginin identifiziert (Hibbs, Jr. et al., 1987).

Unabhängig davon entdeckte eine Gruppe um den Wissenschaftler Furchgott Anfang der achtziger Jahre, dass aus dem Endothel von Blutgefäßen eine gefäßerweiternde Substanz ausgeschüttet wird (Furchgott *et al.*, 1984). Diese Substanz wurde als „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet und konnte 1987 von einer englischen Gruppe als NO identifiziert werden (Palmer et al., 1987). Analog zum Makrophagensystem wurde die Aminosäure L-Arginin als Substrat der NO-Synthase in Endothelzellen identifiziert.

Wiederum unabhängig davon wurde 1982 entdeckt, dass für die Bildung des zyklischen Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) im Gehirn L-Arginin benötigt wird (Deguchi and Yoshioka, 1982). Die Erklärung dafür lieferte später die Entdeckung, dass Nervenzellen im Gehirn aus L-Arginin NO produzieren.

Somit war seit Ende der achtziger Jahre bekannt, dass in mindestens drei unterschiedlichen Zelltypen (Makrophagen, Endothelzellen, Nervenzellen) NO aus L-

Arginin gebildet wird. Die Enzyme, welche NO aus L-Arginin bilden können, wurden NO-Synthasen genannt.

### 2.2 Chemischer Aufbau der NO-Synthasen

Anfang der neunziger Jahre konnten drei Isoenzyme isoliert und kloniert werden, die in den verschiedenen Zelltypen für die Synthese von NO aus L-Arginin verantwortlich sind (Förstermann, 1994):

- die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), Molekulargewicht: 160 kDa
- die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II), Molekulargewicht: 130 kDa
- die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III), Molekulargewicht: 133 kDa

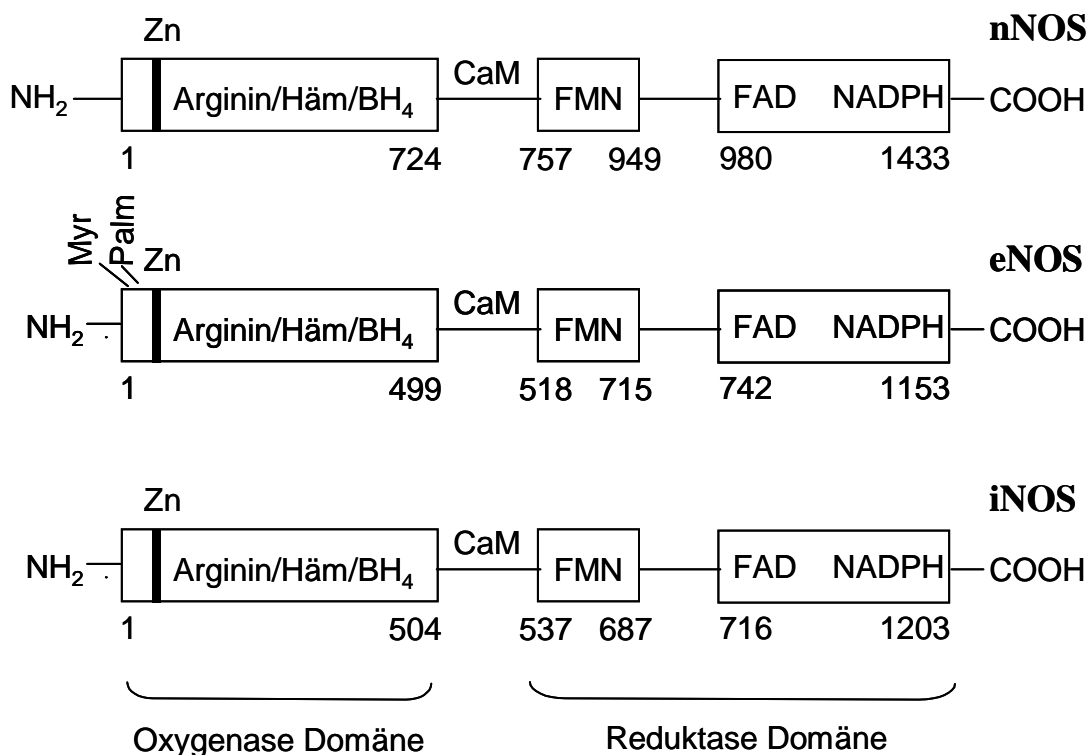
Die Namensgebung, z.B. neuronale NO-Synthase erfolgte nach dem Gewebe, in dem die NO-Synthase jeweils zuerst gefunden wurde.

Die drei humanen Isoformen der NO-Synthasen weisen trotz ihrer unterschiedlichen Lokalität, Regulation, katalytischen Eigenschaften und Hemmbarkeit eine 51-57% Homologie der Aminosäuresequenz auf. Alle drei Isoenzyme sind funktionell durch eine homologe Calmodulin-Bindungsstelle in eine Oxygenase- und eine Reduktase-Domäne geteilt (Abb. 1). Hier finden die entsprechenden oxidativen und reduktiven Schritte der Redoxreaktion statt, über die L-Arginin und molekularer Sauerstoff in NO und L-Citrullin umgewandelt werden. Alle Isoenzyme besitzen in der N-terminalen Oxygenase Domäne Bindungsstellen für Eisen Protoporphyrin IX (Häm), 5, 6, 7, 8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), L-Arginin und Zink. In der reduktiven Domäne haben alle NO-Synthasen Bindungsstellen für die Coenzyme Flavinmononukleotid (FMN), Flavin-adenin-dinukleotid (FAD) und Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADPH). Zusätzlich besitzt die eNOS in der Oxygenase Domäne je eine Phosphorylierungsstelle für Myristin und Palmitin.

Die Reduktase Domänen aller NO-Synthasen weisen eine ausgeprägte Sequenzhomologie (z.B. ≈36 % bei der eNOS) zur Cytochrom P<sub>450</sub>-Reduktase auf.

In letzter Zeit wurden abgesehen von der nNOS, eNOS und iNOS weitere Varianten der NO-Synthasen entdeckt. So wurden im menschlichen Organismus Splice-Varianten der nNOS (z.B. nNOS $\beta$ , nNOS $\chi$ , nNOS $\mu$ , nNOS-2) gefunden. Darüberhinaus gibt es erste Publikationen über humane NO-Synthasen, die sich in Mitochondrien und Chondrozyten befinden. Außerdem wurde im Meerschweinchen

eine induzierbare NO-Synthase gefunden, die zur menschlichen iNOS eine 80% Aminosäuresequenzhomologie aufweist (Alderton *et al.*, 2001).



**Abb. 1: Schematischer Aufbau der menschlichen nNOS, eNOS und iNOS** (Alderton *et al.*, 2001).

### 2.3 Unterscheidungsmerkmale der NO-Synthasen

Leider wurden die Unterscheidungsmerkmale der drei NO-Synthasen seit 1994 immer unklarer (Alderton *et al.*, 2001). Damals erschien es möglich die drei NO-Synthasen auf Grund charakteristischer Eigenschaften zu unterscheiden:

1. Konstitutive NO-Synthasen (eNOS, nNOS) gegenüber induzierbarer NO-Synthase (iNOS). Mittlerweile ist klar, dass alle drei mit unterschiedlichen Stimuli induziert werden können und dass alle drei in verschiedenen Geweben und Zellen auch konstitutiv exprimiert vorliegen können.
2. Calcium-Abhängigkeit (eNOS, nNOS) gegenüber Calcium-Unabhängigkeit (iNOS). Dieses Unterscheidungsmerkmal gilt nach wie vor z.B. für die menschlichen und murinen Isoformen, aber beim Meerschweinchen ist es noch nicht sicher.
3. Zytoplasmatisch (iNOS, nNOS) gegenüber membrangebunden (eNOS). Heute weiß man, dass alle Isoformen sowohl zytoplasmatisch als auch membran gebunden vorliegen.
4. Niedrige ( $\approx$ nM) NO-Produktion (eNOS, nNOS) gegenüber hoher ( $\approx$  $\mu$ M) NO-Produktion (iNOS). Dieses Unterscheidungsmerkmal gilt heute auch noch.

### 2.4 Mechanismus der NO-Synthese aus L-Arginin

In einer 5-Elektronen-Oxidationsreaktion wird L-Arginin durch die NO-Synthasen unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff in NO und L-Citrullin umgesetzt (Groves and Wang, 2000). Als Zwischenstufe tritt Hydroxy-L-Arginin auf. Die NO-Synthasen können die Umwandlung von Arginin in Citrullin nur im aktiven dimeren Zustand katalysieren. Dabei bindet die Oxygenase Domäne eines Monomers an die Reduktase-Domäne eines anderen Monomers. Die Elektronen werden von der Reduktase Domäne des einen Monomers auf die Oxygenase Domäne des anderen Monomers übertragen (Abb. 3). Der dimere Zustand der NO-Synthasen wird durch Häm und Arginin stabilisiert (Alderton *et al.*, 2001).

Die Oxidation des Guanidino-Stickstoffs des L-Arginin wird durch den Elektronentransfer von der Oxygenase Domäne zur Reduktase-Domäne ermöglicht. Dabei werden Elektronen von der Elektronenquelle NADPH über FAD, FMN zur Oxygenase Domäne transferiert. Hier wird mittels der Redox-Cofaktoren Häm und BH<sub>4</sub> L-Arginin in L-Citrullin umgewandelt. Der Cofaktor Calmodulin (CaM), dessen Bindungsstelle sich zwischen der Oxygenase- und Reduktase-Domäne befindet, ist wichtig für die Bildung des dimeren aktiven Zustandes der eNOS.

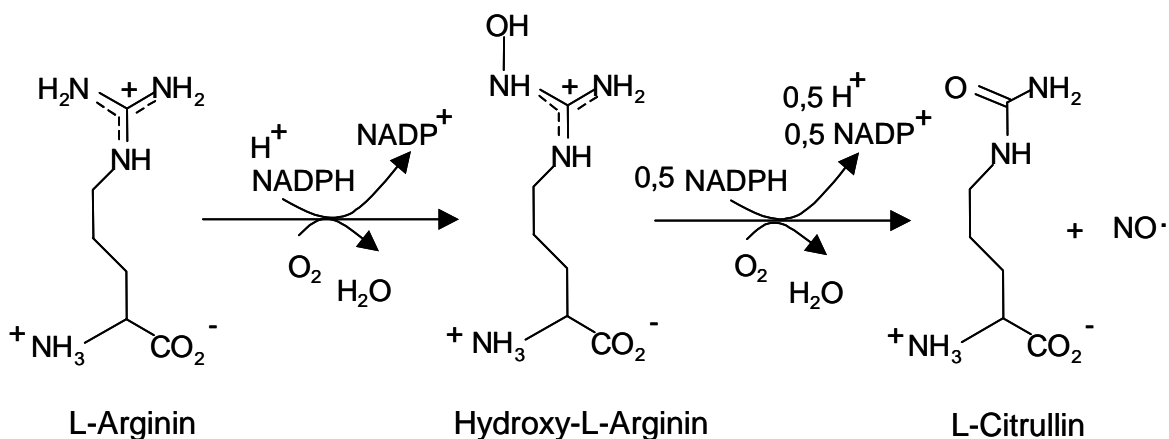


Abb. 2: Biosynthese von Stickstoffmonoxid (Groves and Wang, 2000)

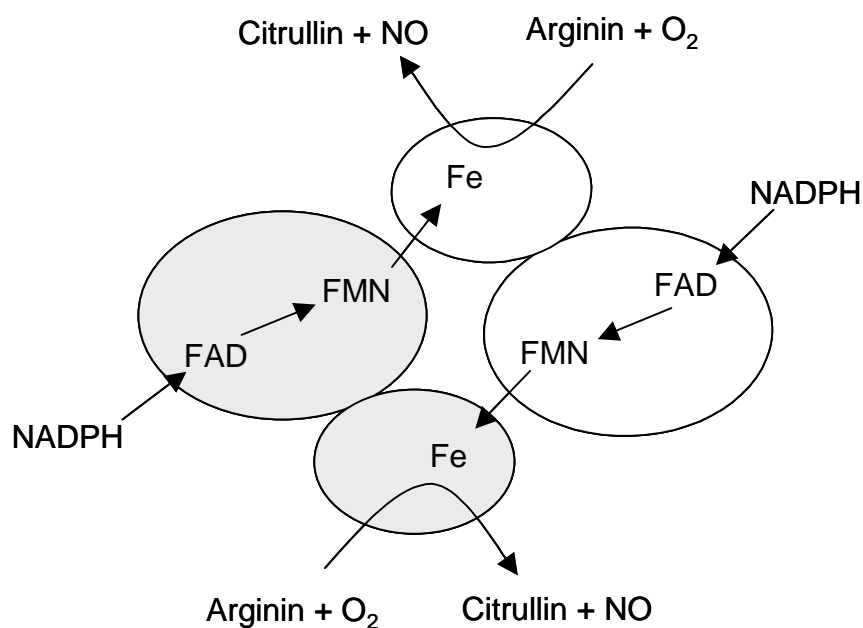


Abb. 3: Schematische Darstellung der Richtung des Elektronenflusses im dimeren aktiven Zustand der NO-Synthasen (Alderton *et al.*, 2001).



### 2.5 NO-Synthasen können außer NO weitere Radikale produzieren

Bei der NO-Synthese aus Arginin entstehen NO und Citrullin nicht immer im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Alderton *et al.*, 2001). Dies ist ein Hinweis, dass bei der Umwandlung von Arginin in Citrullin nicht nur NO, sondern auch andere stickstoffhaltige Radikale entstehen können. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die murine iNOS in Abwesenheit von  $\text{BH}_4$  das Nitroxylat-Anion ( $\text{NO}^-$ ) bildet (Rusche *et al.*, 1998). Abgesehen davon können alle NO-Synthasen auch Sauerstoffradikale produzieren. Bei einem Mangel oder geringer Konzentration an  $\text{BH}_4$  oder L-Arginin kann es zu einem „uncoupling“ kommen. Dies bedeutet, dass die NO-Synthasen mittels Häm in der Oxygenase Domäne Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) produzieren (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998). Die iNOS kann zusätzlich mittels der Flavincofaktoren in der Reduktase Domäne  $\text{O}_2^-$  produzieren (Miller *et al.*, 1997). Das gebildete Superoxid reagiert mit NO schnell zu Peroxynitrit ab.

Auch wenn alle NO-Synthasen unter gewissen Bedingungen, wie  $\text{BH}_4$ -Mangel, neben NO noch andere Radikale NO produzieren können, ist bis heute unklar, ob dies eine physiologische Bedeutung hat.

### 2.6 NO-Synthase Hemmer

Für die NO-Synthase-Forschung sind NOS-Hemmer unabdingbar. Durch ihren Einsatz kann man z.B. sicherstellen, dass die gemessene L-Citrullin- oder NO-Produktion tatsächlich durch NO-Synthasen bedingt ist. Auch kann man feststellen, ob eine Stimulus-abhängige Erhöhung der NO-Produktion tatsächlich durch eine NO-Synthase vermittelt ist. Aus medizinischer Sicht ist z.B. der mögliche Einsatz eines selektiven iNOS Hemmers zur Unterdrückung der iNOS bedingten entzündlichen Reaktionen interessant.

Es gibt eine Reihe von NOS-Hemmern, die sich von ihrer Struktur, ihrer Selektivität und ihrem Angriffspunkt an den NO-Synthasen unterscheiden.

Die am häufigsten eingesetzten NOS-Hemmer sind die L-Argininanaloga wie  $\text{N}^G$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA),  $\text{N}^G$ -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA),  $\text{N}^G$ -Amino-L-Arginin (L-NAA) und  $\text{N}^G$ -Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME). Diese Substanzen verdrängen kompetitiv L-Arginin von seiner Bindungsstelle und inhibieren so die L-Citrullinbildung. Einige dieser Substanzen wie NAA sind sogenannte „Mechanism based inhibitors“ bzw. Suizidinhibitoren. Sie gehen mit der eNOS eine kovalente irreversible Bindung ein und bewirken z.B. durch Reaktion mit der Häm-Gruppe die irreversible Schädigung der eNOS Funktion (Salerno *et al.*, 2002; Alderton *et al.*, 2001).

Andere NOS-Hemmer üben ihre Wirkung aus, indem sie  $\text{BH}_4$  von seiner Bindungsstelle verdrängen (z.B. 7-NI, 4-amino- $\text{BH}_4$ ) oder durch Bindung an Häm die Dimerisierung der eNOS verhindern (z.B. Imidazolderivate) (Alderton *et al.*, 2001). Abgesehen von den erwähnten NOS-Hemmern gibt es noch zahlreiche andere, die in Struktur und Angriffspunkten von den hier erwähnten abweichen (Salerno *et al.*, 2002).

Sowohl für die Forschung als auch für eine mögliche medizinische Anwendung sind NO-Synthasehemmer, die selektiv nur ein Isoenzym blockieren sehr wichtig. Die L-Argininanaloga (L-NNA, L-NMMA, L-NAA, L-NAME) besitzen keine ausgeprägte (>10-fach) Selektivität für die einzelnen NOS-Isoenzyme. Dagegen ist der NOS-Hemmer 1400W ein selektiver iNOS Hemmer (Selektivität iNOS : eNOS >4000, iNOS : nNOS > 32;(Alderton *et al.*, 2001).

### 3 Stickstoffmonoxid

#### 3.1 Chemische Eigenschaften

NO ist unter normalen atmosphärischen Bedingungen ein Gas. Es besitzt ein ungepaartes Elektron und ist deshalb ein reaktives Radikal. Seine biologische Halbwertszeit beträgt zwischen 1-10 Sekunden (Duchstein *et al.*, 1999). In wässrigem Milieu reagiert NO u.a. durch folgende Reaktionen ab:

- mit Sauerstoff unter Oxidation zu  $\text{N}_2\text{O}_3$  und weiter zu Nitrat/Nitrit.
- mit dem Superoxidradikalanion zu dem starkem Oxidationsmittel Peroxynitrit.
- mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat/Nitrit

Auf Grund seiner geringen Größe und elektrischen Neutralität kann NO leicht durch Zellmembranen diffundieren und seine physiologischen Wirkungen in Nachbarzellen ausüben. NO reagiert bevorzugt mit metallhaltigen Proteinen, was sowohl seine physiologischen als auch seine toxischen Eigenschaften erklärt. So reagiert es z.B. mit dem Eisen der Häm-Gruppe der Guanylatcyclase und bewirkt durch Enzymaktivierung eine Erhöhung der cGMP-Bildung. Andererseits legt es, besonders in höheren Konzentrationen (iNOS), durch Bindung an das katalytische Zentrum, die Enzymaktivität vieler lebenswichtiger Enzyme lahm. Außerdem weist NO zu Hämoglobin eine höhere Affinität als  $\text{O}_2$  auf. Dadurch kann die Sauerstofftransportkapazität des Blutes vermindert werden.

Auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit (siehe oben) benötigt NO im Gegensatz zu vielen anderen Botenstoffen keine Enzyme zur Inaktivierung und somit zur Konzentrationsregulierung (Förstermann, 1994).

### 3.2 Detektionsmöglichkeiten von NO

NO ist ein physiologisch äußerst wichtiges Radikal. Sensitive und selektive NO-Detektionsmethoden sind darum von großer Bedeutung, aber auf Grund der chemischen Instabilität von NO auch sehr problematisch. In den letzten Jahren wurden einige Methoden entwickelt, um NO im biologischen Medium quantitativ zu erfassen. Im folgenden sind die wichtigsten bis jetzt entwickelten Methoden aufgeführt:

- Elektrochemische Detektion: NO kann von einer metallischen Elektrode (z.B. Platin) durch einen 1-Elektronentransfer zur Anode zum Nitrosyl-Kation oxidiert werden. Das Detektionslimit dieser elektrochemischen Methode liegt bei ca. 10 nM NO (Tarpey and Fridovich, 2001; Malinski *et al.*, 1996).
- Detektion mittels Chemilumineszenz: Hier gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten. Die erste beruht auf der Oxidation von NO durch zugegebenes Ozon ( $O_3$ ) zum Stickstoffdioxidradikal ( $NO_2$ ). Ein großer Teil des entstandenen  $NO_2$  befindet sich in einem angeregten Zustand und zerfällt spontan unter Lichtemission, welche gemessen werden kann. Das Detektionslimit dieser Methode liegt bei ca. 100 pM NO (Tarpey and Fridovich, 2001). Die zweite Methode der NO-Detektion mittels Chemilumineszenz beruht auf der Reaktion von NO mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). Peroxynitrit, ein äußerst starkes Oxidationsmittel, bewirkt durch Oxidation von Luminol eine Lichtemission. Das Detektionslimit liegt bei ca. 100 fM NO (Kikuchi *et al.*, 1993b; Kikuchi *et al.*, 1993a).
- Detektion mittels Hämoglobinoxidation: NO reagiert mit Oxyhämoglobin ( $HbO_2$ ) zu Methämoglobin (metHb) und Nitrat ( $NO_3^-$ ). Die Bildung von metHb kann photometrisch gemessen werden. Das Detektionslimit beträgt ca. 1 nM NO (Tarpey and Fridovich, 2001).
- Detektion mittels Griess Reaktion: Dieser Assay beruht auf der Reaktion von Nitrit (stabiles Oxidationsprodukt von NO) mit Sulfanilamid und Naphtylethylendiamin. Dabei entsteht ein Azofarbstoff, der photometrisch

vermessen werden kann. Das Detektionslimit beträgt ca. 1  $\mu\text{M}$  NO (Tarpey and Fridovich, 2001).

- Detektion mittels Elektronen-paramagnetischer Resonanzspektroskopie (EPR): Bei dieser Methode wird NO zunächst von N-methyl-D-glucamin-Dithiocarbamat oder von Diethyldithiocarbamat/ Eisen „gefasst“. Von diesen Komplexen kann nach Erstellung des EPR-Spektrums auf die NO-Konzentration in der Lösung geschlossen werden (Komarov *et al.*, 1997; Kleschyov *et al.*, 2000).
- Detektion mittels Fluoreszenzspektroskopie: Diese Methode beruht auf der Reaktion von NO oder einem seiner Oxidationsprodukte mit einer nicht fluoreszierenden zu einer fluoreszierenden Substanz. Beispiele für solche Fluoreszenzfarbstoffe sind 4,5-Diaminofluoreszein (DAF-2) und o-Quinodimethane. Das Detektionslimit beträgt ca. 5 nM NO (DAF-2) bzw. 1 nM NO (o-Quinodimethane) (Kojima *et al.*, 1998a; Paul *et al.*, 1996).

### 3.3 Physiologisch vermittelte Wirkungen

NO vermittelt im Organismus vielfältige Wirkungen. Wichtigstes Zielenzym des durch die nNOS und eNOS freigesetzten NO ist die lösliche Guanylylcyclase (sGC). NO bewirkt ihre Aktivierung, was zu einer gesteigerten Produktion an cGMP führt. cGMP wiederum aktiviert u.a. die Proteinkinase G (PKG), welche durch Phosphorylierung von verschiedenen Zielproteinen z.B. eine Vasodilatation bewirken kann (Forth *et al.*, 2001).

Durch die eNOS gebildetes NO bewirkt eine Relaxation der Blutgefäße, da es über cGMP den Tonus der vaskulären Muskelzellen reduziert. Luminal abgegebenes endotheliales NO bewirkt durch Stimulation der sGC in Thrombozyten eine reduzierte Thrombozytenaggregation und –adhäsion. Darüberhinaus vermindert endotheliales NO die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand und reduziert die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (Forth *et al.*, 2001).

Die nNOS befindet sich im Zentralnervensystem, im vegetativen peripheren Nervensystem und im Darmnervensystem. Die Funktionen von NO im Zentralnervensystem sind noch nicht ganz geklärt. Dagegen ist bekannt, dass die nNOS-haltigen Nervenfasern des Darmplexus die relaxierende Komponente der peristaltischen Welle steuern. Auch kennt man einige Funktionen von NO im peripheren Nervensystem. So wird der Tonus der Blutgefäße u.a. über NO-freisetzende Nervenfasern gesteuert. Außerdem enthalten die Schwellkörper im

Penis viele nNOS-haltige Nervenfasern, wodurch die Erektion gesteuert wird (Forth *et al.*, 2001).

Die iNOS befindet sich vor allem in Immunzellen wie Makrophagen und Granulozyten. Nach Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden oder Cytokinen exprimieren diese Zellen die iNOS. Das durch die iNOS produzierte NO (im Vergleich zur nNOS und eNOS ca. 1000-fach konzentrierter) hat cytotoxische Eigenschaften auf Bakterien, parasitäre Protozoen, Pilze, Würmer und gewissen Tumorzellen. Die Cytotoxizität wird durch Bindung von NO an das katalytische Zentrum (meist an das Eisen im Häm) von lebenswichtigen Enzymen vermittelt. Dies führt zur Enzymblockade (Forth *et al.*, 2001). Allerdings kann die starke iNOS-bedingte NO-Produktion beim Menschen manchmal auch gefährliche Folgen haben. Ein Beispiel ist der septische Schock. Hier kommt es zur Expression der iNOS in der Gefäßwand und die hohe NO-Produktion führt zur massiven Gefäßdilatation und toxischen Effekten auf Gefäßzellen (Forth *et al.*, 2001).

### 3.4 NO-Pharmaka

Wie oben erläutert, besitzt NO im kardiovaskulären Bereich positive Eigenschaften. Diese nutzt man in der Pharmakotherapie durch Gabe von sogenannten NO-Donatoren (Nitrovasodilatoren) aus. NO-Donatoren kann man in zwei Substanzklassen einteilen. Eine Klasse sind organische Nitrit- und Nitratester, wie Glyceroltrinitrat, Isosorbitdinitrat, Isosorbitmononitrat und Pentaerythritoltetranitrat. Aus diesen Substanzen wird über ein noch nicht genau bekannten Weg in der glatten Gefäßmuskulatur enzymatisch NO freigesetzt. Die andere Klasse sind Stickstoffverbindungen, wie Molsidomin und Nitroprussid-Natrium. Diese Verbindungen geben ihr NO nicht enzymatisch ab (Duchstein *et al.*, 1999;Forth *et al.*, 2001).

NO-Donatoren können Koronarspasmen lösen, die Koronararterien dilatieren und vor allem durch Dilatation der großen Hohlvenen eine Verminderung der Vorlast bewirken. Insgesamt verbessern sie das Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot des Herzens. Therapeutisch werden sie deshalb besonders zur Prophylaxe und zur Akut-Therapie des Angina-Pectoris-Anfalls eingesetzt (Forth *et al.*, 2001).

## 4 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

### 4.1 Schlüsselrolle für vaskuläre Homöostase

Auf Grund der vielfältigen Wirkungen von NO reguliert die endotheliale NO-Synthase mittels ihrer NO-Produktion die vaskuläre Homöostase. So ist NO als potenter Vasodilatator aller Blutgefäße ein physiologischer Gegenspieler zu den Vasokonstriktoren des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Systems (Li and Förstermann, 2000).

Zusätzlich zu den vasodilatorischen Eigenschaften beeinflusst das endotheliale NO die Angiogenese und folgende Gefäßbeschaffenheiten: So vermindert endotheliales NO die DNA-Synthese und somit auch die Proliferation von glatten Muskelzellen (Nakaki *et al.*, 1990; Nunokawa and Tanaka, 1992). Außerdem reduziert endotheliales NO die Leukozytenadhäsion ans Endothel und die Leukozytenmigration in die Gefäßwand. Dies wird durch eine verminderte Expression der Oberflächenadhäsionsmoleküle CD11/CD18, P-Selektin, dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und dem intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) vermittelt (Li and Förstermann, 2000). Darüberhinaus reduziert NO die Aufnahme von Lipoproteinen in die Gefäßwand (Cardona-Sanclemente and Born, 1995) und verhindert die Oxidation von dem „low density lipoprotein (LDL) (Li and Förstermann, 2000). Des Weiteren reduziert NO die Plättchenaggregation und Plättchenadhäsion an die Gefäßwand (Radomski *et al.*, 1987; Alheid *et al.*, 1987).

Betrachtet man die vielen Wirkungen von NO im vaskulären System, ist es nicht überraschend, dass viele kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Störung der eNOS bedingten NO-Produktion oder NO-Bioverfügbarkeit in Verbindung stehen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten und Tiere, welche kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Rauchen ausgesetzt sind, eine reduzierte NO-Produktion oder eine verringerte NO-Halbwertszeit aufweisen (Li and Förstermann, 2000).

Eine cholesterinreiche Diät bei Ratten führte beispielsweise zu einer erhöhten Superoxidproduktion und somit zu einer geringeren NO-Bioverfügbarkeit (Ohara *et al.*, 1993; Minor, Jr. *et al.*, 1990). Die erhöhte Superoxidkonzentration wiederum wird verantwortlich gemacht für die bei Hypercholesterinämie beobachtete geringere Konzentration an vollständig reduzierten Biopterin, dem BH<sub>4</sub>. Dies wiederum bewirkt eine geringere eNOS bedingte NO-Produktion und eine erhöhte eNOS bedingte Superoxidproduktion (Wever *et al.*, 1998). Der Einfluss von erhöhten LDL-Konzentrationen auf die eNOS-Expression und eNOS bedingte NO-Bildung wurde in

der Vergangenheit kontrovers diskutiert (Liao et al., 1995; Hirata et al., 1995). Eine Forschergruppe um Olivier Feron konnte 1999 zeigen, dass cholesterinreiches Blut an Endothelzellen eine deutlich reduzierte eNOS Aktivität bewirkt (Feron et al., 1999). Außerdem wurde bei hypercholesterinämischen Ratten und Menschen eine erhöhte Plasmakonzentration des endogenen eNOS Hemmers Dimethyl-L-Arginin nachgewiesen (Li and Förstermann, 2000). Bei diabetischen Tieren und Menschen wurde eine verminderte arterielle Gefäßerweiterung festgestellt (Luscher et al., 1993). Auch bei Patienten mit Bluthochdruck konnte eine verminderte endothelabhängige Gefäßerweiterung festgestellt werden, welche über die eNOS vermittelt sein könnte (Linder et al., 1990).

Die wie oben beschriebenen mit einer defizitären NO-Produktion einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen, veranlassen die Forschung (auch unsere Arbeitsgruppe) nach Substanzen und Wegen zu suchen, welche die endotheliale NO-Produktion und NO-Bioverfügbarkeit erhöhen. Wir suchten insbesondere nach Substanzen, die über transkriptionelle/translationelle Effekte auf die eNOS eine „langanhaltend“ Steigerung der NO-Produktion bewirken.

### 4.2 Regulierung der eNOS

Noch bis Mitte der neunziger Jahre galt die eNOS als konstitutiv exprimiertes und rein  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin reguliertes Enzym (Förstermann, 1994). Mittlerweile wurden verschiedene Faktoren gefunden, welche eine Induktion/Reduktion der eNOS Genexpression bewirken. Außerdem wurden einige  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin unabhängige Wege der eNOS-Aktivierung und –Hemmung entdeckt. Im folgenden werden alle heute bekannten Möglichkeiten der eNOS Regulierung dargestellt. Die folgende Einteilung der eNOS-Regulierung beruht auf den verschiedenen zellulären Ebenen (transkriptionell, posttranskriptionell, translationell, cotranslationell, posttranslationell) auf denen die eNOS reguliert werden kann.

#### 4.2.1 Transkriptionell

Einige Substanzen bewirken eine Erhöhung der eNOS Transkription, indem sie die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre spezifischen eNOS-Promotor-Sequenzen (z.B. Sp1, GATA) erhöhen. Die eNOS Transkription wird u.a. erhöht durch Shear-Stress, Cyclosporin A, Östradiol, Insulin, Phorbol ester, hohe Zellproliferation, Wasserstoffperoxid, Staurosporin und Angiotensin II (Förstermann *et al.*, 1998; Govers and Rabelink, 2001). Allerdings wären die meisten dieser Substanzen für die Indikation Arteriosklerose auf Grund ihrer sonstigen Wirkungen/Nebenwirkungen therapeutisch kaum einsetzbar. Ebenfalls eine Erhöhung der eNOS mRNA-Transkription bewirkt körperliches Training (Delp and

Laughlin, 1997;Woodman et al., 1997;Sessa et al., 1994). Eine Erniedrigung der eNOS Transkription wurde nach Hypoxie festgestellt (Govers and Rabelink, 2001).

### 4.2.2 Posttranskriptionell

Die Halbwertszeit der eNOS mRNA beträgt unter basalen Bedingungen ca. 48 h (Yoshizumi et al., 1993). Stabilisierung der eNOS mRNA führt zu einer erhöhten Halbwertszeit. Destabilisierung der mRNA führt zu einer verringerten Halbwertszeit. Die Proteinexpression wiederum kann über die mRNA-Halbwertszeit reguliert werden. Eine eNOS mRNA Stabilisierung bewirken u.a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), und Wasserstoffperoxid (Govers and Rabelink, 2001). Eine beschleunigte eNOS mRNA Degradation wurde nach Exposition mit Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), und Hypoxie festgestellt (Förstermann *et al.*, 1998;Govers and Rabelink, 2001).

### 4.2.3 Translationell

Die Halbwertszeit des eNOS Proteins beträgt ca. 20 h. Laut Govers et. al. (Govers and Rabelink, 2001) und auch eigenen Recherchen gibt es keine Berichte, dass die eNOS Proteinmenge über die Translation und Proteinhalbwertszeit reguliert werden kann.

### 4.2.4 Co- und Postranslationell

#### 4.2.4.1 Acylierung durch Palmitin und Myristin

Die Translation der eNOS geht einher mit der Myristoylierung an einem Glycinrest ihres NH<sub>2</sub>-terminalen Endes. Die Myristoylierung ist irreversibel (Govers and Rabelink, 2001). Nach der Translation wird die eNOS an zwei Cysteinresten ihres NH<sub>2</sub>-terminalen Endes palmitoyliert. Die Palmitoylierung ist reversibel (Liu et al., 1995).

Sowohl Palmitoylierung als auch Myristoylierung sind Voraussetzung für die Membranassoziation der eNOS. Dies wiederum bringt die eNOS in die Nähe von Calcium und Arginin. Es wurden sowohl Ca<sup>2+</sup>-Kanäle als auch L-Arginintransporter in der Caveolae entdeckt (Govers and Rabelink, 2001). Diese Stoffe sind für die eNOS katalysierte NO-Bildung unabdingbar. In Studien an Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die eNOS nach Modifikation der Bindungsstellen für Myristin und Palmitin kaum noch membranassoziiert in der Zelle vorlag und ihre Aktivität bzw. NO-Produktion deutlich reduziert war (Sakoda *et al.*, 1995;Shaul *et al.*, 1996). Dagegen zeigte die isolierte eNOS *in vitro* nach Depalmitoylierung und Demyristoylierung keine Aktivitätsänderung (Govers and Rabelink, 2001). Dies ist ein



Hinweis, dass die zelluläre Lokalisation, nämlich die durch die Acylierung von Myristin und Palmitin bedingte Membranassoziation, für die eNOS Aktivität entscheidend ist.

### 4.2.4.2 Regulierung durch Protein-Protein Interaktionen

Die eNOS liegt im aktiven Zustand an  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin assoziiert vor. Das Caveolae-Membranprotein Caveolin-1 ist ein direkter Antagonist von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin, der mit  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin um die Bindung an der eNOS konkurriert und die eNOS Aktivität erniedrigt. Die eNOS Aktivität wird deshalb durch das Verhältnis an  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin gebundener und Caveolin-1 gebundener eNOS bestimmt (Govers and Rabelink, 2001; Garcia-Cardena *et al.*, 1997). Calmodulin bindet an die eNOS nur nach Einlagerung von  $\text{Ca}^{2+}$ . Deshalb bewirken  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisierende Substanzen wie Bradykinin, Acetylcholin, Histamin, Östradiol, VEGF, und Calciumionophore (z.B. A23187, Ionomycin) über einen erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt und somit einer verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin/eNOS Assoziation eine erhöhte eNOS Aktivität (Michel *et al.*, 1997; Feron *et al.*, 1998).

Ein anderes Protein welches mit der eNOS interagieren kann ist das Hitze-Schock-Protein 90 (Hsp90). Garcia-Gardena *et al.* konnten zeigen, dass bekannte eNOS Aktivatoren wie VEGF, Histamin und Shear-Stress eine Anlagerung von Hsp90 an die eNOS verursachen. Wurde die Bindung von Hsp90 an die eNOS unterbunden, verminderte sich die eNOS Aktivität und NO-Bildung deutlich (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). Daraus konnte man schließen, dass die Aktivität der eNOS durch Anlagerung von Hsp90 erhöht wird. Andere Forschergruppen postulieren, dass Hsp90 die Verdrängung von Caveolin-1 durch Calmodulin an der eNOS fördert und damit seine Wirkung erzielt (Fulton *et al.*, 2001).

Erst kürzlich wurde das mit der eNOS interagierende Protein NOSIP entdeckt (Dedio *et al.*, 2001). NOSIP bewirkt nach Bindung an die eNOS eine Wanderung der eNOS von der Caveolaemembran zu intrazellulären Kompartimenten. Dies ist verbunden mit einer reduzierten eNOS Aktivität (Fulton *et al.*, 2001)

Ein anderes mit der eNOS interagierendes Protein ist Dynamin-2. Es konnte bewiesen werden, dass in Endothelzellen nach Stimulation mit Calciumionophoren die Bindung von Dynamin-2 an die eNOS erhöht ist. Am isolierten Enzym erhöht Dynamin-2 die eNOS Aktivität. Die physiologische Bedeutung von Dynamin-2 ist aber bis jetzt noch nicht geklärt (Fulton *et al.*, 2001).

Weitere Proteine, die mit der eNOS assoziieren sind u.a. die Proteinkinasen Akt, PKA und PKC. Da diese Proteine ihre Wirkung aber nicht über eine Assoziation an

die eNOS, sondern über Phosphorylierung vermitteln, werden sie im nächsten Punkt (A4.2.4.3) erläutert.

### 4.2.4.3 Regulierung durch Phosphorylierung

In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass die eNOS calciumabhängig und calciumunabhängig über Phosphorylierung reguliert werden kann. Eine Phosphorylierung an Serin 1177 erhöht die Aktivität, während eine Phosphorylierung an Threonin 495 die Aktivität reduziert (Michell *et al.*, 2001). Die (De)phosphorylierungen können über Phosphatasen bzw. Kinasen als Antwort auf diverse Stimuli vermittelt werden.

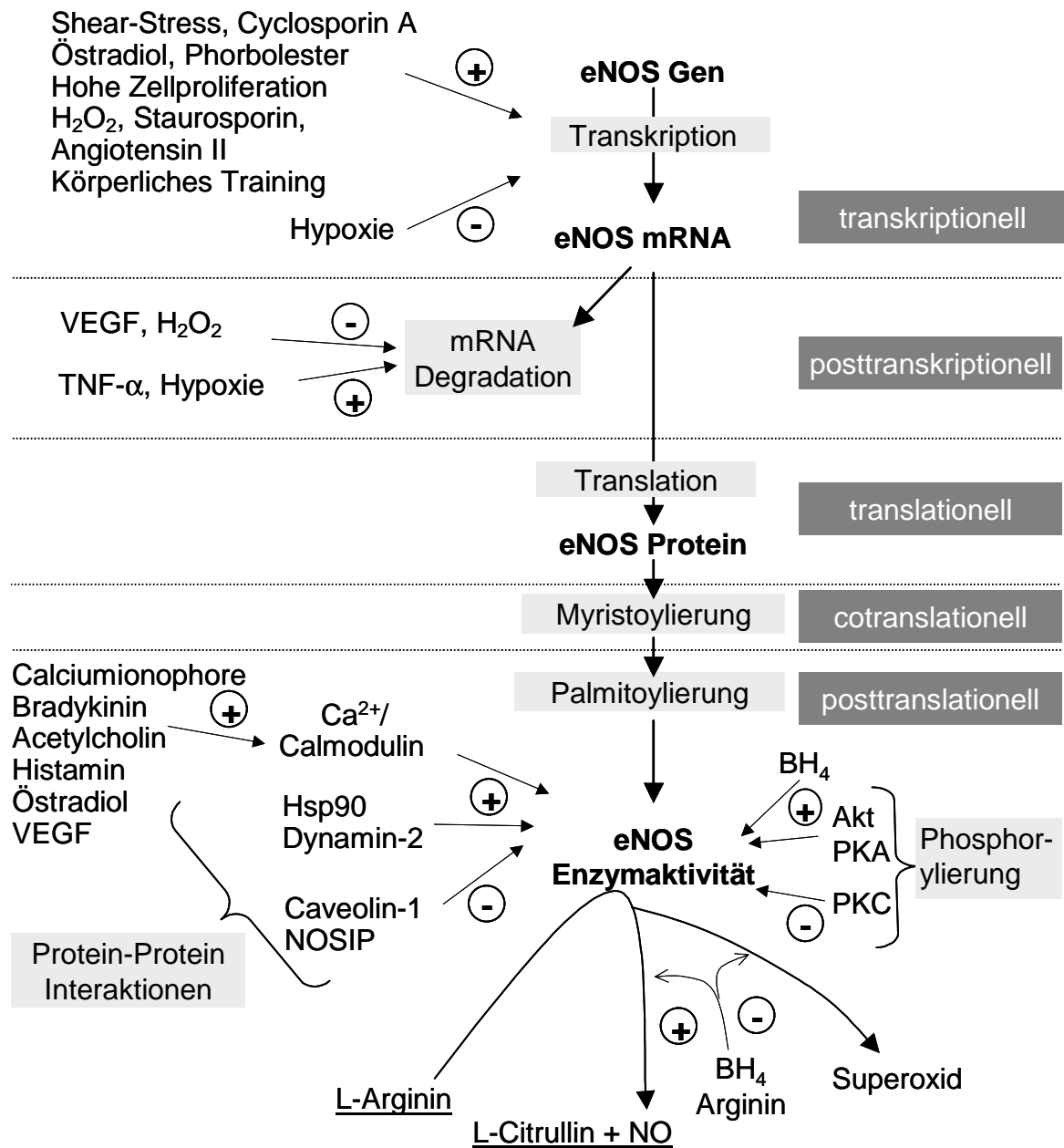
Die Signalkaskade der Proteinkinase A (PKA) erhöht die eNOS Aktivität durch Phosphorylierung von Serin-1177 und über eine Dephosphorylierung von Threonin-495. Die Proteinkinase C (PKC) dagegen bewirkt über ihre Signalkaskade eine eNOS-Aktivitätshemmung, indem Serin-1177 dephosphoryliert und Threonin-495 phosphoryliert wird. Eine Aktivierung über Phosphorylierung an Serin-1177 bewirken außerdem die AMP-aktivierte-Proteinkinase (AMPK) und die Proteinkinase B/Akt (Michell *et al.*, 2001).

Es konnte gezeigt werden dass z.B: VEGF, Insulin und Shear-Stress die eNOS-Aktivität über eine Aktivierung der PI3-Kinase/Serin-Threonin-Kinase-Akt erhöhen (Fleming *et al.*, 2001;Dimmeler *et al.*, 1999;Michell *et al.*, 2001). Eine Inhibition der PI3-Kinase mit Wortmannin blockte den Effekt aus (Govers and Rabelink, 2001). Interessanterweise konnte die durch Shear-Stress bedingte calciumunabhängige Serin-Phosphorylierung durch Thyrosinkinase-Inhibitoren verhindert werden. Dies könnte bedeuten, dass die Thyrosinphosphorylierung eines up-stream von Akt agierenden Proteins für die Akt-Phosphorylierung verantwortlich ist (Corson *et al.*, 1996).

PMA senkt durch Aktivierung der PKC die eNOS Aktivität (Michell *et al.*, 2001). Trotzdem wurde PMA in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet, da in unserem Zellmodell anscheinend der transkriptionelle Effekt (Li *et al.*, 1998) im Vergleich zum posttranslationalen bedeutender ist. Denn PMA bewirkte insgesamt eine erhöhte eNOS bedingte Produktion an L-Citrullin und NO. Auch die Inkubation von Endothelzellen mit NO-Donoren reduziert die eNOS Aktivität durch Phosphorylierung an Serin-495 (Govers and Rabelink, 2001).

### 4.2.4.4 Regulierung durch den Cofaktor BH<sub>4</sub>

Von den Cofaktoren spielt besonders BH<sub>4</sub> eine entscheidende Rolle bei der Regulation der eNOS Aktivität. BH<sub>4</sub> erhöht die eNOS Aktivität. Dies bewirkt BH<sub>4</sub> als Redox-Cofaktor in der Oxygenase Domäne und durch Förderung der Bildung bzw. Stabilisierung des dimeren eNOS-Komplexes (Alderton *et al.*, 2001). Es konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass die Zugabe von BH<sub>4</sub> einen positiven Effekt auf die endotheliale Dysfunktion von z.B. arteriosklerotisch, hypercholesterinämisch geschädigten Arterien hat (Katusic, 2001). Eine Steigerung der eNOS Aktivität, bedingt durch eine intrazelluläre Konzentrationserhöhung der reduzierten Form von Biopterin (BH<sub>4</sub>), konnte z.B. nach Stimulation mit Ascorbinsäure nachgewiesen werden (Huang *et al.*, 2000). Zudem führt eine geringe Konzentration an BH<sub>4</sub> und L-Arginin zu dem in Punkt A2.5 erwähnten „uncoupling“ der eNOS (Rusche *et al.*, 1998).



**Abb. 4: Vereinfachtes Schema der eNOS-Regulation auf den verschiedenen zellulären Ebenen** (Förstermann *et al.*, 1998; Alderton *et al.*, 2001; Fulton *et al.*, 2001; Michell *et al.*, 2001; Govers and Rabelink, 2001).

## 5 Kardiovaskuläre Wirkungen von Drogenextrakten und Naturstoffen

### 5.1 Knoblauch / isolierte Knoblauchinhaltsstoffe

Knoblauch wird seit mehreren tausend Jahren vielfältig medizinisch eingesetzt. Heute liegt sowohl der Schwerpunkt der medizinischen Knoblauch-Anwendung als auch der Knoblauchforschung im kardiovaskulären und chemopräventiven Bereich (Yeh and Liu, 2001). Die Wirkung von Knoblauch auf kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, reduzierte Fibrinolyse, Hyperlipidämie und erhöhte Plättchenaggregation wurde in unzähligen *in vitro* und *in vivo* Experimenten sowie in epidemiologischen Studien am Menschen untersucht (Rahman, 2001). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind höchst unterschiedlich. Obwohl es viele Studien gibt, welche eine positive Wirkung von Knoblauch auf kardiovaskuläre Risikofaktoren und auf Arteriosklerose demonstrieren, ist es bis heute auf Grund der Datenlage nicht möglich, Knoblauch wissenschaftlich eindeutig bewiesen als positiv bei kardiovaskulären Erkrankungen einzustufen.

Auch auf dem Gebiet der Blutdrucksenkung, Gefäßerweiterung und des Einflusses auf NO-Synthasen wurden schon einige Untersuchungen vorgenommen:

So konnte 1995/1996 eine englische Forschergruppe nach Stimulation mit Knoblauchextrakten eine Erhöhung der NOS-Aktivität und NO-Produktion an isolierten Blutplättchen und Plazentagewebe nachweisen (Das *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1996). Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchte 1997 eine andere Gruppe den Einfluss von Knoblauchextrakt bei Ratten, denen durch dauerhafte Gabe des NOS-Hemmers L-NAME eine künstliche Hypertonie gesetzt wurde. Die gleichzeitige Fütterung mit Knoblauchextrakt senkte signifikant den Blutdruck und erhöhte die urinäre  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  Exkretion (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1998).

Sowohl der beschriebene Einfluss von Knoblauchextrakt auf die Blutdrucksenkung als auch der Effekt von Knoblauch auf die NO-Synthasen ließen eine Wirkung von Knoblauch auf die eNOS in Endothelzellen mutmaßen. Die Wirkung des Knoblauchs wird oft den charakteristischen schwefelhaltigen Verbindungen zugeschrieben. Alliin ist Hauptbestandteil der schwefeligen Verbindungen im Knoblauchpulver. Alliin wird in wässrigem Milieu durch das Enzym Alliin-Lyase schnell in Allicin umgewandelt. Allicin wiederum ist einerseits chemisch instabil andererseits wird es in der Leber schnell zu schwefelhaltigen Substanzen metabolisiert (Egen-Schwind *et al.*, 1992).

Die wichtigsten Allicin-Metaboliten und Abbauprodukte sind Diallyldisulfid, Ajoen, Allylmercaptan, S-Allylcystein und weitere Polysulfide (Lawson et al., 1991).

Darum wurde in dieser Arbeit der Einfluss sowohl von Knoblauchextrakten als auch von schwefelhaltigen, isolierten Knoblauchinhaltsstoffen auf die eNOS untersucht.

### 5.2 Weißdorn

Die Verwendung von Extrakten aus Weißdorn zur Behandlung einer leichten Herzinsuffizienz hat in der Volksmedizin eine lange Tradition. Heute ist der erfolgreiche Einsatz von standardisierten Weißdornblüten- und Blätterextrakten (z.B. WS1442, Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe) zur Behandlung der nachlassenden Leistungsfähigkeit des Herzens entsprechend dem Stadium II der *New York Heart Association* durch mehrere Doppelblindstudien medizinisch eindeutig bewiesen (Weigl et al., 1996; Zapfe, 2001). Als wichtigste Wirkmechanismen wurden neben einer positiv inotropen Wirkung, einer Verlängerung der Refraktärphase auch die Steigerung der koronaren Durchblutung beschrieben (Siegel, G., 1996, *Phytotherapie Res.* 10, S.195). So zeigten unabhängig zwei Forschergruppen, dass Weißdornextrakt bzw. ein Procyanidin-angereicherter Extrakt aus Weißdorn im Modell des mit Phenylephrin kontrahierten Rattenaortenrings eine endothelabhängige, signifikante Dilatation und cGMP-Erhöhung bewirken (Chen et al., 1998; Kim et al., 2000). Diese Dilatation und cGMP-Erhöhung setzten schon wenigen Minuten nach Zugabe des Weißdornextraktes ein und konnten durch Zugabe des NOS-Hemmers N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin ausgeblockt werden. In einer weiteren Arbeit (Koch and Chatterjee, 2000) wurde der kurzfristige Einfluss von WS1442 (5 µg/ml) auf den Koronarfluss in einem Perfusionssystem der Versuchsapparatur nach Langendorf untersucht. WS1442 bewirkte eine signifikante Erhöhung des Koronarflusses, welche nach Zugabe von N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginin (NOS-Hemmer) und ODQ (Hemmer der löslichen Guanylatcyclase) unterdrückt werden konnte.

Alles in allem ließ die bisherige Datenlage über den Einfluss von Weißdornextrakten auf Koronargefäße eine Involvierung der eNOS vermuten. Darum wurde in dieser Arbeit die kurzfristige und langfristige Wirkung von WS1442 auf die eNOS in Endothelzellen untersucht.

### 5.3 Phytoöstrogene aus der Sojabohne

Zahlreiche epidemiologische Studien und Publikationen der letzten Jahre untermauern, dass Östrogene, v.a. 17-β-Estradiol die Entwicklung von kardiovaskulären Krankheiten verhindern bzw. verzögern können (Gray et al., 2001). Auch für Phytoöstrogene, Pflanzeninhaltsstoffe mit Bindungsaffinitäten zu den

Östrogenrezeptoren, konnten in zahlreichen Arbeiten und epidemiologischen Studien positive kardiovaskuläre Effekte gezeigt werden. Vor allem Vertreter aus der Substanzklasse der Isoflavone (z.B. Genistein, Daidzein, Biochanin A, Equol, Formononetin), welche besonders in der Sojabohne vorkommen, scheinen einige positive kardiovaskuläre Wirkungen auszuüben. So konnte an Affen nach längerer isoflavonreicher Soja-Fütterung eine signifikante Reduktion der Arterioskleroseentwicklung nachgewiesen werden. Diese ist wahrscheinlich bedingt durch Reduktion der Plasmalipidkonzentration und Gefäßmuskelzellproliferation, geringerer Plättchenaggregation und einer erhöhten Gefäßreaktivität (Anthony *et al.*, 1998). Zudem konnte in epidemiologischen Studien nachgewiesen werden, dass die Arterioskleroserate in Ländern, in denen die Nahrung sehr viel Soja enthält (z.B. Japan), deutlich niedriger als in anderen ist (Barnes, 1998). Auch wurden durch Isoflavone bedingte akute Vasodilatationen im Modell des isolierten Rattenaortenrings (Mishra *et al.*, 2000) und in einem Experiment am menschlichen Unterarm (Walker *et al.*, 2001) gezeigt. Die Vasodilatationen konnten jeweils durch einen NOS-Hemmer unterdrückt werden.

In Anbetracht obiger Daten und auch des mehrfach beschriebenen Einflusses von 17- $\beta$ -Estradiol auf die eNOS (Goetz *et al.*, 1999;Caulin-Glaser *et al.*, 1997) wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Soja-Isoflavone auf die eNOS in Endothelzellen untersucht.

### 5.4 Grüner Tee / isolierte Epicatechinderivate

Grüner Tee wurde besonders in den letzten Jahren zu einem Modegetränk, wobei ihm zahlreiche gesundheitsfördernde Wirkungen nachgesagt werden. Epidemiologische Studien und wissenschaftliche Publikationen weisen vor allem auf mögliche positive Effekte des grünen Tees bei der Vorbeugung gegen Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen hin (Yang, 1999;Riemersma *et al.*, 2001). Jedoch konnten positive kardiovaskuläre *in vitro*- und Tiermodelleffekte, wie Reduktion der LDL-Lipidperoxidation, nicht in Studien am Menschen belegt werden. Einige Publikationen zeigen, dass Epicatechinderivate (z.B. Epigallocatechin-3-gallat, Epigallocatechin-3-gallat) des grünen Tees mit Phenylephrin kontrahierte Rattenaortenringe dilatieren können (Huang *et al.*, 1998;Chen *et al.*, 1998). Dieser Effekt korrelierte mit einer erhöhten cGMP Menge und konnte durch gleichzeitige Gabe eines eNOS-Hemmers unterdrückt werden.

In dieser Arbeit sollte nun an Endothelzellen untersucht werden, ob mögliche kardiovaskuläre Effekte von Epigallocatechin-3-gallat und Epicatechin-3-gallat über eine Beeinflussung der eNOS vermittelt sein könnten.

### 5.5 Rotwein / isolierte Rotweinpolyphenole

Mehrere epidemiologische Studien kamen zum Ergebnis, dass in einigen Regionen Frankreichs trotz einer fettreichen Nahrungsaufnahme, wenig Bewegung und starken Zigarettenkonsum die Häufigkeit an koronaren Herzkrankheiten deutlich geringer ist als in anderen westlichen Ländern wie z.B. England (Renaud and de Lorgeril, 1992). Diese Beobachtungen führten zum Begriff des „French Paradox“. Als eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wurde die höhere Aufnahme von Rotwein sowie von anderer polyphenolreicher Nahrung (z.B. Obst, Gemüse) in Frankreich in Erwägung gezogen. Um die genauen Mechanismen dieser möglichen positiven kardiovaskulären Eigenschaften des Rotweins und seiner Polyphenole aufzuklären, wurden vor allem in den letzten Jahren zahlreiche *in vivo* Studien und *in vitro* Experimente durchgeführt.

Ein Schwerpunkt dieser Studien war der Einfluss von Rotwein und seiner Polyphenole auf die Gefäßerweiterung und die endotheliale NO-Bildung. So zeigte eine Gruppe um den Franzosen Jean Stoclet in mehreren Arbeiten am Modell des mit Phenylephrin kontrahierten Rattenaortenrings, dass kurzzeitige Gabe von Rotweinpolyphenolextrakt (RWPE) und isolierten Rotweinpolyphenolen eine deutliche Dilatation, sowie eine Erhöhung an NO und cGMP bewirken (Stoclet, 2001). All diese Effekte ließen sich mit NOS-Hemmern unterdrücken. Eine andere Gruppe untersuchte erst kürzlich (März 2002) den Effekt von RWPE an Ratten, welche durch permanente Gabe des NOS-Hemmers L-NAME NO-defizitär und arteriosklerotisch geschädigt waren. RWPE konnte nach mehrwöchiger Fütterung den Blutdruck der Ratten signifikant senken und die NO-Synthase Aktivität in Aortenhomogenaten signifikant erhöhen (Bernatova, I *et al.*, 2002). Des weiteren zeigte im Jahr 2001 eine Gruppe, dass Wein, Traubensaft und einige Flavonoide im Menschen unter anderem die Blutplättchenaggregation erniedrigen und die NO-Produktion in Blutplättchen erhöhen (Freedman *et al.*, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es nun herauszufinden, ob RWPE nicht nur wie von Stoclet gezeigt kurzfristig die endotheliale Produktion von NO und cGMP erhöhen kann, sondern auch einen langfristigen Effekt auf die eNOS hat. Außerdem war es von Interesse, ob ein Effekt von RWPE nicht nur unter „pathologischen Bedingungen“ (z.B. kontrahierte Aortenringe, NO-defizitäre und arteriosklerotische Mäuse), sondern auch an völlig intakten Endothelzellen festzustellen ist. Eine Steigerung der NO-Produktion intakter, „gesunder“ Endothelzellen könnte präventiv vor Arteriosklerose schützen.



### 5.6 Sonstige Beeren und Früchte mit roten Farbstoffen

Für die rötlich-blaue Farbe vieler Früchte und Trauben, wie z.B. Holunderbeeren, Johannisbeeren, Himbeeren sind zum Großteil farbige Anthocyanine verantwortlich. Es gibt einige wissenschaftliche Arbeiten, die für gewisse Anthocyanine eine Vasodilatation im mit Phenylephrin kontrahierten Aortenring zeigen (Andriambeloso *et al.*, 1998; Stoclet *et al.*, 1999). Darum wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Anthocyanine-enthaltenen Fruchtexttrakten auf die eNOS in Endothelzellen untersucht.

## B. Material und angewandte Methoden

---

### 1 Eukaryontische Zellen, Bakterien, Plasmide

#### 1.1 Zellkultur

##### 1.1.1 Nährmedien und Zusätze

Als Zellkulturmedien wurden carbonatgepufferte Fertigmedien verwendet. Eingesetzt wurden die folgenden Medien:

- DMEM (Dulbecco`s Modified Essential Medium) ohne Phenolrot (Bio Whittaker, Europa)
- ECGM (Endothelial Cell Groth Medium, Promo Cell®, Europa)

DMEM wurde für die beiden Zelllinien ECV304 und EA.hy926 verwendet, ECGM für die HUVEC-Primärkulturen.

Dem DMEM wurden Wachstumsfaktoren, Hormone, ect. kurz vor Gebrauch in Form von 10% hitzeinaktivierten endotoxinarmen fötalen Kälberserum (FKS) zugesetzt (Gibco/BRL, Life Technologies). FKS enthält u.a. auch Östrogene, welche die eNOS hochregulieren (Kleinert *et al.*, 1998). Um Östrogene aus dem FKS größtenteils zu entfernen, wurde es mit Aktivkohle behandelt. Dabei wurden zu je 100 ml FKS 2 g Aktivkohle gegeben und 18 h bei 4°C gerührt, dann die Mischung zentrifugiert (5 min , 3000 x g), der FKS-Überstand noch mal in einer Ultra-Zentrifuge zentrifugiert (60 min, 10000 rpm) und abschließend sterilfiltriert.

Es wurde Phenolrot-freies Medium verwendet, da für Phenolrot eine östrogenartige Wirkung beschrieben wurde, die die eNOS beeinflussen würde (Kleinert *et al.*, 1998). DMEM enthielt aus Stabilitätsgründen kein L-Glutamin, welches erst kurz vor Gebrauch aus einer bei -20°C gelagerten Stocklösung in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt wurde. Um trotz sorgfältigem sterilen Arbeiten eventuellen bakteriellen Kontaminationen vorzubeugen, wurden dem DMEM die Antibiotika Benzylpenicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 U/ml) zugesetzt (Pan Biotech, Deutschland).

Dem DMEM für ECV304-Zellen wurde ca. bei jedem zweiten Passagieren 1 mg/ml G418 (Sigma , Deisenhofen, Deutschland), dem für die EA.hy926 Zellen dauerhaft

HAT (100  $\mu$ M Hypoxanthin, 0,4  $\mu$ M Aminopterin, 16  $\mu$ M Thymidin, Sigma) zugesetzt. Eine genaue Erläuterung zu diesen Zusätzen folgt bei dem jeweiligen Zelltyp.

Dem ECGM-Medium für die HUVEC-Primärkulturen wurde der Supplement Mix C-39215 (Promo Cell®, Europa) zugesetzt.

### 1.1.2 Lösungen

Alle in der Zellkultur verwendeten Lösungen wurden der Sterilisation unterzogen. Dies geschah entweder durch Sterilfiltration (Disposable filter, 0,2  $\mu$ m, Peske, bzw bei volumenmäßig größeren Lösungen: Steritop™, 0,2  $\mu$ m Millipore) oder durch autoklavieren mit gespanntem Wasserdampf (2 bar /121 °C/15 min) in einem Autoklaven (Vakulab S 3000, Münchener Medizin Mechanik GmbH).

#### **PBS**

Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurde zum Waschen und Ernten der Zellen und zum Ansetzen verschiedener Lösungen verwendet. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7.4 wurde die Lösung in gespanntem Wasserdampf autoklaviert.

Zusammensetzung:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.43 g
NaCl	7.20 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### **Trypsin/ EDTA**

Die Trypsin/ EDTA-Lösung wurde benötigt, um die verwendeten adhärenen Zellen abzulösen. Dafür wurden in die 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen 4 ml der Lösung auf die PBS-gewaschenen Zellen gegeben. Die Lösung wurde ca. 5 min auf den Zellen gelassen, dann die Zellen durch Umschwenken oder leichtes Klopfen abgelöst und Medium zugegeben. Nach der Herstellung wurde die Lösung stets sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Zusammensetzung:

Trypsin(1:250)	0,05 g
EDTA	0.2 g
PBS	ad 100 ml

### 1.1.3 Kultivierung

#### **Inkubationsbedingungen**

Die Zellen wurden bei 37°C in einem Inkubator der Firma Heraeus bei 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle verwendeten Zellen wuchsen in adhärennten Monolayer-Kulturen in Polystyrol-Gefäßen. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturgefäßen mit 75 cm<sup>2</sup> oder 150 cm<sup>2</sup> Grundfläche, bzw. in 6-, 12- oder 24-Lochplatten der Firma PESKE (Deutschland).

#### **Passagieren**

Die Zelllinien (EA.hy926 und ECV304) wurden nach Erreichen des konfluenten Zustandes passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, dann Trypsin/EDTA-Lösung (B1.1.2) draufgegeben und ca. 5 min auf den Zellen belassen. Diese Lösung bewirkt durch partiellen Verdau der Zellmembran das Ablösen der Zellen. Durch Zusatz von Medium wird das Trypsin inaktiviert und die Zellen 1:7 - 1:15 in frischen Kulturgefäßen weitergezogen. Die zugegebene Mediummenge betrug bei 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ca. 35 ml, wobei das Medium am nächsten oder übernächsten Tag gewechselt wurde.

Da es sich bei den verwendeten Zelllinien um immortalisierte Zellen handelt, wäre grundsätzlich ein endloses Weiterpassagieren der Zellen möglich. Weil sich mit der Passagezahl jedoch die Gefahr von Mutationen und Selektionen erhöht, wurden die Zellen maximal bis zur 25. Passage verwendet. Danach wurden wieder frische Zellen aus dem Gefrierstock hochgezogen.

#### **Zählen der Zellen nach Fuchs-Rosenthal**

Um standardisierte Zellbedingungen für die Experimente zu gewährleisten, wurden stets gleiche Mengen an Zellen ausgesät. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal Methode. Dabei wurde ca. 50 µl Zellsuspension in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer gegeben, die Zellen in allen 16 Quadraten gezählt und der Mittelwert für die Berechnung verwendet. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension lässt sich aus dem Volumen eines Quadrates der Zählkammer berechnen.

#### **Einfrieren von Zellen**

Zur Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Um zu vermeiden, dass die Zellen beim Einfrieren platzen, wurde dem Medium 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Das Einfriermedium wurde nach der Herstellung sterilfiltriert.

Einfriermedium:

DMSO	5 ml
FKS	5 ml
Medium	40 ml

Die durch Trypsin/EDTA abgelösten Zellen wurden zentrifugiert und in Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und zur Vermeidung von zu schnellem Abkühlen zunächst ca. 2 Tage bei -20°C eingefroren und danach in flüssigen Stickstoff gelagert.

### **Auftauen von Zellen**

Die Zellen in den Kryoröhrchen wurden mit 37°C warmen Medium aufgetaut und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen sowie das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen.

#### 1.1.4 HUVEC-Primärkulturen

Die Gewinnung der HUVEC-Primärkulturen wurde von Herrn H. P. Keiss und Frau B. Weiss (beide Zentrum für Pharmaforschung München) in Anlehnung an die in einer Publikation von Sohn HY. beschriebene Methode durchgeführt (Sohn et al., 2000). Bei dieser Methode werden venöse Endothelzellen aus einer Nabelschnur isoliert. Dabei wird die Nabelschnurvene mit einer Collagenase-Lösung gefüllt, welche die Endothelzellen ablöst. Anschließend wird die Lösung mit den Endothelzellen aufgefangen, zentrifugiert, dann werden zum Endothelzellpellet HUVEC-Medium gegeben und die Zellen in einer Zellkulturflasche kultiviert.

#### 1.1.5 Eukaryontische Zelllinien

##### 1.1.5.1 EA.hy926 Zellen

Die verwendete Endothelzelllinie EA.hy926 stammt von Dr. C. J.-S. Edgell (Universität in North Carolina, USA). Die Zelllinie wurde hergestellt durch Verschmelzung von menschlichen venösen Nabelschnurendothelzellen mit Zellen der permanenten menschlichen Zelllinie A549 (Edgell et al., 1983). Die Zellen wurden in Antibiotika-haltigem DMEM ohne Phenolrot kultiviert. Um die hybridisierten Zellen zu selektionieren wurde dem Medium stets HAT zugegeben (B1.1.1).

##### 1.1.5.2 ECV304 Zellen

Die Zelllinie wurde durch spontane Transformation von menschlichen venösen Nabelschnurendothelzellen hergestellt (Takahashi et al., 1990). Die hier verwendeten ECV304 Zellen sind mit einem pGL3-neo Plasmid (Promega) stabil

transfiziert, welchem ein 3.5 kb Fragment des menschlichen eNOS-Promotors mit darauffolgendem Luciferasegen eingebaut wurde (B4.1.1). Diese Zellen wurden uns von Dr. H. Kleinert (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt (Li *et al.*, 1998). Durch Zugabe von G418 (1 mg/ml) können die stabil transfizierten Zellen selektioniert werden.

### 1.2 Bakterien

#### 1.2.1 Eingesetzter Stamm

Als Wirtsorganismus für die Vektoren zur Amplifikation von Northern Blot Proben wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 $\alpha$  der Firma Gibco/BRL Life Technologies verwendet.

#### 1.2.2 Nährmedien und Antibiotika

Die Bakterien wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 mit NaOH wurde das Medium autoklaviert.

Zusammensetzung:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Um die Bakterien zu selektionieren, welche ein Plasmid mit  $\beta$ -Lactamasegen ( $\approx$ Ampicillinresistenzgen) aufgenommen haben, wurde dem Medium Ampicillin-Na zugesetzt. Dadurch können die Bakterien mit Plasmid bzw. mit  $\beta$ -Lactamase den  $\beta$ -Lactamring des Ampicillins spalten und somit die bakterizide Eigenschaft des Ampicillins zerstören.

Die Bakterienselektion wurde auf Agar-Platten durchgeführt. Zur Herstellung des Agars wurden dem obigen (LB)-Medium 15 g/l Agar zugesetzt und dann autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt und erst dann das hitzeempfindliche Ampicillin-Na aus einer 70% Ethanollösung in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugesetzt. Das noch flüssige Medium wurde in 85 mm Petrischalen gegossen und auf RT abgekühlt, damit der Agar fest wird. Gelagert wurden die Platten bei 4°C.

### 1.2.3 Kultivierung

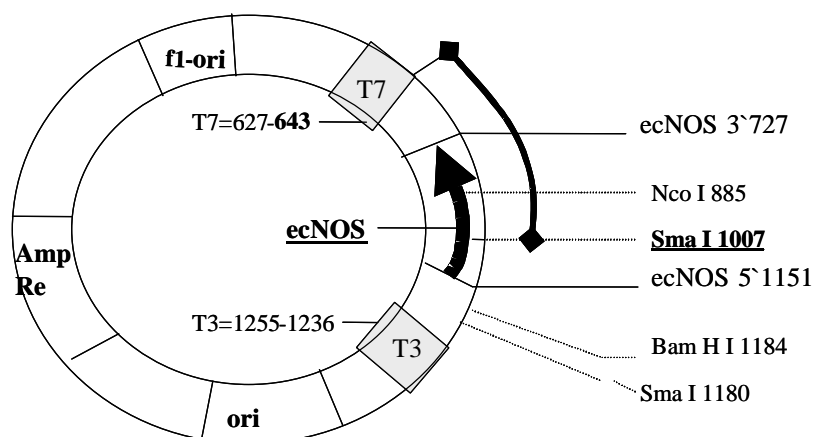
Die *E. coli* wurden aerob bei 37°C in 300 ml Erlenmeyerkolben auf einem Bakterenschüttler (200 rpm) in einem Inkubator (Unihood 500, Uni Equip) kultiviert. Zur Lagerung wurden die Bakterien in logarithmischer Wachstumsphase 5:1 mit Dimethylsulfoxid versetzt und bei -80°C eingefroren.

## 1.3 Vektoren

### 1.3.1 Verwendete Plasmide

Zur *in vitro* Transkription, mit der aus cDNA  $\alpha^{32}\text{P}$ -markierte cRNA-Proben zum Einsatz im Northern Blot hergestellt wurden, wurden verschiedene Plasmide verwendet, die neben einer  $\beta$ -Lactamase kodierenden Region über RNA-Polymerase-Promotoren (T3, T7) und über eine Multiple Klonierungsregion (MKR) verfügen. Innerhalb dieser MKR können Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und den benötigten cRNA-Sonden komplementäre cDNA-Proben eingebaut werden (siehe Plasmidskizze unten). Die im folgenden aufgeführten Plasmide wurden uns von Dr. H. Kleinert (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt:

- pCR\_ecNOS\_Human: 3422 Basenpaare (bp)
- pCR- $\beta$ -Aktin-Hum\_del\_BstEIII/Hind III: 3062 bp



**Abb. 5: Skizze des Plasmids: pCR\_ecNOS\_Human: 3422 Basenpaare (bp);** Transkription mit T7 Polymerase; RNA-Restriktion mit Sma I; RNA-Probe 364 Nukleotide (nt), davon entsprechen 280 nt der eNOS RNA.

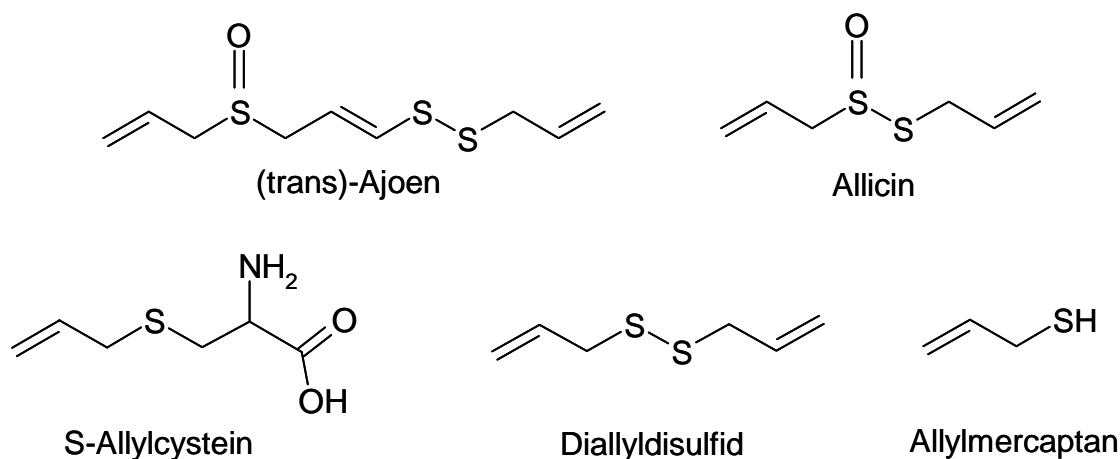
## 2 Verwendete Drogenextrakte und Naturstoffe

### 2.1 Knoblauchpulver/extrakt

Chinesisches Knoblauchpulver (LI 111, z.B. in Kwai® enthalten, Lichtwer-Pharma, Berlin) wurde in Wasser suspendiert (1 ml/g Knoblauchpulver) und 30 min im Ultraschallbad gelöst. Danach wurde zentrifugiert (5 min, 3000 x g) und der Überstand als Knoblauchextrakt verwendet.

### 2.2 Isolierte Knoblauchextraktinhaltsstoffe

Ajoen wurde uns von Prof. Dr. K. G. Wagner (GBF, Braunschweig) und S-Allylcystein von der Firma Wakanuga of Amerika (Californien, USA) zur Verfügung gestellt. Die übrigen verwendeten schwefelhaltigen Knoblauchextraktinhaltsstoffe wurden alle von der Firma Fluka (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Alle Substanzen wurden in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.

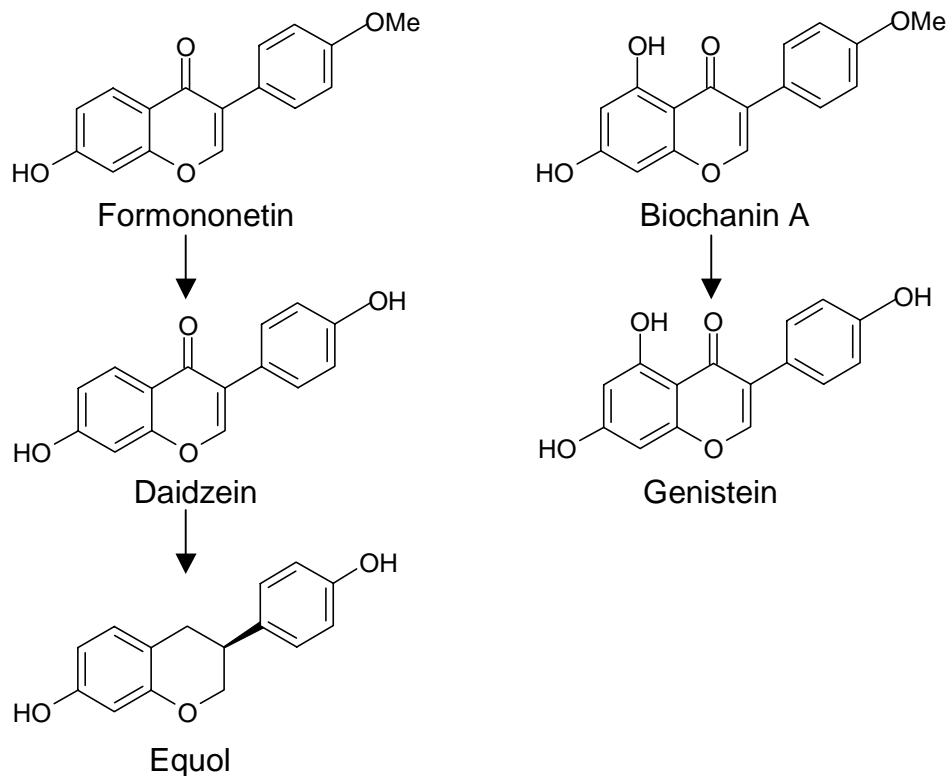


**Abb. 6: Strukturformeln von schwefelhaltigen Knoblauchextraktinhaltsstoffen**

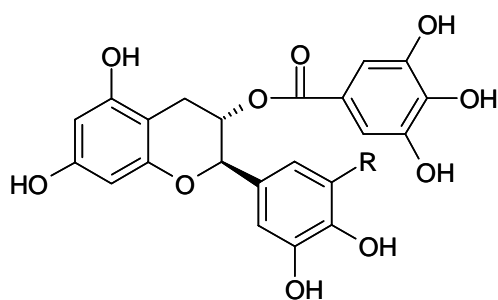
### 2.3 Weißdornblüten- und Blätterextrakt (WS1442)

Der Weißdornblüten- und Blätterextrakt WS1442 wurde von der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Es handelt sich um einen Extrakt, dessen Gewinnung auf standardisierten Anbaubedingungen und Herstellungsverfahren beruht und dessen Gehalt an oligomeren Procyanidinen auf mindestens 18,75 % (berechnet als Epicatechin) standardisiert ist. Das Auszugsmittel ist Ethanol 45 % (m/m) und das Droge-Extraktverhältnis 4-6,6:1. WS1442 ist in den Handelspräparaten Crataegutt® 80, Crataegutt® novo 450 und Crataegutt® forte enthalten. Der Extrakt wurde in DMSO gelöst und bei -20°C gelagert.





**Abb. 7: Struktur und Metabolismus von Soja-Isoflavonen**



R=H: Epicatechin-3-gallat (ECG)

R=OH: Epigallocatechin-3-gallat (EGC)

**Abb. 8: Strukturformeln der Catechingerbstoffe ECG und EGC**

## 2.4 Isolierte Isoflavone der Sojabohne

Die getesteten Isoflavone aus der Sojabohne wurden alle von der Firma Fluka gekauft. Alle Substanzen wurden in DMSO gelöst. Abb. 7 zeigt die Strukturformeln der verwendeten Isoflavone sowie den Metabolismus von Formononetin und Biochanin A.

## 2.5 Isolierte Catechingerbstoffe des grünen Tees

Die beiden verwendeten Catechingerbstoffe des grünen Tees Epicatechin-3-gallat (ECG) und Epigallocatechin-3-gallat (EGC) wurden von der Firma Fluka bezogen und in Wasser gelöst.

## 2.6 Pure Rotweine

Die Rotweine wurden meist von Münchner Weinhändlern bezogen, wobei die Flaschen zum Teil unmittelbar vor Verwendung für die Experimente geöffnet wurden, zum Teil aber auch schon länger geöffnet waren. Die Proben wurden im Falle einer mehrmaligen Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Wein-NR.	Weinname	Jahr-gang	Land	Traube/ Weinlagerung / Sonstiges
1	Château Cabriere	1998	Frankreich	Chateauneuf-Du-Pape
9	Domaine De Villemajou	1999	Frankreich	
10	Chateau Bonnet Bordeaux	1998	Frankreich	Bordeaux-Wein /Stahlfass
11	Palacio de la Vega	1998	Spanien	3 Jahre Eichenfasslagerung 100% Cabernet Sauvignon
12	Chateau Saint Auriol	1998	Frankreich	
13	Pouilly-Fumé	2000	Frankreich	Loire, Weißwein
14	Montes	1998	Chile	100% Cabernet Sauvignon
15	Dogajolo Toscano	1999	Italien	
16	Domaine du Bosc	1999	Frankreich	Aus vulkanischem Gebiet
17	Chateau Bonnet Bordeaux	1999	Frankreich	Bordeaux –Wein / Stahlfass

18	Château du Bois Meney	1999	Frankreich	Bordeaux-Wein
19	Château Saint Esteve D'uchaux	2000	Frankreich	Cote du Rhone
20	Diego de Almagro	1993	Spanien	7 Jahre Eichenfasslagerung
21	Chateau Laville Eximius	1998	Frankreich	100% Merlot
22	Château Lamothe Bergeron	1998	Frankreich	34% Merlot, 52% Cabernet Sauvignon, 14% Cabernet Franc
23	Château du Moulin Noir	1998	Frankreich	60% Merlot, 10% Cabernet Sauvignon, 30% Cabernet Franc
24	Château Thieuley	1998	Frankreich	90% Merlot, 10% Cabernet Franc
25	Hauswappen	1998	Südtirol	
26	Dornfelder Rotwein trocken	1997	Deutschland /Pfalz	Eichenfasslagerung
27	Château Cabriere	1997	Frankreich	Chateauneuf-Du-Pape
28	Moulin de Gassac	2000	Frankreich	100% Syrah
29	Merlot Grenache	1999	Frankreich	100% Merlot
30	Hacienda	1998	USA/ Kalifornien	100% Cabernet Sauvignon
31	Dornfelder	2000	Deutschland/ Rheinhessen	Stahlfasslagerung
32	Dornfelder	2000	Deutschland/ Rheinhessen	Holzfasslagerung
33	Dornfelder	2000	Deutschland/ Rheinhessen	Eichenfasslagerung

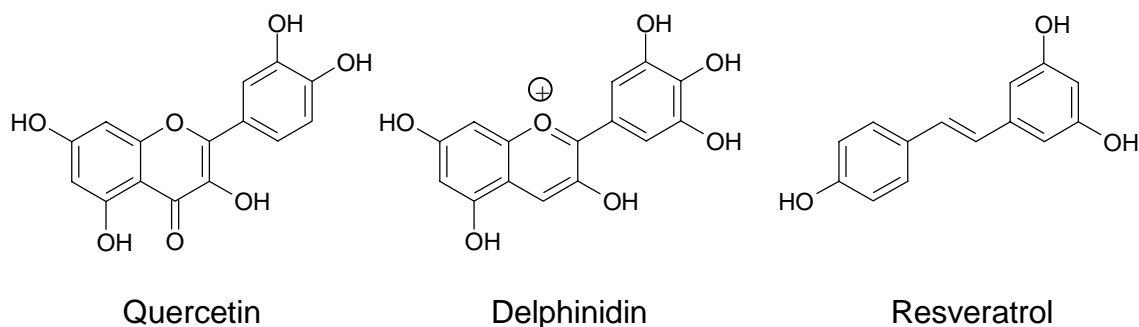
## 2.7 Rotweinpolyphenolextrakt (RWPE)

Der Rotweinpolyphenolextrakt (RWPE) wurde uns von Frau Prof. Veronique Cheynier (INRA-UMR Sciences pour l'Oenologie, Montpellier, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung wurde von der Arbeitsgruppe Cheynier in *Carcinogenesis* publiziert (Caderni *et al.*, 2000). Dabei wurde ein französischer Rotwein der Traube Cabernet Sauvignon zunächst erwärmt, um den Ethanol zu

verdampfen und dann die verbleibende Lösung auf eine Vinyl-Divinyl-Benzol-Säule ( $\approx$ Polystyrolsäule) gegeben. Eine erste Spülung mit Wasser eluierte die polaren Weinbestandteile (Zucker, organische Säuren) und aus der anschließenden Elution mit 90 % Ethanol (v/v) wurde der RWPE gewonnen. Die Extraktzusammensetzung wurde wie beschrieben (Fulcrand et al., 1999) von Prof. Cheynier mittels HPLC-Analyse bestimmt. Der Extrakt enthält unter anderem: 4,4 % Anthocyanine 0,8 % Flavonole, 2,0 % Phenolsäuren, 1,4 % Catechin, 1,0 % Epicatechin und 28 % Proanthocyanidineinheiten (bestehend aus 18 % Epigallocatechin, 13,2 % Catechin, 65 % Epicatechin und 3,8 % Epicatechingallat; der mittlere Polymerisierungsgrad beträgt 6,8). Ungefähr die Hälfte der phenolischen Verbindungen im RWPE bildete sich während der Weinherstellung und der Weinlagerung aus genuinen phenolischen Verbindungen der Traube. Aus 1l Rotwein wurden 3 g RWPE gewonnen.

### 2.8 Isolierte Rotweinpolyphenole

Die verwendeten isolierten Inhaltsstoffe Quercetin, Delphinidin und trans-Resveratrol wurden von der Firma Fluka gekauft. Gelöst wurden sie alle in DMSO.



**Abb. 9: Strukturformeln von Rotweinpolyphenolen**

### 2.9 Eichenrindenfluidextrakt

Der Eichenrindenfluidextrakt wurde durch Mazeration von Eichenrinde (*Cortex frangulae*, Caelo) hergestellt. Dazu wurde Eichenrindenpulver 1:5 mit Ethanol 20 % (v/v) in einem Erlenmeyerkolben auf einen Schüttler gestellt und bei Raumtemperatur 20 h leicht geschüttelt. Durch Filtrieren der Suspension wurde der Eichenrindenfluidextrakt erhalten.

### 2.10 Beeren- und Früchtepolyphenolextrakte

Ausgangsmaterial für die Polyphenolextrakte waren jeweils im Lebensmittelhandel erhältliche 100% Presssäfte (Muttersaft) aus erntefrischen Beeren. Alle im folgenden aufgeführten Säfte wurden von der Firma EDEN (Hünfeld, Deutschland) hergestellt: Holundersaft, Schwarzer Johannisbeersaft, Heidelbeersaft, Himbeersaft, Roter Johannisbeersaft, Brombeersaft und Sauerkirschsaff. Der verwendete Preiselbeersaft (100 % Presssaft) ist von der Firma Voelkel (Höhbeck, Deutschland) Die Gewinnung der Vorlauffraktion (VF) und der Polyphenolfraktion (PPF) wurde von Herrn Dr. R. Samtleben (Zentrum für Pharmaforschung München) durchgeführt und erfolgte genau wie bei den Rotweinen (B2.11)

### 2.11 Herstellung der VF und PPF aus purem Rotwein und Fruchtsäften

Die Herstellung der VF und PPF aus purem Rotwein und Fruchtsäften wurde von Herrn Dr. R. Samtleben durchgeführt. Die Herstellungsmethode erfolgte in Anlehnung an die von Caderni G. et. al. publizierte Methode (Caderni *et al.*, 2000), welche in B2.7 schon beschrieben wurde. Folgende Veränderungen der Methode wurden von Herrn Dr. Samtleben vorgenommen: Die Weine wurden ohne vorheriges Abdampfen des Ethanol direkt auf eine Polystyrolsäule (Diaion®, Sulpeco, USA) gegeben, welche nach Herstellerangaben befüllt wurde. Mit Wasser wurde solange eluiert, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm wieder annähernd basale Werte hatte. Dieses Wassereluat ist die Vorlauffraktion (VF). Anschließend wurde mit 90 % (v/v) Ethanol solange eluiert, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm annähernd basale Werte hatte. Dieses Ethanoleluat (90%v/v) stellt die Polyphenolfraktion (PPF) und wurde gefriergetrocknet, in Wasser/PBS/DMSO (49:49:2) aufgelöst und bei -20°C gelagert.

### 3 Ermittlung des optimalen Zellproliferationsgrads

#### 3.1 Ziel der Validierung der Zellproliferation

Ziele der Validierung der Zellproliferation waren:

1. Vergleichbarer Zellproliferationsgrad und Dichte bei Stimulationsbeginn aller Experimente. Dies ist verbunden mit vergleichbaren charakteristischen Zellmerkmalen wie z.B. vergleichbarem eNOS Proteingehalt oder vergleichbarer Superoxidanionproduktion. Die genannten Merkmale und auch andere sind bei Endothelzellen stark vom Proliferationsgrad und der Dichte abhängig (Zollner *et al.*, 2000; Arnal *et al.*, 1996).
2. Zellkulturbedingungen, welche dem physiologischen Zustand des Endothels möglichst angenähert sind. Das Endothel ist physiologisch eine konfluente Monolayerzellschicht. Andererseits entspricht dem physiologischen Zustand, trotz der Konfluenz, eine gewisse Auswechslung und somit auch Zellproliferation der Endothelzellen (Drenkhahn and Zenker, 1994).

Das Ziel der Validierung war deshalb durch veränderte Mediummengen und Proliferationsdauer einen Zellproliferationszustand zu finden, bei dem die Zellen schon konfluent sind aber trotzdem noch leicht proliferieren.

#### 3.2 Kultivierung

EA.hy926 Zellen wurden wie in Punkt (B1.1.3) beschrieben kultiviert. Vor dem Aussähen wurde die Zellsuspension so mit Medium verdünnt, dass 5 ml Zellsuspension  $0,4 \times 10^6$  Zellen enthalten. In 6-Lochplatten wurden pro Well 5 ml ( $\sim 0,4 \times 10^6$  Zellen) ausgesät.

#### 3.3 Ernte und Zähltechnik

Nach ein bis neun Tagen wurden die Zellen geerntet und gezählt. Dabei wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mit Hilfe einer Pipette trockengesaugt und dann 5 min mit 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Darauf wurde 1,3 ml Medium zugegeben, die Platten gut geschüttelt und die Zellsuspension abgesaugt und in ein 2 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Nach Vortexen wurde 50  $\mu$ l der Zellsuspension in eine Fuchs-Rosenthalkammer pipettiert und ausgezählt (B1.1.3).

## 4 Messung der eNOS Promotoraktivität mittels Luciferase-Reportergen-Assay

### 4.1 Allgemeines zum Luciferase-Reportergen-Assay

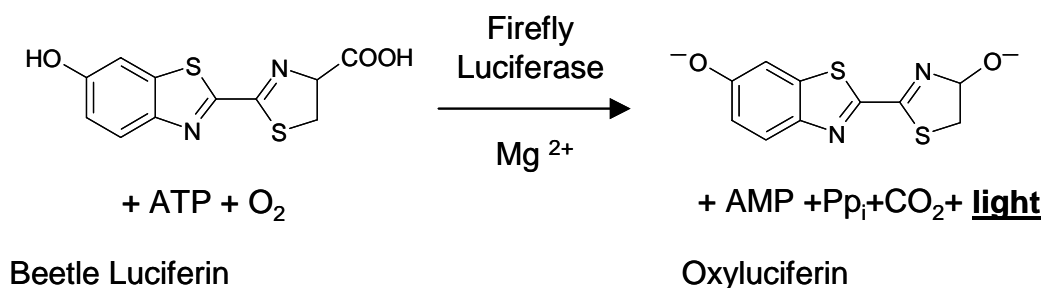
Mit dem Luciferase-Reportergen-Assay kann man z.B. die transkriptionelle Aktivität bestimmter Promotoren untersuchen. Dabei werden in einem Plasmid Gene der verschiedenen Luciferaseenzyme, welche z.B. die Glühwürmchen besitzen, den zu untersuchenden Promotoren nachgeschaltet. Diese Enzyme sind in der Lage in einer Biolumineszenzreaktion die Umwandlung von bestimmten Substraten zu katalysieren. Das emittierte Licht kann dann gemessen werden und ist proportional zur Promotoraktivität und Luciferasegenexpression.

#### 4.1.1 Plasmidaufbau und Transkriptionsablauf

Verwendet wurden ECV304 Zellen, welche mit einem pGL3-neo Plasmid (Promega), in das eine humane 3,5 kb NOS III Promotorsequenz vor einem Firefly-Luciferasegen (aus *Photinus pyralis* Glühwürmchen) eingebaut wurde, stabil transfiziert wurden. Bewirkt nun ein von außen zugegebener Stimulus eine erhöhte NOS III Promotoraktivität, wird das dem eNOS Promotor nachgeschaltete Luciferasegen verstärkt exprimiert, was mittels der erhöhten Luciferaseaktivität gemessen werden kann. Da es für die erhöhte Luciferaseaktivität erst der Transkription und der Translation des entsprechenden Luciferasegens bedarf, wurde die Messung erst frühestens 14-18 h nach Zugabe des Stimulus durchgeführt.

#### 4.1.2 Luciferase-Reaktion

Die Firefly Luciferase katalysiert die Umwandlung von Beetle Luciferin in Anwesenheit von O<sub>2</sub>, ATP und Magnesium zu Oxyluciferin unter Emission von Licht (Abb. 10). Das in dieser Arbeit verwendete Luciferasesystem (Promega E1500) enthält im Luciferasepuffer phenolische Zusätze, welche die Lichtemission bis zu 60 sec nach Substratzugabe konstant halten.



**Abb. 10: Biolumineszenzreaktion, katalysiert durch die Firefly Luciferase**

### 4.2 Lösungen

Verwendet wurden die Lösungen des „Luciferase Assay System“ (Promega)

Diese sind:

Luciferase Zellkultur Lyse Reagenz 1 x:

Luciferase Assay Puffer

Luciferase Assay Substrat

Das Luciferase Assay Substrat wurde im Luciferase Assay Puffer lichtgeschützt aufgelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 4.3 Durchführung

Es wurden  $0,4 \times 10^5$  ECV304 Zellen in 1,5 ml Medium in 24 Loch-Platten ausgesät. Nach 72 h wurde das Medium gewechselt, 4 h später wurde für 18 h stimuliert. Nach 18 h Stimulation wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen, 150 µl Lysepuffer in jedes Loch pipettiert, die Platten leicht geschüttelt und nach 5 min wurden die Lysate in auf Eis stehende Eppendorfreaktionsgefäße (ERG) pipettiert. Dann wurde 30 sec bei 8000 x g zentrifugiert, je 20 µl der Lysate in ein auf Eis stehendes Luminometerröhrchen pipettiert, diese zentrifugiert (1000 x g, 1 min) und in den Luminometer (AutoLumat Plus, Berthold) gestellt. Am Luminometer wurde ein Assay eingestellt, der 70 µl Reagenz einspritzt und nach 2 sec Verzögerung 8 sec lang die Lumineszenz misst.

## 5 Detektion von RNA mittels Northern Blot

Generell besteht beim Arbeiten mit Ribonukleinsäuren stets die Gefahr, dass diese sehr schnell durch Ribonukleasen (RNasen) abgebaut werden. Deshalb ist zum einen darauf zu achten, das Experiment nicht mit RNasen zu kontaminieren, zum anderen muss man schon zu Beginn der Arbeit dem Ansatz eine ausreichende Konzentration eines RNase-Inhibitor's zusetzen. Um die Zellen nicht mit RNasen zu kontaminieren wurden stets RNase-freie Handschuhe getragen, alle benutzten Glasgefäße autoklaviert und stets nur zweifach destilliertes und dann autoklaviertes Wasser benutzt (Chirgwin et al., 1979).



### 5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren

#### 5.1.1 Lösungen

GIT-Puffer:

Guanidiniumisothiocyanat	4 M
Natrium-Citrat pH 7,0	25 M
Lauroylsarkosin	0,5%
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,1 M

Wassergesättigtes Phenol: pH 4,0

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1,v/v)

2 M Natriumacetat pH 4,0

#### 5.1.2 Guanidinium/Phenol/Chloroform RNA-Isolierung

Die Isolierung der Ribonukleinsäure erfolgte in Anlehnung an die Guanidiniumisothiocyanat/Phenol/Chloroform RNA Extraktionsmethode von Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dabei wurden die Zellen zunächst durch GIT Puffer (enthält Guanidiniumisothiocyanat) vollständig denaturiert. Um eine Degradation der RNA durch RNasen zu verhindern wurde der RNase-Inhibitor  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben. Anschließend wurde den denaturierten Zelllysaten wassergesättigtes saures (pH 4,0) Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Nach gründlichem Vortexen wurde die Mischung zentrifugiert. Dabei bildet sich oben eine wässrige Phase, unten eine organische Chloroform/Phenolphase und dazwischen eine Interphase. Die wässrige Phase enthält DNA und RNA und die Interphase enthält die durch Guanidiniumisothiocyanat, Chloroform und Phenol denaturierten Proteine. Da in Wasser äquilibriertes saures Phenol verwendet wurde, ist die Löslichkeit von DNA in der organischen Phenol-/Chloroformphase erhöht, was eine gewisse Reinigung der RNA von DNA bewirkt. Die wässrige Phase wurde zum Ausfällen der RNA mit 2-Propanol versetzt und 1 h bei -20°C gelagert. Danach wurde die RNA mit 80% EtOH versetzt, um anorganischen Salze der Puffer wegzuwaschen.

Genaueres Protokoll der RNA-Isolierung:

EA.hy926 Zellen wurden in Petrischalen (6 cm Durchmesser) kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 750  $\mu$ l GIT-Puffer versetzt. Das zähe Lysat wurde abgeschabt und in ein 2 ml ERG überführt. Dazu wurden 100  $\mu$ l 2 M NaAc-Lösung (pH 4,0), 800  $\mu$ l wassergesättigtes Phenol (pH ca. 4,0) und 250  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) pipettiert. Die Mischung wurde gut gevortext und 10 min ins Eisbad gestellt. Anschließend wurde

zentrifugiert (20 min, 17000 x g, 4°C), die obere wässrige Phase abgenommen und 1:1 in einem neuen ERG mit 2-Propanol gemischt und danach 1h in einen -20°C Schrank gestellt. Danach wurde zentrifugiert (20 min, 17000 x g, 4°C), zum Pellet 1 ml 80% Ethanol gegeben und dann wieder zentrifugiert (siehe oben). Das Pellet wurde dann ca. 30 min bei 40°C im Trockenschrank getrocknet und zur anschließenden Bestimmung der Optischen Dichte (OD) in Wasser gelöst.

### 5.1.3 Konzentrationsbestimmung von total RNA

Nukleinsäuren absorbieren wegen ihrer aromatischen Basen UV-Strahlung bei einem Maximum von 260 nm. Die Absorption wird in Quarzküvetten gemessen, da diese kein UV-Licht absorbieren. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ergibt sich bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 260 nm und einer Küvetteneschichtdicke von 1 cm eine Extinktion ( $\sim$ optische Dichte =OD) von 1 bei:

einer DNA Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$

einer RNA Konzentration von 33  $\mu\text{g/ml}$ .

Um die Reinheit der RNA festzustellen, wird die RNA-Lösung bei 260 nm und bei 280 nm vermessen und der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  berechnet. Eine reine RNA-Lösung besitzt ein  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  von 2,0 und eine reine DNA-Lösung von 1,8. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen kontaminiert, ist der Wert signifikant kleiner.

Die Bestimmung der OD der wässrigen RNA-Lösungen erfolgte mit einem Zweistrahlphotometer (Lamda Bio 20, Perkin Elmer).

## 5.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der total RNA

RNA ist wegen ihrer Zuckerphosphatreste negativ geladen und wandert deshalb im elektrischem Feld der Elektrophoresekammer zur Anode. Einzelsträngige RNA bildet durch intra- und intermolekulare Basenpaarungen Sekundärstrukturen und Aggregate aus. Eine exakte, reproduzierbare Analyse der RNA ist nur mit denaturierter RNA möglich, da hier nach Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen die Auftrennung im Gel ausschließlich nach Molekulargröße erfolgt.

Die Denaturierung der RNA ist u.a. mit Formaldehydgelen oder mit Glyoxalgelen möglich. Da Glyoxalgele schärfere RNA-Banden erzeugen und dies für die anschließende Northern Blot Analyse von Vorteil ist, wurde diese Gelart ausgewählt. Dabei wird die RNA vor dem Auftragen auf das Gel mit Glyoxal/DMSO und Natriumphosphat als Pufferkomponente erhitzt. Bei diesem Erhitzen bricht DMSO zunächst die inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen auf, so dass

das Glyoxal mit den Guaninresten der RNA kovalent binden kann und so die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verhindert.

Genaueres Protokoll der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA:

Um RNase-Freiheit zu garantieren wurden die Elektrophoresekammern über Nacht mit 0,1 M NaOH gereinigt und vor Benutzung mit destilliertem Wasser gespült. Ca. 10 µg totale RNA wurde im Speed Vac getrocknet, dann mit 20 µl GDP-Gemisch versetzt und 1 h bei 50°C ins Schüttelwasserbad gestellt. Danach wurde sie sofort wieder auf Eis gestellt und 5 µl des Proben-Puffers dazupipettiert.

Zur Herstellung des 1,2% Agarosegels wurde auf 1,2 g Agarose 100 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,01 M) gegeben und die Agarose 3 x in der Mikrowelle bis zur völlig klaren Lösung aufgekocht. Die Lösung wurde in die Kammer gegossen und die Kämme eingesteckt. Nach Abkühlung des Agarosegels wurde soviel 0,01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- Puffer in die Gelkammer gegeben bis das Gel ca. 1 cm unter der Pufferoberfläche war. Danach wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen.

Die RNA-Proben wurden dann in die Geltaschen hineinpipettiert und eine Spannung von ca. 80 Volt angelegt. Um die Ausbildung eines pH-Gradienten mit lokalem pH >8,0 zu vermeiden, was eine Aufhebung der Assoziation von Glyoxal mit der RNA bewirken kann, wurde der Puffer während der Elektrophorese mit einer Umwälzpumpe ständig zirkuliert.

### 5.2.1 Lösungen

Glyoxal-DMSO-Phosphat (GDP):

Glyoxal 6 M	200 µl
DMSO	595 µl
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M, pH 7	117 µl
H <sub>2</sub> O	300 µl

Probenpuffer:

Glycerin	50 %
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7	0,01 M
Bromphenolblau	0,04 %

Zur Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs wurde dem Probenpuffer Bromphenolblau zugesetzt. Es wandert ungefähr mit DNA-Fragmenten von 10-100 bp und markiert somit die Elektrophoresefront.

Ethidiumbromidlösung:

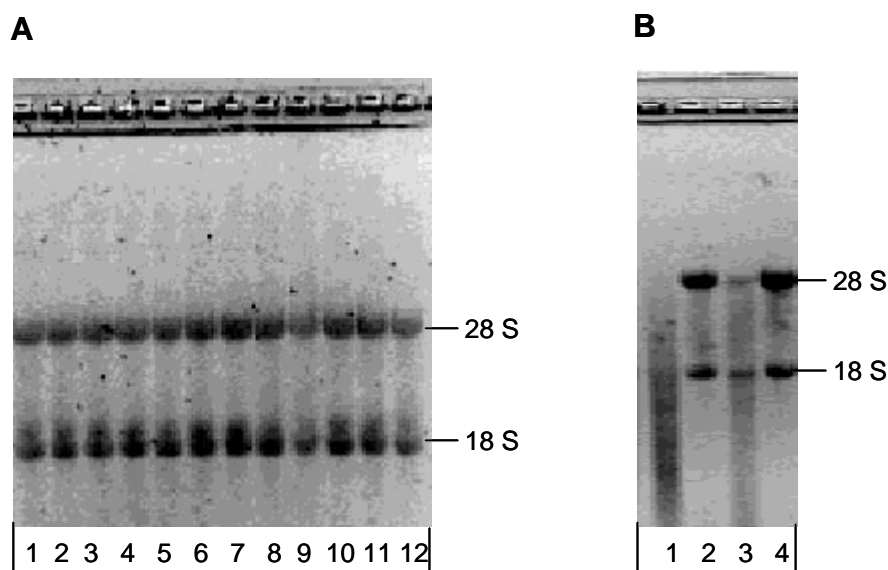
NH <sub>4</sub> -acetat 0,1 M	200ml
NaOH 10 M	80 µl
EtBr 1 % (m/v)	80µl

### 5.2.2 Färbung und Visualisierung der totalen RNA

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt, welcher mit DNA stark und mit RNA schwächer interkaliert. Bei UV-Bestrahlung mit 254 nm fluoresziert EtBr im orange-roten Bereich (ca. 590 nm). Sichtbar werden dann bei intakter RNA die beiden ribosomalen 28S und 18S RNA-Banden (Abb. 11A). Bei einem Gel mit degradierter RNA sind die beiden ribosomalen 28S und 18S Banden nicht sichtbar. Hier zeigen sich RNA-Schlieren über die ganze Laufstrecke (Abb. 11B). Für die Northern Blot-Analyse wurde ausschließlich intakte RNA verwendet.

Genaueres Färbeprotokoll:

Das Gel wurde 20 min in 0,1 M NaOH-Lösung vorbehandelt, danach 30 min in EtBr-Lösung gefärbt. Das nicht gebundene, überschüssige EtBr wurde durch 20 min Waschen des Gels in Wasser entfernt. Die Detektion und Auswertung erfolgte mittels einer Kamera (Kodak Image Station 440CF, Eastman Kodak Company) bei 254 nm Bestrahlung und mit einem 590 nm Emissionsfilter.



**Abb. 11: Überprüfung der Intaktheit der RNA.** A: Die Abbildung stellt ein repräsentatives Agarosegel (1,2%) dar, das mit EtBr gefärbte total RNA aus EA.hy926 Zellen zeigt. Die total RNA wurde aus den Zellen isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit EtBr zur Detektion im Kodakgerät angefärbt (Material und Methoden). Abb. A zeigt ein Gel mit 12 intakten RNA's, sichtbar durch die intakten 28S- und 18S-Banden. B. RNA wurde isoliert wie bei A. Man sieht zwei intakte RNA'S (Nr. 2 und 4) und zwei degradierte RNA'S (Nr. 1 und 3).

## 5.3 Amplifizierung einer cDNA-Northern Blot Probe

### 5.3.1 Präparation kompetenter Bakterienzellen

Kompetente Bakterienzellen sind Zellen, die fähig sind in Lösung befindliche Fremd-DNA ins Zellinnere aufzunehmen. Schon 1970 fand eine Arbeitsgruppe, dass man durch Behandlung mit Calciumchlorid und Rubidiumchlorid Bakterien für die Aufnahme von Fremd-DNA empfänglich machen kann (Mandel and Higa, 1970). Empirisch wurde diese Methode von mehreren Arbeitsgruppen nachfolgend noch verbessert.

Verwendete Lösungen:

Lösung A:

MOPS pH 7,0	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM

Lösung B

MOPS pH 6,5	100 mM
Rubidiumchlorid	50 mM
Calciumchlorid	10 mM

Genaueres Protokoll:

20 ml LB-Medium wurden mit 10 µl einer Glycerol-Stocklösung von E.coli DH5α über Nacht bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert (B1.2.3). 20 ml LB-Medium wurden dann mit 200 µl der Übernacht-Bakterienkultur beimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien ließ man bis zur logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  von 0,3-0,6) sich vermehren, dann wurden die Bakteriensuspension in ein gekühltes Zentrifugenröhrchen gegeben und zentrifugiert (5000 x g, 5 min, 4°C). Das Bakterienpellet wurde abgegossen und in 10 ml eisgekühlter Lösung A resuspendiert, gevortext und wieder zentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde abgegossen und das Bakterienpellet in 10 ml von Lösung B resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, wobei das Zentrifugenröhrchen öfters im Eis umgeschwenkt wurde. Danach wurde wieder zentrifugiert (s.o.) und das Bakterienpellet mit 2 ml Lösung B versehen. Wenn eine lang andauernde Lagerung der kompetenten Bakterien erwünscht war, wurde noch 10 % Glycerol hinzugefügt. Die Zellen konnten dann bei -70°C 5-6 Wochen im kompetenten Zustand gelagert werden.

### 5.3.2 Transformation von E-coli DH5 $\alpha$ mit Plasmid cDNA

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation oder Transfektion. Mandel und Higa (Mandel and Higa, 1970) beschrieben 1970 die Transformation zum ersten mal. Ein auf Bakterienzellen stabil übertragenes Plasmid wird wie die eigene genomische DNA vermehrt. Wenn die aufgenommenen Plasmide eine Antibiotikaresistenz enthalten, können erfolgreich transfizierte Bakterien selektioniert und nachgewiesen werden.

Genaueres Protokoll der Transformation:

Es wurden 5-15  $\mu$ l der DNA-Lösung ( $\sim$ 0,1  $\mu$ g DNA) zusammen mit 100  $\mu$ l kompetenten Bakterien in ein ERG pipettiert, auf Eis 30 min inkubiert, dann 90 sec bei 42°C inkubiert, danach 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der gesamte Inhalt des ERG in 1 ml LB-Medium (B1.2.2) pipettiert und 50 min bei 37°C inkubiert. Davon wurden 20  $\mu$ l bzw. 200  $\mu$ l auf LB-Agar-Ampicillin-Platten (B1.2.2) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Erfolgreich transfizierte Bakterien konnten über Nacht zu einzelnen, mit bloßem Auge sichtbaren Einzelkolonien heranwachsen.

### 5.3.3 Schnellisolierung von Plasmid-DNA

Um den Erfolg der Transformation (B5.3.2) zu kontrollieren wurden Einzelkolonien der LB-Agar-Ampicillin-Platten im Bakterienschüttler vermehrt und das übertragende Plasmid daraus isoliert (Mandel and Higa, 1970). Dies erfolgte erreicht durch Behandlung der Bakteriensuspension mit dem nichtionischem Detergens TritonX-100, welches die Auflösung der bakteriellen Plasmamembran bewirkt. Danach wurde Lysozym zur Verdauung der Bakterienzellwände zugegeben. Bei der anschließenden Zentrifugation sedimentieren Zelltrümmer und bakterielle genomische DNA, während die leichtere Plasmid DNA im Überstand bleibt. Mit Isopropanol wurde die Plasmid DNA zunächst gefällt, dann wurden durch Zugabe von 70% Ethanol anorganische Salze gewaschen und die getrocknete Plasmid-DNA in Wasser gelöst.

Verwendete STET-Lösung:

Sucrose	8 % (m/v)
Triton X-100	5 % (m/v)
Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	50 mM

Genaueres Protokoll zur Schnellisolierung von Plasmid-DNA:

Einzelkolonien der auf dem LB-Agar-Ampicillin-Platten gewachsenen Bakterien wurden mit einer Impföse abgenommen, über Nacht bei 37°C in einem 2 ml Gefäß im Bakterienerschüttler inkubiert. Dies wurde von mehreren Klonen in je einem extra Gefäß durchgeführt. Am nächsten Morgen wurden je 500 µl der Bakteriensuspensionen in ein steriles ERG pipettiert und bei 4°C gelagert. Die restlichen 1,5 ml Bakterienlysate wurden 5 min bei 2576 x g zentrifugiert, dann wurde der Überstand abgesaugt und 200 µl Stet-Lösung zum Bakterienpellet dazugegeben und bis zur Suspension gevortext. Nach Zugabe von 16 µl Lysozym-Natrium (10 mg/ml, Sigma) wurde kurz gevortext, danach wurden die Bakterien 50 sec zum Kochen gebracht und sofort 10 min bei 2576 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues ERG überführt, 0,6 Volumenteile Isopropanol dazugegeben und nach kurzem Vortexen wurde die Mischung 5 min bei -20°C inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 26 x g wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation (3 min, 2576 x g) wurde das Pellet nach dem Trocknen in 40 µl Wasser gelöst.

### 5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis der gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte elektroforetisch in einem 1 % (m/v) Agarosegel in 0,5 x TBE, welchem 0,1 µg/ml EtBr zugesetzt wurde.

Verwendete Lösungen: DNA-Laufpuffer: TBE

Tris Base	900 mM
Borsäure	889 mM
EDTA	25 mM

Das Plasmidpellet wurde in soviel Wasser gelöst, dass ungefähr eine Konzentration von 1 µg/ml erhalten wurde. 1 µl gelöstes Plasmid, 15 µl H<sub>2</sub>O und 4 µl Ladebuffer (B5.2.1) wurden gemischt und in die Agarosegeltaschen pipettiert. Als Kontrolle der Laufhöhe dienten 0,5 µg des zur Transformation verwendeten Plasmids. Die Gelelektrophorese wurde bei 60 V durchgeführt.

### 5.3.5 Plasmidisolierung und Reinigung mittels Säulenchromatographie

Für die Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA, die für die nachfolgende *in vitro* Transkription (B5.4) benötigt wurde, wurde der „Quiagen Midi Kit“ (Quiagen) verwendet. Diese Plasmidisolierung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) und anschließender chromatographischer Reinigung der Plasmid-DNA mittels Anionenaustauscher-Säulen.

Zuerst wurde das Bakterienpellet mit einem EDTA-haltigen Puffer und RNase versetzt. Dabei komplexiert das EDTA zweiwertige Ionen wie  $Mg^{++}$  und  $Ca^{++}$ , was zu einer Destabilisierung der Bakterienzellwand führt. Die zugesetzte RNase bewirkt bereits in diesem Stadium größtenteils die Denaturierung der zytoplasmatischen RNA. Dann wurde der Bakteriensuspension der Lysepuffer aus NaOH/Sodiumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, wobei SDS als Detergens die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände herauslöst und NaOH sowohl aus der Zelle freigesetzte Proteine als auch chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Wichtig ist eine nicht zu lange und nicht zu kurze Lysezeit, damit einerseits genug Plasmid-DNA, andererseits möglichst wenig der wesentlich größeren chromosomalen DNA ausdringt. Danach wurde Kaliumacetatpuffer (3 M) zugesetzt, in dessen Anwesenheit denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterieller Zelldebris unlösliche Komplexe bilden und mit dem Salz präzipitieren, während die kleinere Plasmid-DNA in Lösung bleibt und auf Grund der pH-Neutralisation durch das Kaliumacetat renaturiert. Durch Zentrifugation wurde die lösliche Plasmid-DNA von den Präzipitaten getrennt. Anschließend wurde durch eine Anionenaustauschersäule, deren positive Ladung durch protonierte Diethylammoniummethylgruppen gestellt wird, die negativ geladene Plasmid-DNA bei relativ niedriger Salzkonzentration (~1 mM) gebunden, während Spuren von Proteinen und RNA unter diesen Bedingungen nicht binden. Die Plasmid-DNA wurde dann durch einen höhermolaren Puffer von der Säule eluiert, abzentrifugiert, mit Isopropanol gefällt und mit 70% Ethanol zur Abtrennung von anorganischen Salzen gewaschen.

Verwendete Lösungen des Quiagen Kits:

Puffer P1:	Tris-HCl pH 8	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer QBT2:	NaCl	750 mM
	MOPS pH 7,0	50 mM
	Ethanol	15 % (v/v)
	TritonX-100	
Puffer QC:	NaCl	1,0 M
	MOPS pH 7,0	50 mM
	Ethanol	15 %
Puffer QF:	NaCl	1,5 mM
	Tris-HCL pH 8,5	50 mM
	Ethanol	15 % (v/v)



Genaueres Protokoll der Plasmidisolierung und Reinigung mittels Säulenchromatographie:

In B5.3.3 wurde die Plasmidisolierung im schnellen und kleinen Maßstab durchgeführt. Dort wurden von den Bakteriensuspensionen zur Plasmidisolierung nur 1,5 ml der insgesamt 2 ml verwendet. Wenn an Hand der Gelelektrophorese ermittelt werden konnte, dass die Plasmidklonierung erfolgreich war, wurden nun von den restlichen 500 µl Bakteriensuspension 50 µl in 25 ml LB-Medium gegeben und 12 - 16 h auf dem Bakterienrührer hochgezogen. Dann wurden gemäß dem Protokoll des „Quiagen Midi Kits“ die Bakterien zentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 x g), in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, danach durch Zugabe von Puffer QBT die Bakterien 5 min lysiert, und schließlich die Bakterien nach Zugabe von 4 ml Kaliumacetat (3 M) 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (30 min, 4°C, 20000 x g), der Überstand noch mal zentrifugiert (15 min, 4°C, 20000 x g) und der neue Überstand nach Zugabe von 4 ml Puffer QBT in das „Quiagentip“ Röhrchen gegeben. Nachdem die Flüssigkeit die Säule passiert hatte, wurde zwei mal mit 10 ml des Waschpuffers QC die Säule gespült, dann die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert und zum Eluat 3,5 ml (~0,7 Volumenanteile) Isopropanol gegeben. Als nächstes wurde zentrifugiert (30 min, 4°C, 15000 x g), der Überstand verworfen, das DNA-Pellet mit 2 ml Ethanol 70% gewaschen, dann erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 15000 x g), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet wurde nach Trocknung an der Luft in 100 µl Wasser gelöst.

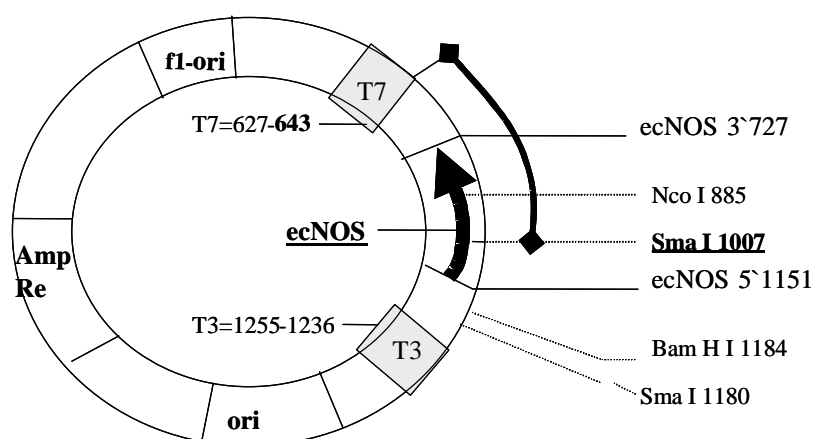
### 5.3.6 Quantifizierung der Plasmid DNA über OD-Messung

Die Quantifizierung der Plasmid-DNA wurde mittels OD-Wert Messung mit einem Zweistrahlphotometer (Lambda Bio 20, Perkin Elmer) bei 260 nm durchgeführt. Für die Berechnung der Plasmid-DNA-Konzentration wurden der spezifische DNA-OD-Wert zu Grunde gelegt (siehe B5.1.3).

### 5.3.7 Schneiden des Plasmids mit Restriktionsendonukleasen

Bevor die in Punkt B5.4 beschriebene Herstellung der radioaktiven cRNA-Sonde durchgeführt werden kann, muss das nun klonierte Plasmid, welches die komplementäre cDNA der cRNA-Sonde enthält, noch linearisiert werden. Dies ist nötig, damit die RNA-Polymerasen ihre Transkription am Ende der einklonierten cDNA abbricht und nicht das ganze Plasmid transkribiert. Zur Linearisierung wurden sogenannte Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese sind Endo-Desoxyribonukleasen, die spezifische Basensequenzen innerhalb einer DNA-Doppelhelix erkennen und beide Stränge spalten (Roberts and Macelis, 1992).

Für das pCR\_ecNOS\_Human Plasmid (Abb. 12) wurde z.B. die Sma I Restriktionsendonuklease eingesetzt, welche das Plasmid in der eNOS cDNA Sequenz bei 1007 nt schneidet, so dass die T7 RNA-Polymerase das Plasmid nur von 643 nt bis 1007 nt transkribiert und so als Ergebnis eine 364 nt linearisierte cRNA liefert, welche ein 280 nt Segment der eNOS cRNA enthält.



**Abb. 12: Skizze des pCR\_ecNOS\_Human: 3422bp**

Das zweite in dieser Arbeit verwendete pCR- $\beta$ -Aktin-Hum\_del\_BstEIII/Hind III Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym Asp 718 geschnitten und mit der T3 Polymerase transkribiert. Diese nun lineare cRNA enthält ein 108 nt Fragment der  $\beta$ -Aktin-Hum cRNA.

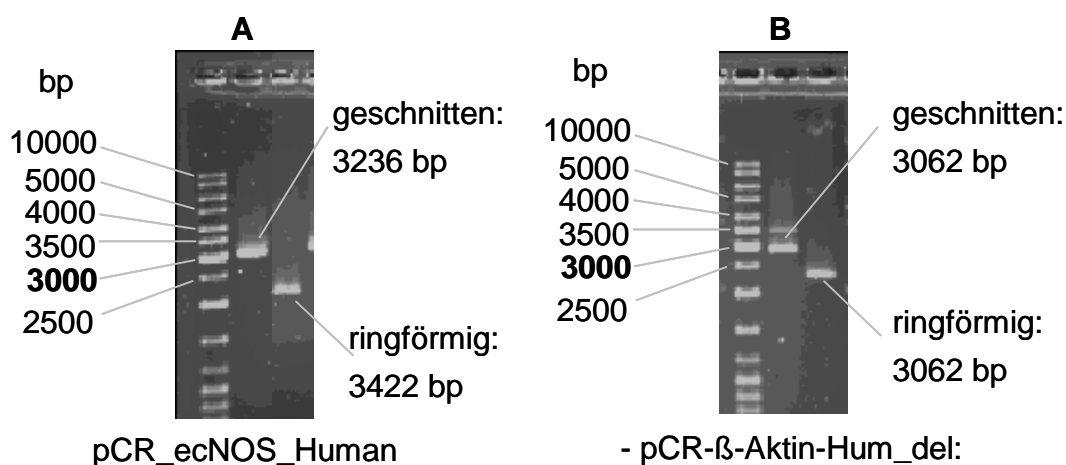
Zur Restriktion des Plasmids wurden 20  $\mu$ g Plasmid DNA (gelöst in Wasser) mit ca. 20-40 Units Restriktionsenzym, 10  $\mu$ l des entsprechenden 10 x Puffers und Wasser ad 100  $\mu$ l zusammenpipettiert (alle Reagenzien waren von Promega). Der Ansatz wurde 12 h inkubiert bevor die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym (65°C, 20 min) abgebrochen wurde. Anschließend wurde die linearisierte cDNA wie im folgenden beschrieben durch Phenol/Chloroform Ausschüttelung von Proteinen und Salzen gereinigt.

Dazu wurde die Lösung mit 3 M Na-Acetat pH 7,0, 35  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 150  $\mu$ l wassergesättigtem Phenol versetzt. Nach 30 sec intensiven Vortexen wurde zentrifugiert (3 min, 12000 x g), die obere wässrige Phase in ein neues ERG überführt und nach Zugabe von 150  $\mu$ l einer Mischung von Phenol und Chloroform (1:1) gut gemischt und erneut zentrifugiert (3 min, 5000 x g). Der Chlorformzusatz besitzt erstens eine denaturierende Wirkung auf Proteine und verringert den Anteil der wässrigen Phase, der sich in Phenol löst, wodurch die DNA-Ausbeute erhöht wird. Der Überstand wurde in ein frisches ERG überführt, mit 1 ml wassergesättigtem Ether versetzt, gut gemischt, wieder zentrifugiert (30 sec, 5000 x g), die obere Phase abgesaugt und der restliche Ether durch kurzes Stehen lassen bei RT abgedampft.

Anschließend wurde die DNA nach Zugabe des 2,5-3-fachen Volumens an Ethanol (100 %) 16 h bei -20°C gefällt und dann nach Waschen mit 70% Ethanol in Wasser gelöst.

### 5.3.8 Überprüfung der Plasmidrestriktion mittels Agarose Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob die Restriktion erfolgreich war, wurde mit 0,5 µg linearisierter DNA eine Agarose-Gelelektrophorese (wie in B5.3.4 beschrieben) durchgeführt und die Laufhöhe mit der einer DNA-Leiter (BMI), welche linearisierte DNA unterschiedlicher Länge enthält, verglichen. Das Laufverhalten von ringförmiger Plasmid-DNA im Vergleich zu linearisierter Plasmid-DNA ist nicht immer vorhersehbar. Dagegen muss die linearisierte Plasmid-DNA exakt gleich wie die entsprechenden Größenstandards der DNA-Leiter laufen. Wie Abb. 13 darstellt, entsprach das Laufverhalten der geschnittenen Plasmide den entsprechenden DNA-Größenstandards.



**Abb. 13: Agarosegel von geschnittenen und ungeschnittenen Plasmiden.** Je 0,5 µg geschnittene und ungeschnittene Plasmid-DNA wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und das Laufverhalten mit linearisierten DNA-Stücken einer DNA-Leiter verglichen. A zeigt das Plasmid pCR-ecNOS\_Human, B das Plasmid pCR-β-Aktin-Hum\_del.

## 5.4 Herstellung einer radioaktiv markierten cRNA-Sonde

### 5.4.1 RNA-Polymerase Reaktion

Die *in vitro* Transkription zur Herstellung der radioaktiv markierten cRNA-Proben wurde mit einem RNA Transkriptions Kit (Stratagene) durchgeführt. Es wurden die Protokollangaben des Herstellers übernommen:

10 x Puffer	2 µl
Linearisierte cDNA	1 µg ~ x µl
rNTP (ATP, GTP, CTP)	je 1 µl (von 10 mM rNTP)
DDT 0,75 M	1 µl
800 Ci/mmol( $\alpha^{32}\text{P}$ )rUTP	5 µl
T3 / T7 Polymerase	20 U ~ x µl
Wasser	ad 20 µl

Dabei wurden alle Reagenzien bis auf die RNA-Polymerasen auf Eis zusammenpipettiert und kurz zentrifugiert. Dann wurde das radioaktive Nukleotid ( $\alpha^{32}\text{P}$ )rUTP 800Ci/mmol, Amersham) und zuletzt die T3-Polymerase (eNOS cDNA-Probe) bzw. T7-Polymerase ( $\beta$ -Aktin-Hum cDNA) zugegeben und der Reaktionsansatz 20 min bei 37°C inkubiert.

### 5.4.2 Abtrennung der radioaktiven cRNA von den radioaktiven Nukleotiden

Um die radioaktiv markierte cRNA-Probe (B5.4.1) von überschüssigem, nicht eingebautem ( $\alpha^{32}\text{P}$ )rUTP abzutrennen, wurde das Reaktionsgemisch über eine NucTrap® Säule (Stratagene) aufgereinigt. Das freie radioaktive Nukleotid bleibt dabei auf der Säule, während sich die radioaktive cRNA-Probe im Eluat befindet.

Verwendete Lösungen: STE (Natriumchlorid Tris EDTA-Puffer):

NaCl	100mM
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Die Versuchsdurchführung wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Stratagene) durchgeführt.

Der Einbau des radioaktiven Nukleotids wurde anschließend durch Messung der Lösung im  $\beta$ -Counter (LS 6500, Beckman, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden 5 ml eines Szintillationscocktails (rotiszint eco plus, Roth, Deutschland) mit 1 µl der radioaktiven Probe gemischt und die Strahlung in cpm gemessen.

### 5.5 Northern Blot

#### 5.5.1 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Nylonmembran

Zum Transfer der wie unter B5.2 gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA wurde das Vakuumblotverfahren angewendet (VacuGene<sup>TM</sup>XL Vacuum blotting System Pharmacia Biotech). Vorteil gegenüber dem herkömmlichen Kapillarblottingverfahren sind kurze Transferzeiten (ca. 45 min) mit hoher Bandenschärfe.

Verwendete Transferlösung: 20 x SSC (Natriumchlorid / Natriumcitrat-Puffer):

NaCl	175,3 g
Na-Citrat	88,2 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml ( Einstellen auf pH 7,0)

Genaueres Protokoll:

Die Nylonmembran (Nytran® 0,2 µm, neutrale Nylonmembran, Schleicher & Schüll) wurde mit Wasser befeuchtet und dann 20 min in 20 x SSC Puffer eingeweicht. Das Agarosegel wurde nach Vorschrift des Herstellers in der Apparatur auf die Nylonmembran gelegt, in die Anordnung bis zur vollständigen Bedeckung des Gels die Transferlösung 20 x SSC gegeben und ca. 45 min ein Vakuum von ca. 50 bar angelegt. Nach Entfernung der überschüssigen Transferlösung wurde die Membran maximal 5 min in 20 x SSC gewaschen, um an der Membran haftende Agarose zu beseitigen, welche bei der anschließenden UV-Lichtfixierung das UV-Licht quenschen würde.

Um die RNA stabil an die Membran zu binden, wurde die Membran mit UV-Licht in einem UV-Quervernetzer (CL-1000, Ultraviolet Crosslinker, UVP) bestrahlt. Dessen Energie bewirkt das sogenannte „cross-linking“, wobei freie Aminogruppen der Nylonmembran mit der RNA eine kovalente Bindung eingehen. Wichtig ist hierbei eine optimale Bestrahlungszeit: Ist sie zu kurz, wird die RNA nicht fest an die Membran gebunden, ist sie zu lang, wird die RNA irreversibel geschädigt.

#### 5.5.2 Hybridisierung der total RNA mit der radioaktiven cRNA-Sonde

Um bestimmte RNA quantitativ und qualitativ nachzuweisen, kann man die Hybridisierungstechnik anwenden, deren Grundlage die komplementäre Basenpaarung durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin/Uracil und Guanin/Cytosin sind. Prinzipiell können alle möglichen Doppelstränge (DNA:DNA, DNA:RNA, RNA:RNA) hybridisiert werden. Die Hybridisierungseffizienz ist abhängig von der Hybridisierungstemperatur, der mRNA-Sondenkonzentration, der Länge und Basenzusammensetzung des hybridisierenden Sequenzabschnittes, der

Salzkonzentration des Mediums, der An- und Abwesenheit helixdestabilisierender Zusätze wie Formamid und der Art der hybridisierenden Nukleinsäurestränge.

Unter Berücksichtigung aller obigen Punkte wird mittels einer Formel der Schmelzpunkt  $T_M$  berechnet (Bodkin and Knudson, 1985), welcher als die Temperatur definiert ist, bei der die Hälfte der Hybride dissoziiert.

$$T_m = 79,8 \text{ °C} + 18,5(\log_{10}[\text{Na}^+] + 0,58(\%G+C) + 11,8 (\%G + C)^2 - 0,35(\%Formamid) - (820/l))$$

Mit  $l$  = Länge der cRNA-Probe in bp und G/C = Anteil der Guanosin- bzw. Cytosinbasen (%) der cRNA-Probe.

Mindestens die Einhaltung der durch obige Formel ermittelten  $T_m$  als Hybridisierungstemperatur ist wichtig für eine hohe Stringenz. Das bedeutet, dass nur perfekt basengepaarte Nukleinsäurestränge entstehen und somit wenig unspezifische und unerwünschte Hybride gebildet werden. Es ist sinnvoll die optimalen Reaktionsbedingungen durch Veränderung z.B. der Salz- und Formamidkonzentrationen sowie der Hybridisierungstemperatur für jede Hybridisierung individuell auszutesten.

Für die Hybridisierungen dieser Arbeit wurde folgender Hybridisierungsansatz verwendet:

1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,8	2 ml
5 M NaCl	8 ml
H <sub>2</sub> O dest.	6,4 ml
Denhards (50x)	2 ml
10 % SDS	800 µl
0,5 M EDTA pH 8,0	800 µl
Formamid (entionisiert)	20 ml

Die Hybridisierung wurde in einem Hybridisierungsofen (Hybridization Oven, 6/12V Uni Equipe, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Nylonmembranen mit 2 x SSC befeuchtet, in die Hybridisierungsflasche eingerollt und 5 ml des obigen Hybridisierungsmixes (70°C) für 4 h zur Vorhybridisierung bei 70°C dazugegeben. Diese Vorhybridisierung soll verhindern, dass bei der eigentlichen Hybridisierung unspezifische, radioaktive Hybride gebildet werden. Anschließend wurde der Vorhybridisierungsmix entfernt, und der Blot mit der radioaktiven cRNA-Probe in 5 ml Hybridisierungspuffer für 16 h bei 70°C (eNOS) bzw. 68 °C (β-Aktin) hybridisiert.

Um nicht absolut perfekt basengepaarte Nukleinsäurestränge von der Membran zu entfernen, wurde der Blot nach dem Hybridisieren noch in 0,1 x SSC-Lösung mit 1%

SDS gewaschen. Hierbei können je nach Bedarf durch Erhöhung der Waschtemperatur und Verringerung der Salzkonzentration die Bedingungen mehr oder weniger stringent gewählt werden.

Nach dem Waschen wurden die Blots an der Luft getrocknet, in eine Kassette auf einen Screen (BAS Cassette, Fuji Film, Japan) gelegt und nach 1 h im Phosphoimager (Fujix Bio-Imaging Analyser IPR 1500, Fuji Film, Japan) ausgewertet.

## 6 eNOS Protein Detektion mittels Western Blot

Die qualitative und quantitative Bestimmung des eNOS Proteins wurde mittels Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst lysiert und alle zytosolischen und an partikuläre Zellbestandteile gebundene Proteine in Lösung gebracht. Nach der Gesamtproteinbestimmung (Bradford-Methode) wurden die Proteine durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Diskelektrophorese aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) geblottet. Dann wurde die eNOS Proteinbande mit zwei Antikörpern inkubiert (eNOS-Antikörper/ II. Antikörper) und anschließend mittels der durch Chemilumineszenz hervorgerufenen Lichtemission qualitativ und quantitativ detektiert.

### 6.1 Probenaufarbeitung / Bradford-Proteinbestimmung

Da das eNOS Protein nicht nur zytosolisch, sondern v.a. auch an Caveolen in der Membran gebunden vorliegt, wurde für die Zellyse und Proteingewinnung ein für das eNOS Protein optimierter Lysepuffer verwendet (Li *et al.*, 1998).

#### 6.1.1 Lösungen

Lysepuffer:

Tris-HCl	50 mM
EDTA	0,5 mM
EGTA	0,5 mM
DTT (Dithiothreitol)	2 mM
Glutathion	7 mM
Glycerol	10 %
Chaps	20 mM

Kurz vor der Verwendung wurden 40 µl einer 25 x Stocklösung des Proteaseinhibitors Complete® (Roche) zu 1 ml Lysepuffer zugegeben.

SDS-Probenpuffer (5x):

3,125 M Tris-HCl pH 6,8	100 µl
Glycerol	500 µl
20 % SDS	250 µl
16 % DTT	125 µl
Pyronin Y 5 %	5 µl
Aqua dest.	20 µl

### 6.1.2 Durchführung

EA.hy926 Zellen wurden in 6-Lochplatten 20 h mit den Testsubstanzen stimuliert. Nach Absaugen der Zellüberstände wurden die Zellen mit 1 ml PBS zweimal gewaschen, auf Eis gestellt, in jedes Loch 100 µl des Lysepuffers gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, das Lysat zunächst in einem ERG 15 min auf Eis inkubiert und anschließend etwas 6 sec mit dem Ultraschallstab (UW 2200, Banelin Sonoplus) behandelt. Da das eNOS Protein zum einen größtenteils zellmembrangebunden, zum anderen zum Teil als Dimer vorliegt muss die Zelllyse äußerst sorgfältig gemacht werden, um das eNOS Protein als Monomer in Lösung zu bringen. Nach der Zelllyse wurden die ERG zentrifugiert (1 h, 14000 x g).

Die Proteine sind nun im Überstand und es wurde mittels der Bradford-Methode (Bradford, 1976) die Gesamtproteinmenge ermittelt. Diese Methode beruht auf der Bindung von blauen sogenannten Coomassiebrillantblau-Säurefarbstoffen mit kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine, wobei das Absorptionsmaximum von ca. 465 nm auf 595 verschoben wird. Dazu wurden je 3 µl Proteinlösung, 797 µl Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad) gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Absorption bei 590 nm in einem Zweistrahlphotometer (Lamda Bio 20, Perkin Elmer) gemessen. Die quantitative Proteinbestimmung (µg Protein/ml) erfolgte mittels einer BSA-Eichlösung.

Danach wurde eine definierte Proteinmenge 1:5 mit dem Probenpuffer (5 x) versetzt, die Proben 5 min bei 95 °C gekocht, dann auf Eis gestellt und entweder bei -20°C eingefroren oder anteilsweise sofort für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiterverwendet. Durch das Kochen werden die Proteine vollständig denaturiert und Schwefelbrücken zwischen Cysteinen durch das reduzierende DTT gespalten. Das stark negativ geladene SDS kann dann die Proteine umhüllen. Dabei entstehen negative Komplexe (Micellen), mit einer konstanten negativen Ladung pro Masseneinheit Protein.



### 6.2 SDS-Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mittels der SDS-Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese getrennt. Dabei werden die mit SDS umhüllten Proteine rein nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, weil sie wie unter B6.1.2 beschrieben denaturiert wurden und proportional zum Molekulargewicht von dem stark negativen SDS umhüllt werden. Die Disk-Gelelektrophorese, welche erstmals 1970 beschrieben wurde (Laemmli, 1970), zeichnet sich durch eine hohe Auflösung und Trennschärfe aus. Dabei wandern die Proteine erst durch ein Sammelgel zwischen einem Leit-Ion ( $\text{Cl}^-$ ) und einem Folge-Ion ( $\text{Glycin}^-$ ) und werden anschließend in einem engporigen Trenngel der Molekulargröße nach aufgetrennt.

#### 6.2.1 Lösungen

Trenngel (7,5%):

30 % PAA	5,625 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	5,625 ml
SDS 10 % (m/v)	0,225 ml
H <sub>2</sub> O dest	11,025 ml

Diese Lösung wurde 10 min mittels Saugflasche und Vakuumpumpe entgast. Anschließend wurde 22,5  $\mu\text{l}$  TEMED und 112,5  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat (10%) als Radikalstarter zugegeben und die Lösung in eine vertikale Gelapparatur (Biorad) gegossen.

Sammelgel:

30 % PAA	2,55 ml
1,25 M Tris-HCL pH 6,8	1,5 ml
10 % SDS	0,15 ml
H <sub>2</sub> O dest	10,5 ml

Nach Entgasung (siehe oben) wurde 30  $\mu\text{l}$  TEMED und 150  $\mu\text{l}$  Ammoniumpersulfat (10%) zugegeben. Das Sammelgel wurde auf das polymerisierte Trenngel gegossen.

Nach dem Eingießen wurden die Kämme in die Apparaturen eingesetzt.

Elektrophoresepuffer:

Tris Base	3,0g
Glycin	14,4g
SDS	1,0g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 6.2.2 Durchführung

In jede Geltasche wurden 20 µg Protein in 30 µl Probenpuffer (1 x) pipettiert. Bei der anschließenden Elektrophorese ist darauf zu achten, dass sowohl Anode als auch Kathode mit Elektrophoresepuffer bedeckt sind. Dann wurde die Elektrophoresekammer geschlossen und zunächst für 20 min 100 V (Auftrennung im Sammelgel), danach für 40 min 200 V (Auftrennung im Trenngel) Spannung angelegt.

### 6.3 Protein-Transfer von SDS-Polyacrylamidgel auf PVDF-Membran

Für den Proteintransfer von Polyacrylamidgel auf eine Blotmembran wurde das Semidry-Blotting-Verfahren verwendet. Dabei handelt es sich um eine Anordnung von zwei horizontalen Graphitelektroden (Trans-Blot® SD, Bio-Rad), zwischen denen der Blotsandwich aus in Puffer getränkten Filterpapieren, Gel und Membran eingebaut wird. Das Semidry-Elektroblotting-Verfahren zeichnet sich durch kurze Blottingdauer und gleichmäßigen, effektiven Proteintransfer mit scharfen Banden aus.

#### 6.3.1 Lösungen

Anodenpuffer I pH 10,4:

Tris Base	15 g
MeOH	100 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

Anodenpuffer II pH 10,4:

Tris Base	1,5 g
MeOH	100 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

Kathodenpuffer pH 7,6:

ε-Amino-n-capronsäure	2,6 g
MeOH	100 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

#### 6.3.2 Durchführung

Die PVDF-Membran (Immobilon™-P , 0,45 µm Porengröße, Millipore) wurde auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten, dann 5 min in MeOH, 5 min in H<sub>2</sub>O und danach bis zur Benutzung in Anodenpuffer II gelegt. Auf die Anode wurden dann luftblasenfrei gewalzte Blottingpapiere (Quickdraw™, Sigma) in folgender

Reihenfolge gelegt: sechs in Anodenpuffer I getränkte, drei in Anodenpuffer II getränkte, dann die Membran und das Gel. Darauf dann neun Blottingpapiere, getränkt in Kathodenpuffer. Das Blotting erfolgte mit 0,8 mA je cm<sup>2</sup> zu blottender Membranfläche für 1 h. Danach wurde die Membran 30 min bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

### 6.4 Immunologische Detektion mit Antikörpern

Zur spezifischen Sichtbarmachung der gesuchten eNOS Proteinbande wurde die PVDF-Membran, auf die Proteine aus dem Gel geblottet wurden, zunächst mit einem spezifischen monoklonalen eNOS-Antikörper inkubiert. Dieser wurde dann mit einem zweiten Anti-Immunglobulin-Antikörper detektiert, an den das Enzym der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Dieses Enzym bewirkt nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid eine Chemilumineszenzreaktion, bei der Licht der Wellenlänge 428 nm freigesetzt wird. Dieses Licht wurde mittels der Kodak Photostation (Kodak Image Station 440CF, Eastman Kodak Company, New York, USA) gemessen und densitometrisch mit einem Programm (Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software) ausgewertet. Je nach eNOS Proteinmenge wird unterschiedlich viel Licht emittiert.

#### 6.4.1 Verwendete Antikörper

Der verwendete spezifische 1. eNOS Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (Transduction Laboratories, Klon 3).

Der 2. Antikörper war ein polyklonaler anti Maus Antikörper (Cell signaling, 7027-1), an den das Enzym der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist.

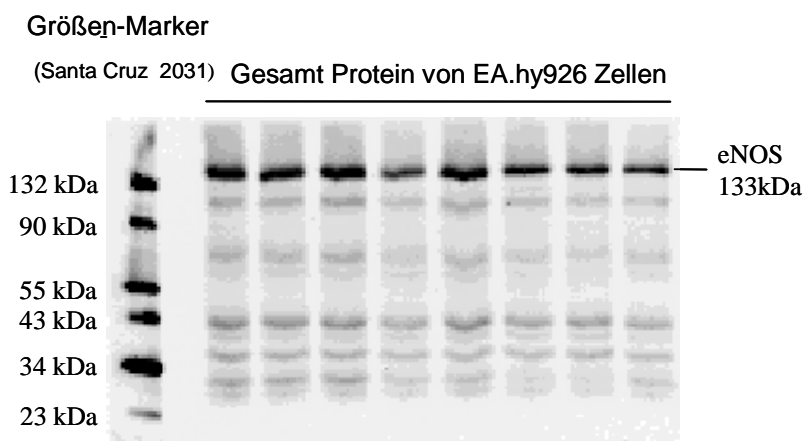
#### 6.4.2 Inkubation mit Antikörpern und Chemilumineszenzreaktion

Bevor die Blots mit dem ersten eNOS-Antikörper inkubiert wurden, wurden sie 3 h bei Raumtemperatur (RT) mit einer 3 % BSA-Lösung in TBS-T-Puffer (siehe unten) inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzudecken. Dann wurden die Blots über Nacht bei 4 °C mit dem 1. Antikörper (1:2500 in TBS-T) inkubiert, danach der Blot 3 x 10 min in TBS-T gewaschen und 1 h bei RT mit dem 2. Antikörper inkubiert. Nach 3 x 10 min Waschen wurde der Blot in der Dunkelkammer 1 min mit dem Chemilumineszenzreagenz inkubiert (Western Blot, Chemiluminescence Reagent Plus NEN<sup>TM</sup>, Boston, USA) Das Reagenz besteht aus einer Luminollösung mit Lumineszenzverstärkern (Phenole) und einer Lösung mit Wasserstoffperoxid. Beide Lösungen wurden entsprechend der Herstellerangaben kurz vor Bedarf 1:1 gemischt. Dann wurde der Blot einige Minuten in der Kodak Photostation (Kodak Image Station 440CF, Eastman Kodak Company) exponiert und die eNOS

Bandenstärke densitometrisch ausgewertet. Die Identifikation der eNOS Proteinbande erfolgte mittels Protein-Größenstandards. Auf den meisten Blots waren auch Banden anderer Größe zu sehen, wobei die eNOS Bande stets die deutlichste Intensität zeigte (Abb. 14).

TBS-T-Lösung pH 8,0:

Tris	3,0 g
NaCl	11,1 g
Tween 20	1 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml



**Abb. 14: Repräsentatives Polyacrylamid-Gel zur Darstellung der eNOS Proteindetektion mittels Western Blot.** Konfluente EA.hy926 Zellen wurden lysiert, die Gesamtproteine nach Denaturation gelelektrophoretisch aufgetrennt und das eNOS Protein mittels spezifischer Antikörper immunologisch detektiert (Methoden). Zur Identifikation des eNOS Proteins wurden Protein-Größenmarker aufgetragen.

## C. Methodenentwicklungen

---

### 1 L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay in intakten Endothelzellen

#### 1.1 Grund der Methodenentwicklung

Der L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay an Endothelzellen wurde schon 1992 (Lamas et al., 1992) beschrieben. Durch Einsatz von radioaktiven L-Arginin kann die eNOS bedingte Produktion von L-Citrullin gemessen werden. Dies gibt Aufschluss über die eNOS Aktivität und indirekt über die eNOS bedingte NO-Bildung. In bis dato vielen Arbeiten wurde die eNOS Aktivität aus einem Zelllysate (Huang et al., 2000) und in wenigeren Fällen an intakten Endothelzellen (Heller et al., 1999) bestimmt. Der Vergleich der eNOS Aktivität/L-Citrullinproduktion von unterschiedlich vorbehandelten Zellen ist in intakten Zellen wesentlich physiologischer als im Zelllysate, da die Aktivität u.a. von Protein-Protein Wechselwirkungen, intrazellulär verfügbaren Mengen an Cofaktoren und der intrazellulären Lokalisation des eNOS-Proteins abhängt (A.4.2). Die Aktivitätsbestimmung in intakten Endothelzellen erfolgte bisher stets durch Abtrennung des radioaktiven Citrullins vom radioaktiven Arginin auf einer Kationenaustauschersäule (meistens: Dowex AG-50W-X8, Serva). Dabei wird das neutrale Citrullin von der Säule eluiert und im z.B.  $\beta$ -Counter gemessen, während das basische Arginin auf der Säule bleibt.

Unser Ziel war es physiologisch möglichst angenähert die eNOS L-Citrullinproduktion und somit indirekt die eNOS bedingte NO-Produktion zu erfassen. Für diesen Zweck weist die oben beschriebene Methode, welche die radioaktiven Aminosäuren mittels Kationenaustauschersäule abtrennt mehrere Nachteile auf:

- Es wird nur das radioaktive Citrullin gemessen, nicht aber das radioaktive Arginin. Deshalb gibt diese Methode keinen Aufschluss darüber, ob eine erhöhte Citrullinmenge nur durch eine erhöhte Argininaufnahme in die Zelle bedingt ist, oder durch eine tatsächlich erhöhte Enzymaktivität bzw. Enzymmenge.
- Das Ergebnis stützt sich nur auf die gemessene Radioaktivität im  $\beta$ -Counter. Es gibt keine Kontrolle, ob die gemessene Radioaktivität tatsächlich ausschließlich durch L-Citrullin bedingt ist.

- Die Methode ist sehr teuer, wenn Kits verwendet werden. Wenn ohne Kits gearbeitet wird, ist die Methode sehr zeitaufwendig und es ist von der Handhabung äußerst schwierig, viele Proben auf einmal zu bearbeiten.

Die neue, für unsere Zwecke verbesserte Methode sollte auf folgenden Prinzipien beruhen bzw. den folgenden Ansprüchen genügen:

- Messung der eNOS Aktivität/ L-Citrullinproduktion in intakten Zellen.
- Trennung der radioaktiven Aminosäuren mittels Dünnschichtchromatographie.
- Selektive und optisch überprüfbare Detektion des radioaktiven L-Citrullins, des radioaktiven L-Arginins sowie möglicher anderer radioaktiver Produkte.
- Hohe Sensitivität, um auch die basale eNOS L-Citrullinproduktion in Zellen messen zu können.
- Geringer Kosten- und Zeitaufwand für einen großen zeitgleichen Probendurchsatz ( $\approx 30-40$  Proben).

Bevor im Anschluss auf die genaue Optimierung der Versuchsparameter eingegangen wird, soll nun kurz der prinzipielle Ablauf der Methode geschildert werden.

Die Endothelzellen wurden nach Ablauf der Stimulationszeit (20 h) zunächst mit PBS gewaschen und dann in HEPES-Puffer ca. 45 min äquilibriert. Anschließend wurden die Zellen mit radioaktivem Arginin geladen, danach mit dem Calciumionophor A23187 aktiviert. Nach einer gewissen Zeit wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Arginin/Citrullin Umwandlungsreaktion durch Zugabe von eiskaltem Ethanol gestoppt. Dann wurden die radioaktiven Aminosäuren durch  $H_2O/EtOH$  Zugabe aus den Zellen extrahiert und dieser Zellüberstand ( $\approx 2$  ml) über Nacht im Speed Vac eingedampft. Aus dem Pellet wurden am nächsten Tag die radioaktiven Aminosäuren herausgelöst und die Lösung auf eine DC aufgetragen. Nach der Chromatographie wurden die Platten mittels Phosphoimager ausgewertet.

### 1.2 Zellvorbereitung

In 6-Loch-Platten wurden am Tag 0  $0,4 \times 10^6$  EA.hy926 Zellen/ Loch in 5 ml Medium pipettiert. Der Versuch wurde dann am Tag 5 durchgeführt.

### 1.3 Lösungen / Substanzen

HEPES-Puffer pH 7,4:

Hepes	10 mM
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
Glucose	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM

Ninhydrinreagenz:

Ninhydrin	30 mg
n-Butanol	10 ml
Essigsäure 98 % (v/v)	0,3 ml

[<sup>14</sup>C]L-Arginin: 11581 MBq/ Millimol (NEN<sup>TM</sup> Life Science Products, Boston USA)

### 1.4 Optimierung verschiedener Versuchsparameter

#### 1.4.1 Dünnschichtchromatographische Trennung

Zur dünnschichtchromatographischen Trennung wurde eine Polygram SIL N-HR Dünnschichtplatte (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet und das stark polare Laufmittel Chloroform/Methanol/Ammoniak/25%/Wasser (0,5:4,5:2,0:1,0) verwendet. Die Platten wurden 60 min in das Laufmittel gestellt und nach 30 min Trocknen bei Raumtemperatur für die Auswertung weiterbearbeitet. Abb. 15 zeigt eine DC-Platte mit den nichtradioaktiven Aminosäuren L-Arginin, Hydroxy-L-Arginin und L-Citrullin nach Besprühen mit Ninhydrinreagenz. Diese Platte wurde gemacht, um die radioaktiven Banden eindeutig den Aminosäuren zuordnen zu können. Die Platte zeigt direkt unterhalb von L-Citrullin Hydroxy-L-Arginin, welches das Zwischenprodukt der eNOS vermittelten L-Arginin/L-Citrullinumwandlung ist.

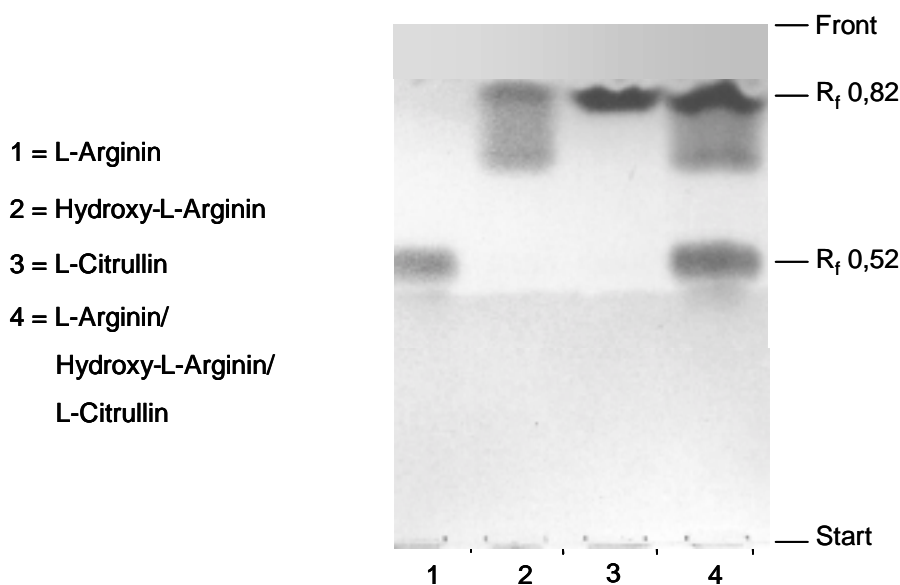
#### 1.4.2 Menge an [<sup>14</sup>C]L-Argininzugabe

Ein [<sup>14</sup>C]L-Arginin Substratüberschuss ist Voraussetzung für richtige Messungen der eNOS Enzymaktivität bzw. der L-Citrullinproduktion. Deshalb war Ziel dieses Versuches zu ermitteln, ab welcher Menge [<sup>14</sup>C]L-Arginin im Überschuss vorliegt, so dass das Substrat [<sup>14</sup>C]L-Arginin für die Reaktion nicht limitierend ist.

Um dies festzustellen wurden auf äquivalent behandelte Zellen steigende Konzentrationen (immer Faktor 2) an [<sup>14</sup>C]L-Arginin gegeben und jeweils sowohl die

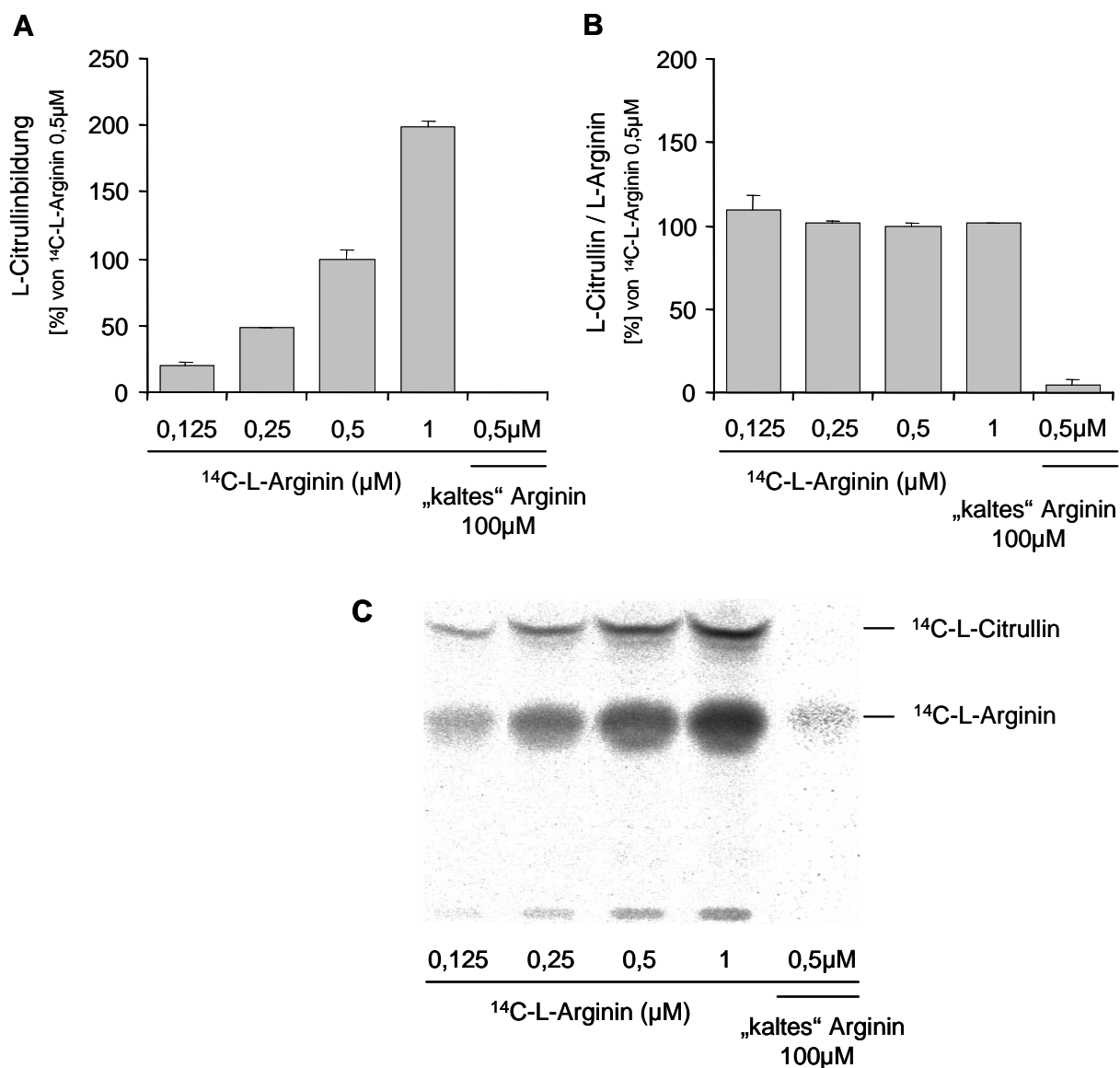
[<sup>14</sup>C]L-Citrullinproduktion als auch der Quotient [<sup>14</sup>C]L-Citrullin/[<sup>14</sup>C]L-Arginin in der Zelle gemessen. Ein Gleichbleiben dieses Quotienten über mehrere Konzentrationen bedeutet optimale Bedingungen, da hier die eNOS-Aktivität unabhängig von der Substratmenge ([<sup>14</sup>C]L-Arginin) ist. Daraus kann der Umkehrschluss gezogen werden, dass bei diesen [<sup>14</sup>C]L-Argininkonzentrationen bei doppelter eNOS Aktivität oder doppelter eNOS Menge auch doppelt soviel [<sup>14</sup>C]L-Citrullin gebildet werden kann. Abb. 16A zeigt, dass die [<sup>14</sup>C]L-Citrullinmenge proportional zur [<sup>14</sup>C]L-Argininzugabemenge (0,125 µM-1 µM) anstieg. Gleichzeitig zugegebenes „kaltes“ Arginin (100 µM) konkurrierte mit [<sup>14</sup>C]L-Arginin um die Aufnahme in die Zelle, so dass erwartungsgemäß kein [<sup>14</sup>C]L-Arginin in der Zelle detektiert werden konnte. Abb. 16B zeigt, dass der Quotient [<sup>14</sup>C]L-Citrullin/[<sup>14</sup>C]L-Arginin bei unterschiedlichen [<sup>14</sup>C]L-Argininzugabemengen (0,125 µM-1 µM) stets gleich blieb.

Da [<sup>14</sup>C]L-Arginin sehr teuer ist und prinzipiell die Strahlenbelastung so gering wie möglich gehalten werden sollte, wurde für alle weiteren Versuche [<sup>14</sup>C]L-Arginin 0,32 µM eingesetzt, da diese Konzentration einerseits im unteren proportionalen Bereich andererseits auch noch sensitiv genug für die basale L-Citrullindetektion ist (C1.4.3)



**Abb. 15: Dünnschichtchromatographische Trennung von L-Arginin, Hydroxy-L-Arginin und L-Citrullin.** Es wurden je 10 µg Substanz aufgetragen, die Polygram SIL N-HR DC-Platte 60 min im Fließmittelsystem Wasser/Chloroform/Methanol/Ammoniak 25% (1/0,5/4,5/2 v/v/v/v) laufen gelassen und mit 10 ml Ninhydrinreagenz besprüht.





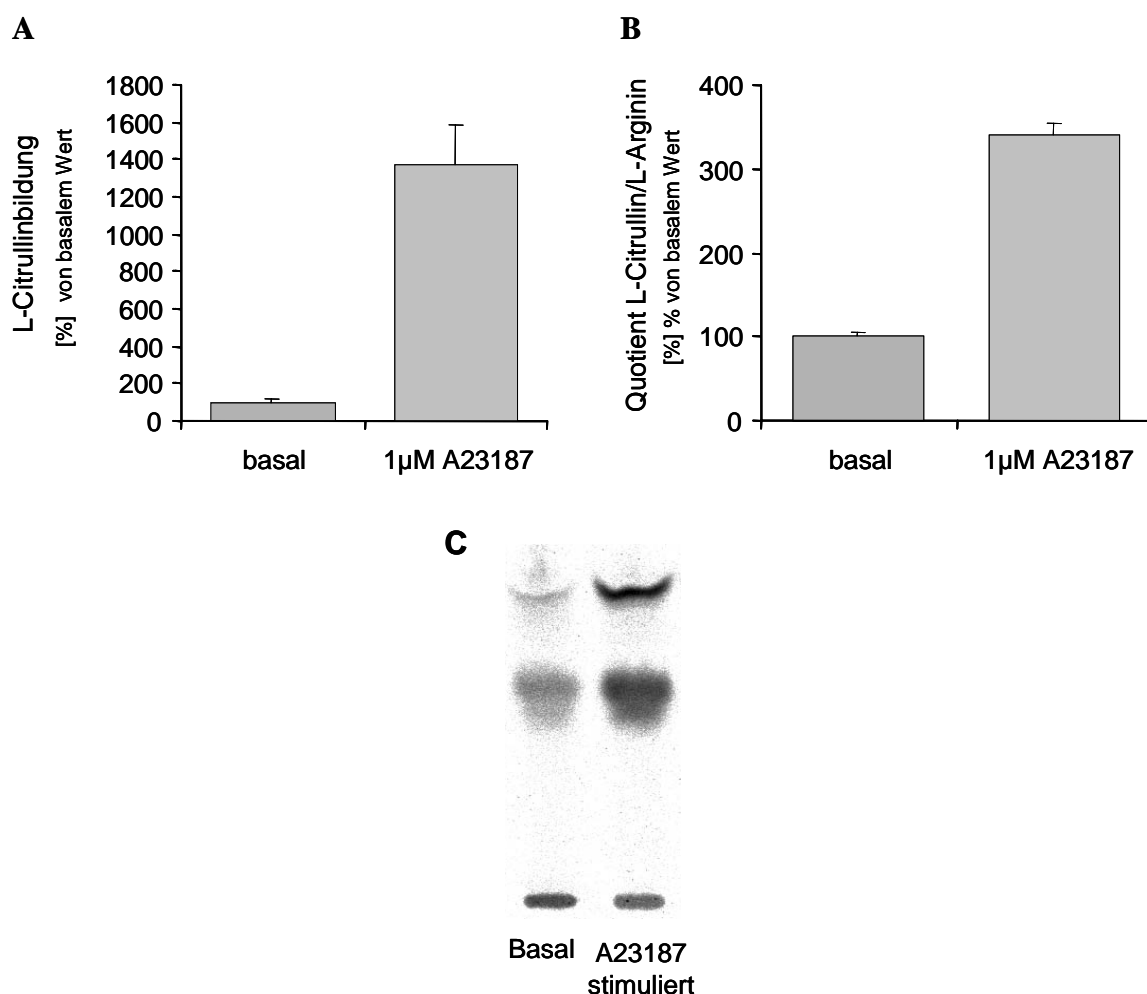
**Abb. 16: Abhängigkeit der  $[^{14}\text{C}]$ -Citruillinbildung von der eingesetzten  $[^{14}\text{C}]$ -L-Argininkonzentration.** Zu EA.hy926 Zellen in 6-well Platten mit 1 ml HEPES-Puffer wurden unterschiedliche Mengen  $[^{14}\text{C}]$ -L-Arginin (0,125  $\mu\text{M}$ -1  $\mu\text{M}$ ), sowie 0,5  $\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ -L-Arginin im Gemisch mit 100  $\mu\text{M}$  „kaltem“ Arginin gegeben. Nach zehn Minuten wurde 1  $\mu\text{M}$  A23187 zugegeben und die Reaktion nach weiteren 15 min mit eiskaltem EtOH (99% V/V) abgebrochen. **A:**  $[^{14}\text{C}]$ -Citruillinbildung in % des Wertes bei eingesetzten 0,5  $\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ -L-Arginin. **B:** Quotient  $[^{14}\text{C}]$ -Citruillin/ $[^{14}\text{C}]$ -L-Arginin in % des Wertes bei eingesetzten 0,5  $\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ -L-Arginin. Die Abbildungen in A und B zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem Experiment in Triplikaten. **C:** Bild einer exemplarischen DC-Platte nach Detektion mit dem Phosphoimmager.

### 1.4.3 Einsatz des Calciumionophors A23187

Die eNOS wird unter anderem über  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin reguliert. Darum wurde das Calciumionophor A23187 eingesetzt, welches durch Calciumeinstrom in die Zelle die intrazelluläre Calciumkonzentration deutlich erhöht. Die Anlagerung von Calcium an Calmodulin bewirkt eine derartige Konformationsänderung des Calmodulins, dass es sich an die eNOS anlagert und deren Enzymaktivität erhöht (Förstermann, 1994).

Ziel war es nun einerseits den Unterschied zwischen basaler und A23187 stimulierter eNOS-Aktivität festzustellen, andererseits die Versuchsbedingungen so zu wählen, dass beide Aktivitäten in einem Experiment gemessen werden können. In dem Experiment von Abb. 17 wurden die Zellen bis auf die nur teilweise erfolgte Zugabe von A23187 exakt gleich behandelt und aufgearbeitet. Nach Zugabe von A23187 stieg die [ $^{14}\text{C}$ ]L-Citrullinbildung um ca. das 13-fache (Abb. 17A), während der Quotient [ $^{14}\text{C}$ ]L-Citrullin/[ $^{14}\text{C}$ ]L-Arginin nur um ca. das 3,5-fache stieg (Abb. 17B). Dieses Ergebnis hat zwei grundlegende Bedeutungen:

Zum einen bestätigt die eNOS Aktivitätssteigerung nach Zugabe von A23187 deutlich die Aussagekräftigkeit dieser Methode unter den gewählten Versuchsbedingungen. Zum anderen verdeutlicht der hier aufgezeigte Unterschied der [ $^{14}\text{C}$ ]L-Citrullinproduktionserhöhung ( $\approx 13$ -fach) im Vergleich zur Erhöhung des [ $^{14}\text{C}$ ]L-Citrullin/[ $^{14}\text{C}$ ]L-Arginin Quotienten ( $\approx 3,5$ -fach,  $\approx$  eNOS Aktivität) besonders den Vorteil dieser DC-Methode im Vergleich zur herkömmlichen Säulenchromatographie. Wie Abb. 17C zeigt, ist die  $\approx 13$ -fache Erhöhung der [ $^{14}\text{C}$ ]L-Citrullinproduktion zum Großteil durch eine erhöhte [ $^{14}\text{C}$ ]L-Argininaufnahme und so erhöhtes intrazelluläres [ $^{14}\text{C}$ ]L-Argininangebot bedingt.

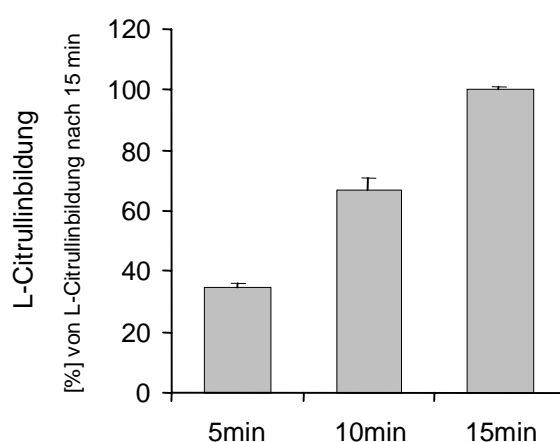


**Abb. 17: Einfluss des Calciumionophors A23187 auf die [ $^{14}$ C]L-Citrullinbildung.** Nach 10 Minuten Inkubation mit [ $^{14}$ C]L-Arginin wurden EA.hy926 Zellen entweder weitere 15 min mit 1  $\mu$ M A23187 behandelt oder die gleiche Zeit basal belassen. **A:** [ $^{14}$ C]L-Citrullinbildung in % vom basalen Wert. **B:** Quotient [ $^{14}$ C]L-Citrullinbildung/[ $^{14}$ C]L-Argininmenge in % vom basalen Wert. Die Abbildungen in A und B zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD aus einem Experiment in Triplikaten. **C:** Bild einer exemplarischen DC-Platte nach Detektion mit dem Phosphoimmager.

#### 1.4.4 Reaktionsdauer

Als nächstes sollte eine geeignete Reaktionsdauer gefunden werden. Dazu wurden die Zellen mit [ $^{14}$ C]L-Arginin 10 min vorinkubiert, dann 1  $\mu$ M A23187 zugegeben und die Reaktion nach 5 min, 10 min und 15 min abgebrochen. Abb. 18 zeigt, dass die [ $^{14}$ C]L-Citrullinproduktion kontinuierlich mit der Reaktionsdauer zunimmt ( $R^2=0,999$ , Gerade nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die EA.hy926 Zellen mindestens 15 min kontinuierlich NO

bilden und nicht auf Grund der suboptimalen Kultivierungsbedingungen während des Versuches (z.B. 60 min kein Medium, sondern nur HEPES-Puffer, kein Brutschrank mit CO<sub>2</sub>) die eNOS Aktivität in irgendeiner Weise verändert wird. Es ist daher bei allen Zeitpunkten möglich von der Menge der [<sup>14</sup>C]L-Citrullinproduktion quantitativ auf die eNOS Aktivität oder eNOS Enzymmenge zu schließen. Für alle weiteren Experimente wurde die Reaktionszeit 15 min gewählt, da bei dieser längeren Zeit die unvermeidbaren kleinen Reaktionszeitunterschiede auf Grund von Pipetiervorgängen am geringsten ins Gewicht fallen. Außerdem ist nach 15 min mehr [<sup>14</sup>C]L-Citrullin gebildet, so dass die Methode sensitiver wird.



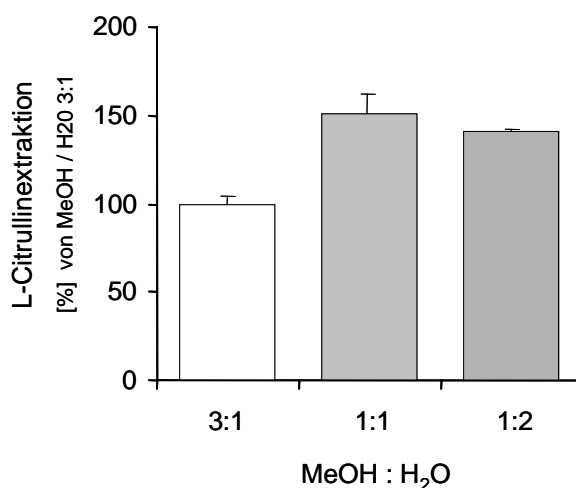
**Abb. 18** Abhängigkeit der [<sup>14</sup>C]L-Citrullinbildung von der Reaktionsdauer. EA.hy926 Zellen wurden 10 min mit 0,32 µM [<sup>14</sup>C]L-Arginin inkubiert, dann 1 µM A23187 zugegeben und die Reaktion nach unterschiedlicher Dauer (5 min, 10 min, 15 min) abgebrochen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD der [<sup>14</sup>C]L-Citrullinbildung in % von dem Wert nach 15 min Reaktion mit A23187 von einem Experiment in Triplikaten.

### 1.4.5 [<sup>14</sup>C]L-Citrullin-/ [<sup>14</sup>C]L-Argininextraktion aus den Zellen

Die radioaktiven Aminosäuren müssen nach Reaktionsabbruch möglichst quantitativ aus den Zellen herausgelöst werden. Die optimalen Bedingungen wurden empirisch ermittelt (Ergebnisse sind nicht dargestellt). Zunächst wurden die Zellen 30 min in Ethanol 99% (v/v) auf Eis geschüttelt, um die Zellmembranen porös zu machen. Anschließend wurden die Zellen in 20 % Ethanol weitere 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Aminosäuren zu lösen und diese somit aus den Zellen zu extrahieren. Die Lösungen (≈1,8 ml) mit den extrahierten Aminosäuren wurden über Nacht im Speed Vac eingedampft.

### 1.4.6 Herauslösen der Aminosäuren aus einrotiertem Rückstand

Als nächstes sollte ein geeignetes Lösungsmittel zum Herauslösen der Aminosäuren aus dem Pellet nach dem Eindampfen im Speed Vac gefunden werden. In diesem Pellet befinden sich nicht nur die gesuchten Aminosäuren, sondern auch viele andere organische und anorganische Substanzen sowie Zelldebrisbestandteile, welche das Laufverhalten der Aminosäuren auf der DC stören. Wie Abb. 19 zeigt, eignet sich als Lösungsmittel MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 sehr gut, da hier zum einen die Extraktionsausbeute an L-Citrullin sehr hoch ist und zum anderen die suspensionsartige Beschaffung der Lösung auf Grund von Zelldebrisbestandteilen geringer als bei MeOH/H<sub>2</sub>O 1:2 ist (DC nicht gezeigt).



**Abb. 19: Lösungseigenschaften des [<sup>14</sup>C] L-Citrullin aus dem Zellpellet nach Behandlung mit unterschiedlichen Lösungsmitteln.** Zellpellets von gleichbehandelten Kontrollzellen wurden mit unterschiedlichen Lösungsmitteln je 5 min auf dem Schüttler und 15 min im Ultraschallbad gelöst. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD der absolut herausgelösten [<sup>14</sup>C]L-Citrullinmenge in % vom Wert bei MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 von einem Experiment in Triplikaten.

### 1.5 Auswertung im Phosphoimmager

Nachdem die DC-Platten 30 min bei Raumtemperatur trockneten, wurden sie 3 h in ein Kassette auf einen Screen gelegt und danach im Phosphoimmager (Fujix Bio-Imaging Analyser IPR 1500, Fuji Film, Japan) ausgewertet.

### 1.6 Protokoll der Versuchsdurchführung

Am Tag 0 wurden  $0,4 \times 10^6$  EA.hy926 Zellen pro Loch in 6-Lochplatten in 5 ml Medium ausgesät. Stimuliert wurde am Tag 4 für 20 h. Am Tag 5 wurden nach 20 h Stimulation das Medium abgesaugt, die Zellen zunächst mit HEPES-Puffer gewaschen, dann 45 min in 1 ml HEPES-Puffer bei 37°C inkubiert und danach mit  $0,32 \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]L-Arginin für 10 min versehen. Nach Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  A23187 erfolgte für weitere 15 min eine Inkubation bei 37°C. Dann wurden die Zellen auf Eis gestellt, der HEPES-Puffer abgesaugt, 2 x mit 1 ml PBS gewaschen und  $800 \mu\text{l}$  eiskalter Ethanol 99% (v/v) zugegeben. Die Zellen wurden erst 30 min auf Eis geschüttelt (Schüttelzahl 100), dann 5 min bei 37 °C inkubiert, dann 10 min bei RT geschüttelt (Schüttelzahl 100) und dann je  $600 \mu\text{l}$  vom Ethanol-Zellüberstand in ein 2 ml ERG überführt. Dann wurden  $1000 \mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O auf die Zellen gegeben, 30 min geschüttelt (Schüttelzahl 100), der gesamte Zellüberstand zu den  $600 \mu\text{l}$  Ethanol in das 2 ml ERG dazugegeben und die ERG zum Einrotieren über Nacht in einen Speed Vac gestellt. Am nächsten Morgen wurden zum Pellet  $35 \mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) gegeben, dann die ERG 5 min geschüttelt (Schüttelzahl 200), anschließend 20 min in ein Ultraschallbad gestellt und danach 5 min zentrifugiert ( $10000 \times g$ ). Vom Überstand wurden  $20 \mu\text{l}$  in ein kleines ERG überführt, kurz zentrifugiert und der Überstand auf eine Polygram SIL N-HR DC-Platte aufgetragen. Die DC wurde im Laufmittel Wasser/Chloroform/Methanol/Ammoniak 25% (1/0,5/4,5/2 v/v/v/v) 60 min laufen gelassen, 30 min getrocknet, 3 h in einer Kassette auf einen Screen gelegt und dann im Phosphoimager ausgewertet.

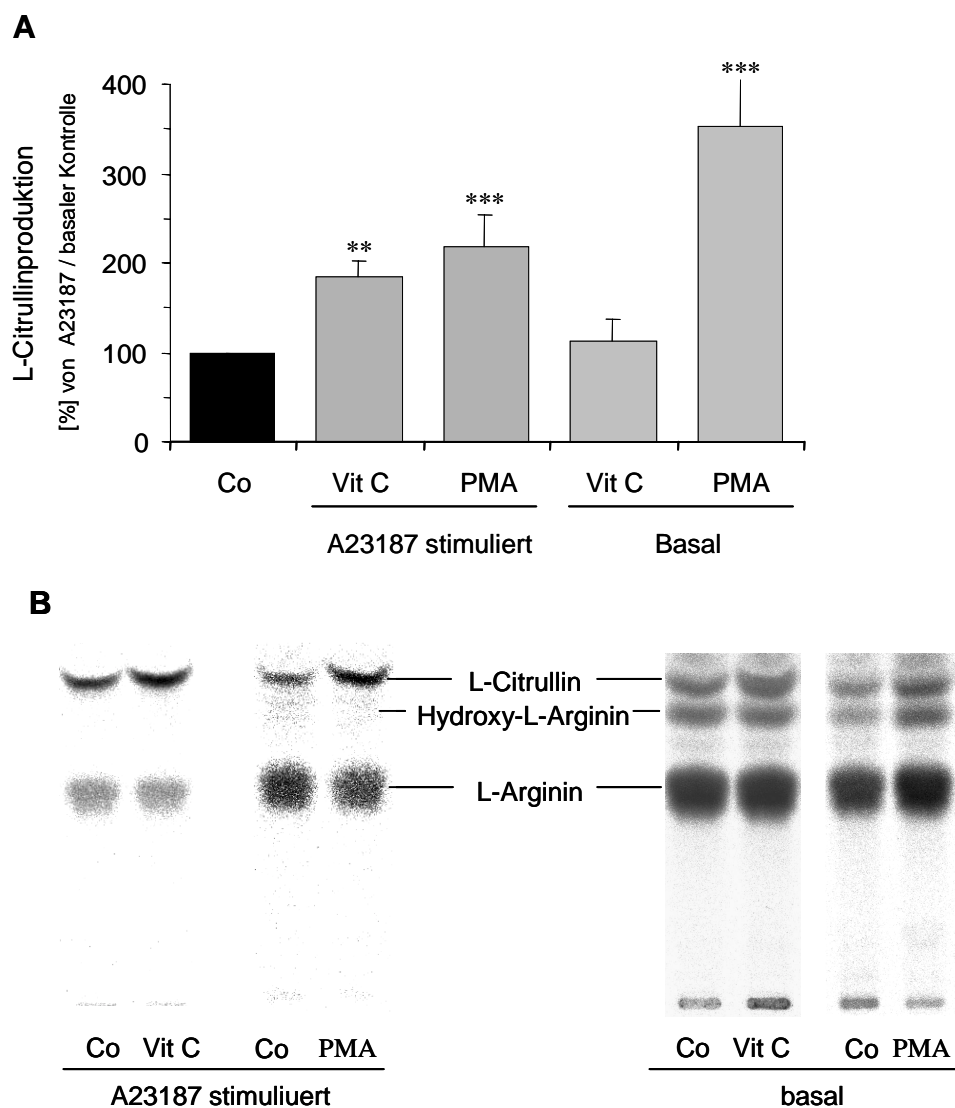
Abweichende Versuchsdurchführungen:

- Messung der basalen L-Citrullinproduktion: Hier wurde kein A23187 zugegeben, so dass die Reaktion 25 min nach Zugabe von [ $^{14}\text{C}$ ]L-Arginin abgebrochen wurde. Die DC-Platte wurde 18 h auf den Screen gelegt.
- Hemmung der eNOS durch N<sup>G</sup>-Amino-L-Arginin (NGG): Nach 30 min Inkubation mit HEPES-Puffer, wurden für 15 min  $200 \mu\text{M}$  NGG zugegeben, die Zellen 2 x mit HEPES-Puffer gewaschen, auf die Zellen 1 ml HEPES-Puffer gegeben, dann  $0,32 \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]L-Arginin zugegeben und wie oben weiterverfahren.

### 1.7 Bestätigung der Methode durch Positivkontrollen/Hemmer

Um die Aussagekräftigkeit und Richtigkeit der Methode zu untermauern, wurden Versuche mit Positivkontrollen PMA (Montecinos *et al.*, 2000) und Vitamin C (Heller *et al.*, 1999) durchgeführt. Wie in Abb. 20A gezeigt, konnte die basale eNOS Aktivität von PMA (2 nM, 20 h) signifikant ( $\approx 3,5$ -fach), die A23187 stimulierte eNOS Aktivität

sowohl durch Vitamin C (100  $\mu$ M, 5 h) als auch durch PMA (2 nM, 20 h) signifikant erhöht werden ( $\approx 1,8 / 2,2$ ). Wie Abb. 20B zeigt ist dies auch optisch nach Detektion im Phosphoimmager gut wahrnehmbar.



**Abb. 20: Messung der [ $^{14}$ C]L-Citrullinproduktion nach Stimulation mit Positivkontrollen.** EA.hy926 Zellen wurden mit Vitamin C (100  $\mu$ M / 5 h) oder mit PMA (2 nM / 20 h) stimuliert. Die [ $^{14}$ C]L-Citrullinproduktion wurde basal oder nach Zugabe von A23187 gemessen. A: [ $^{14}$ C]L-Citrullinproduktion in % von der basalen bzw. A23187 behandelten Kontrolle. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs (A23187 stimuliert) bzw. zwei (basal) unterschiedlichen Experimenten in Triplikaten. Signifikanzen: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  nach ANOVA/Dunnet Berechnung. B: Exemplarische DC-Platten nach Detektion im Phosphoimmager.

## 2 DAF-2 Fluoreszenzassay zur Messung der endothelialen NO-Freisetzung

### 2.1 Grund der Methodenentwicklung

Von entscheidender Bedeutung bei der Forschung auf dem Gebiet der eNOS ist, dass man endothelial gebildetes NO mit einer zuverlässigen, einfachen und sensitiven Methode messen kann. Eine Möglichkeit ist die Fluoreszenzspektroskopie, wobei nicht fluoreszierende Verbindungen mit dem NO-Radikal zu einer fluoreszierenden Verbindung reagieren. Ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher zur NO-Detektion eingesetzt wird ist 4,5-Diaminofluoreszein (DAF-2) und seine membrangängige, lipophile Form 4,5-Diaminofluoreszeindiacetat (DAF-2 DA). In Anwesenheit von O<sub>2</sub> reagiert es mit 2 mol NO zum Triazolofluoreszein (DAF-2T) (Nakatsubo *et al.*, 1998). Von der intrazellulären, endothelialen NO-Detektion mit DAF-2 DA wurde in vielen Arbeiten Gebrauch gemacht (Navarro-Antolin *et al.*, 2001), (Nakatsubo *et al.*, 1998; Goetz *et al.*, 1999). Hingegen gibt es seit der ersten Veröffentlichung der extrazellulären Messung von endothelialen NO mittels DAF-2 im Jahr 1998 (Nakatsubo *et al.*, 1998) nur eine weitere Publikationen mit Anwendung dieser Methode (Bai *et al.*, 2001). Die seltene Anwendung dieser Methode ist sehr verwunderlich, da sie im Vergleich zu anderen NO-Detektionsmethoden (z.B. ESR-Spektroskopie, Chemilumineszenz, NO-Elektrode) wesentlich einfacher wäre und vor allem nur eine deutlich billigere apparative Laborausstattung erfordert. Auch uns gelang es nicht, extrazellulär NO aus EA.hy926 Zellen nach dem 1998 beschriebenen Protokoll (Nakatsubo *et al.*, 1998) zu messen.

Die intrazelluläre NO-Messung mittels DAF-2 DA wurde vor kurzem in Frage gestellt (Broillet *et al.*, 2001). Diese Gruppe behauptete, dass die Reaktion von DAF-2 zu DAF-2T durch die Anwesenheit von zweiwertigen Ionen wie Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> beeinflusst wird. Da z.B. die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in Endothelzellen durch externe Stimuli (z.B. Histamin, A23187, Bradikinin) stark verändert wird, wäre eine aussagekräftige NO-Messung mittels DAF-2 DA nicht mehr möglich. Diese Behauptung wurde allerdings kurz darauf von einer anderen Gruppe zurückgewiesen (Suzuki *et al.*, 2002).

Zusammengefasst war die Ausgangssituation also: Intrazellulär kann endotheliales NO mittels DAF-2 DA mit einer apparativ aufwendigen und von manchen angezweifelt Methode gemessen werden, während die extrazelluläre Messung mittels DAF-2 unter den angegebenen Bedingungen methodisch fehlerhaft zu sein scheint.



Deshalb war es unser Ziel ein Protokoll zu entwickeln, bei der man mittels DAF-2 extrazelluläres endotheliales NO messen kann. Diese Methode sollte folgende Vorteile gegenüber der intrazellulären DAF-2 DA und sonstigen Methoden haben:

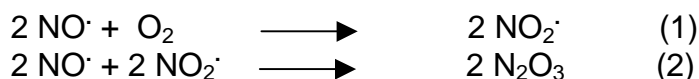
- Selektive NO-Messung, unabhängig von intrazellulären Ionenkonzentrationen (sind extrazellulär durch vorherige PBS-Äquilibration gleich)
- Extrazelluläres NO ist physiologisch bedeutender als intrazelluläres: NO vermittelt die meisten seiner physiologischen Wirkungen außerhalb der Endothelzellen.
- Die extrazelluläre endotheliale NO-Messung mittels DAF-2 wäre die bisher einzige Methode, die in „normal“ ausgestatteten Laboren (ein Fluoreszenzmessgerät ist auf Grund seiner universalen Einsetzbarkeit meist vorhanden) durchführbar ist. Sowohl intrazelluläre NO Messung mit DAF-2 DA mittels konvokalem Fluoreszenzmikroskop, als auch die ESR-Spektroskopie und Chemilumineszenzmessung und die elektrochemische Detektion benötigen zum einen extrem teure analytische Geräte, zum anderen sind auch diese Methoden sehr störanfällig (siehe A.3.2).

### 2.2 Zellvorbereitung

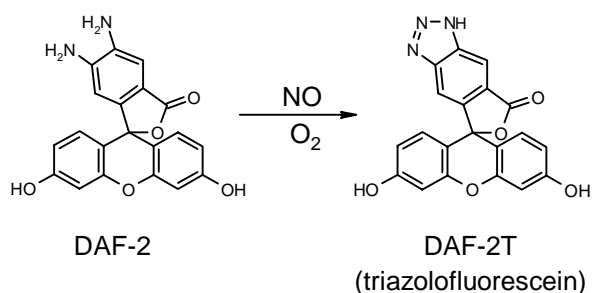
EA.hy926 Zellen wurden am Tag 0 mit  $0,4 \times 10^6$  Zellen in 5 ml Medium pro Loch in 6-Lochplatten ausgesät. Der DAF-2-Versuch wurde dann am Tag 5 durchgeführt.

### 2.3 Mechanismus der Reaktion von DAF-2 zu DAF-2T mittels NO

DAF-2 reagiert nicht direkt mit NO zu DAF-2T, sondern mit einem Oxidationsprodukt von NO, dem starken Nitrosieragenz  $N_2O_3$ . Dies entsteht im Verlauf der Sauerstoff-Oxidation von  $NO\cdot$  zu  $NO_2\cdot$  (Abb. 21). Aus Gründen der Vereinfachung wird im nachfolgenden Text oftmals geschrieben: „die Bildung von DAF-2T durch NO“. Abb. 22 zeigt die Reaktionsgleichung der Umsetzung von DAF-2 zu DAF-2T.



**Abb. 21: Reaktion von  $NO\cdot$  Mit  $O_2$**  (Kojima *et al.*, 1998a)



**Abb. 22: Reaktionsgleichung der Umsetzung von DAF-2 in DAF-2T**

## 2.4 Lösungen

Das DAF-2 Reagenz (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) wurde wie vom Hersteller angegeben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und erst unmittelbar vor Gebrauch in 0,1 M Phosphatpuffer verdünnt. Der NO-Donor MAHMA.NONONOate (NOC-9) wurde ebenfalls von Alexis bezogen und vor Gebrauch in eiskalter 0,01 M NaOH gelöst.

## 2.5 Optimierung verschiedener Versuchsparameter

### 2.5.1 DAF-2 Konzentration

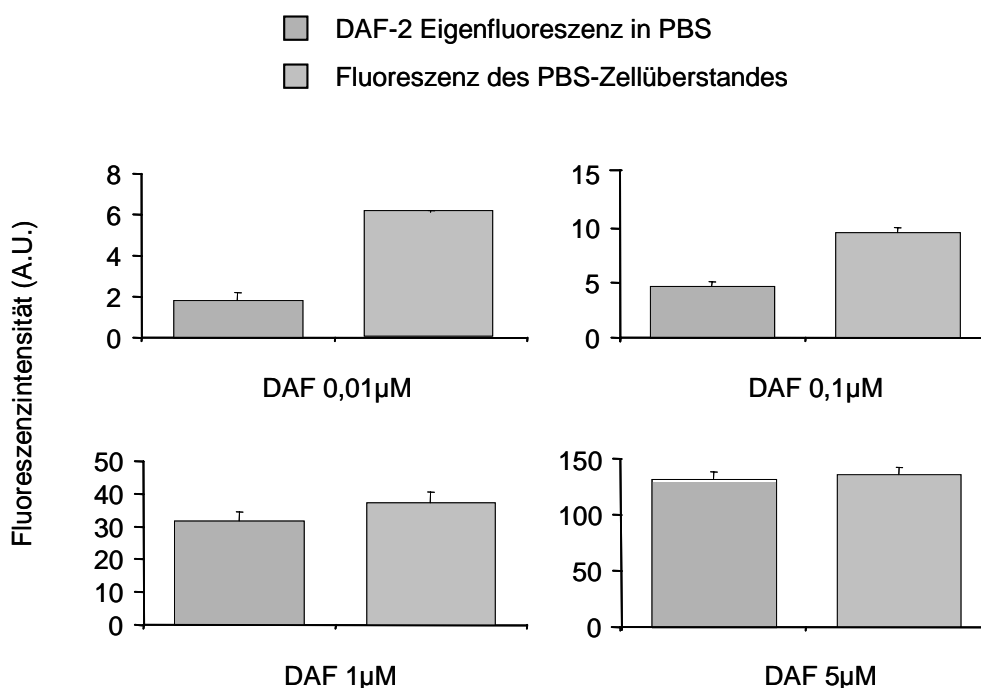
Nachdem es uns nicht gelang, endotheliales NO unter den publizierten (Nakatsubo *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 2001) Bedingungen (DAF-2 10  $\mu\text{M}$ ) zu messen, stellten wir folgende Überlegung an:

Auch wenn sich DAF-2 und DAF-2T in Ihrer Fluoreszenzstärke sich erheblich unterscheiden (bei Extinktion 492 nm ist die relative Fluoreszenz von DAF-2T  $\approx 180$  x größer als die von DAF-2, siehe: (Kojima *et al.*, 1998a), (Kojima *et al.*, 1998b) sind Ihre Absorptions- und Fluoreszenzmaxima beinahe identisch (Kojima *et al.*, 1998a), (Kojima *et al.*, 1998b). Folglich beinhaltet eine DAF-2T Messung simultan auch eine DAF-2 Messung. Diese Simultanmessung spielt in Systemen mit viel NO keine Rolle, da das nicht mit NO abreagierte DAF-2 wegen der  $\approx 180$ -fach stärkeren Fluoreszenz von DAF-2T vernachlässigt werden kann. Handelt es sich aber um ein System mit extrem wenig NO-Generierung, wie bei Endothelzellen, kann diese Simultanmessung stören. Reagiert beispielsweise nur 0,1 % der eingesetzten DAF-2 Menge mit NO zu DAF-2T ab, erhöht sich die Gesamtfluoreszenz rein rechnerisch nur um 17 %, was kaum als signifikante Erhöhung nachweisbar wäre.

Die Überlegung war nun, dass bei niedrigen NO-Konzentrationen der prozentuale Anteil an DAF-2, der zu DAF-2T reagiert, bei geringeren DAF-2 Konzentrationen zunehmen müsste und somit die Gesamtfluoreszenz stärker ansteigen müsste.

Deshalb wurden zu A23187 stimulierten EA.hy926 Zellen unterschiedliche DAF-2 Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$ ) gegeben und jeweils nach 5 min die Fluoreszenz des PBS-Zellüberstandes gemessen. Parallel wurde jeweils die Eigenfluoreszenz von DAF-2 (0,01  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$ ) in PBS gemessen. Wie erwartet waren bei höheren DAF-2 Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ) die beiden Fluoreszenzwerte annähernd gleich, während bei niedrigen DAF-2 Konzentrationen (0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ ) die Fluoreszenzen des PBS-Zellüberstandes deutlich höher waren als die DAF-2 Eigenfluoreszenz (Abb. 23).

Somit konnte die NO-Produktion von EA.hy926 Zellen mittels DAF-2 (0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden. Für alle weiteren Versuche wurde 0,1  $\mu\text{M}$  DAF-2 eingesetzt, da hier die absoluten Fluoreszenzintensitäten etwas höher als bei DAF-2 0,01  $\mu\text{M}$  sind, wodurch die Messfehler geringer werden. Insgesamt ist allerdings zu bemerken, dass auch diese Methode nur knapp oberhalb der Detektionsgrenze liegt, da die gemessenen Fluoreszenzwerte von 5-10 A.U. nur durch Einstellung aller Geräteparameter auf die empfindlichsten Stufen erreicht werden konnten (siehe C2.6).



**Abb. 23: DAF-2 Eigenfluoreszenz und Fluoreszenz des PBS-Zellüberstandes in Abhängigkeit der eingesetzten DAF-2 Konzentration.** ECV304 Zellen wurden 5 min in PBS vorinkubiert, dann wurde 1  $\mu\text{M}$  A23187 und die angegebenen DAF-2 Konzentrationen zugegeben und nach 5 min die Fluoreszenz gemessen. Parallel wurde die DAF-2 Eigenfluoreszenz in PBS gemessen. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

### 2.5.2 Subtraktion der DAF-2 Eigenfluoreszenz

Bezüglich der Methodenoptimierung stellten wir folgende Überlegung an. Wäre es möglich DAF-2 von der gemessenen Gesamtfluoreszenz abzuziehen ? Dies hätte folgende Vorteile:

- Indirekt selektive Messung von DAF-2T. Nur DAF-2T interessiert, da dies mit der NO-Menge korreliert.
- Durch Subtraktion der DAF-2 Eigenfluoreszenz werden bei zwei Proben mit unterschiedlicher NO/DAF-2T Bildung die absoluten Unterschiede der Fluoreszenzen größer. Dadurch könnten sensitiver Differenzen der NO/DAF-2T Bildung nachgewiesen werden.

Die Subtraktion der DAF-2 Eigenfluoreszenz ist allerdings nur möglich, wenn durch das endotheliale NO nahezu kein DAF-2 verbraucht wird. In diesem Fall wäre das im Zellüberstand fluoreszierende nicht verbrauchte DAF-2 annähernd konstant und entspräche der DAF-2 Eigenfluoreszenz.

Darum sollte als nächstes der genaue DAF-2 Verbrauch bei A23187 stimulierten EA.hy926 Zellen in 6-Lochplatten bestimmt werden. Darüber hinaus sollte noch ermittelt werden, bis zu welcher NO-Menge so wenig DAF-2 verbraucht wird, dass man die DAF-2 Eigenfluoreszenz subtrahieren kann. Für diese Fragen wurde folgende Experimente durchgeführt:

- Erstellung einer Eichgeraden von DAF-2T in PBS
- Messung der Fluoreszenzen im Zellüberstand nach Zugabe von steigenden Konzentrationen des NO-Donors NOC-9.

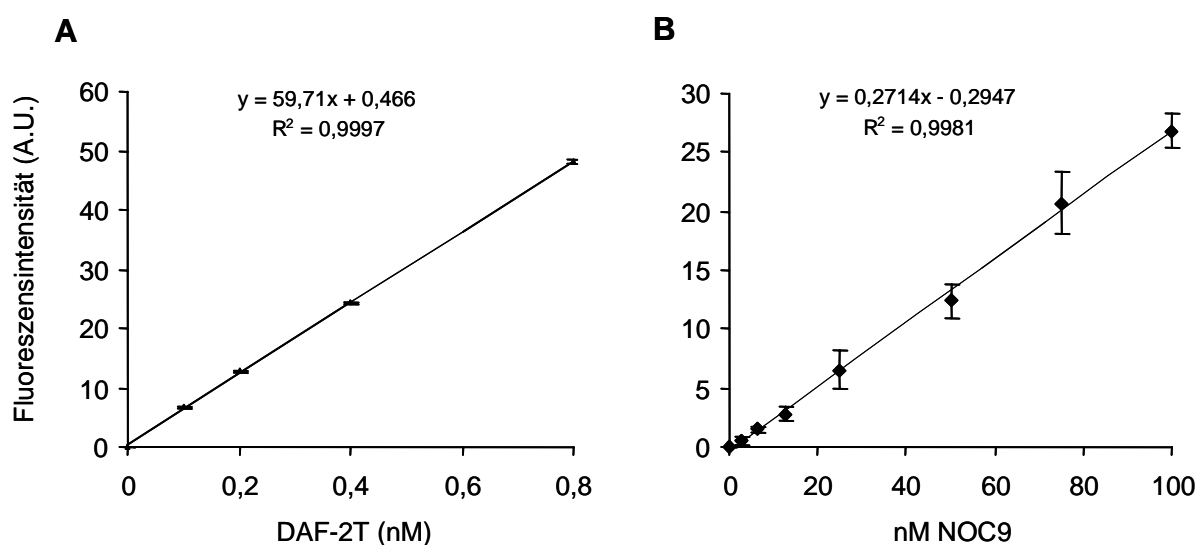
Abb. 24A zeigt die Fluoreszenzintensitäten von DAF-T (0,1-0,8 nM, Alexis-Corporation) in PBS. Abb. 24B zeigt die Fluoreszenzen in Zellüberständen nach Zugabe von steigenden Konzentrationen des NO-Donors NOC-9, wobei 1 mol NOC-9 innerhalb von 5 min bei 37 °C in wässrigem Medium ca. 2 mol NO frei setzt (Keefer et al., 1996).

Um den Verbrauch an DAF-2 auszurechnen wurde mit Hilfe der beiden Eichgeraden die genaue stöchiometrische Reaktion von NO mit DAF-2 berechnet. Die Zugabe von 200 nM NO ergab eine Fluoreszenz von 26,8 A.U. (Abb. 24B). Abb. 24A weist eine Fluoreszenz von 26,8 (A.U.) bei 0,44 nM DAF-2T auf. Folglich verbrauchten in diesem System 200 nM NO nur 0,44 nM DAF-2. Das bedeutet nun, dass von den eingesetzten 100 nM DAF-2 weniger als 1 % verbraucht wurden und somit noch mehr als 99% der eingesetzten DAF-2-Menge im PBS-Zellüberstand vorliegen.

Dieser Verbrauch an DAF-2 kann vernachlässigt und deshalb die DAF-2 Eigenfluoreszenz von der Gesamtfluoreszenz subtrahiert werden.

Die lineare Korrelation der gemessenen Fluoreszenzwerte mit den eingesetzten NOC-9 Konzentrationen (bis 100 nM, Abb. 24B) untermauert, dass in diesem Bereich die gebildete DAF-2T Menge mit der NO-Menge linear korreliert.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist gezeigt, dass die Subtraktion der Eigenfluoreszenz bei einem Einsatz von 0,1  $\mu\text{M}$  DAF-2 und einer NO-Konzentration von <200 nM möglich ist. Diese Bedingungen sind in allen folgenden Experimenten erfüllt, da die gemessene Fluoreszenz der Zellüberstände stets deutlich unter 26,8 (A.U.), also 200 nM NO war.



**Abb. 24: Eichgeraden von DAF-2T (A) und von der Fluoreszenzintensität nach Zugabe des NO-Donors NOC-9 auf PBS-Zellüberstände (B).** A: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der gemessenen Fluoreszenz (A.U.) der angegebenen DAF-2T Konzentrationen in PBS von einem Experiment in Vierfachbestimmung. B: Fluoreszenzintensität in PBS-Zellüberständen (DAF-2 0,1  $\mu\text{M}$ ) in Abhängigkeit der NO-Freisetzung von dem NO-Donor NOC-9. Die Zellen wurden 5 min mit 100  $\mu\text{M}$  L-Arginin in PBS vorinkubiert, dann wurde DAF-2 (0,1  $\mu\text{M}$ ) und die angegebenen NOC-9 Konzentrationen zugegeben. Nach 5 minütiger Reaktion im Dunklen wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten. Die DAF-2 (0,1  $\mu\text{M}$ ) Eigenfluoreszenz wurde jeweils abgezogen.

### 2.6 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in der Publikation (Leikert *et al.*, 2001) dargestellt. In 6-Lochplatten mit  $0,4 \times 10^6$  pro Loch ausgesäte EA.hy926 Zellen wurden am Tag 4 20 h mit den Testsubstanzen stimuliert. Nach 20 h Stimulation wurden die Zellen am Tag 5 2 x mit 1 ml PBS gewaschen, 5 min mit 100  $\mu\text{M}$  L-Arginin in PBS bei 37 °C inkubiert, dann wurden 1  $\mu\text{M}$  A23187 und 0,1  $\mu\text{M}$  DAF-2 zugegeben und die Zellen 5 min inkubiert (37°C, im dunklen). Dann wurde die Fluoreszenz des Zellüberstandes in einer Glasküvette bei einer Extinktionswellenlänge von 491 nm und einer Absorptionswellenlänge von 515 nm mit einem Fluoreszenzspektroskop gemessen (RF 1501, Shimadzu, Japan). Die Spaltbreite bei Extinktion und Absorption war je 10 nm und die Sensitivität war auf „Hoch“ eingestellt. Parallel wurde 0,1  $\mu\text{M}$  DAF-2 5 min mit 100  $\mu\text{M}$  L-Arginin in PBS (37°C, im dunklen) inkubiert und dann die DAF-2 Eigenfluoreszenz gemessen.

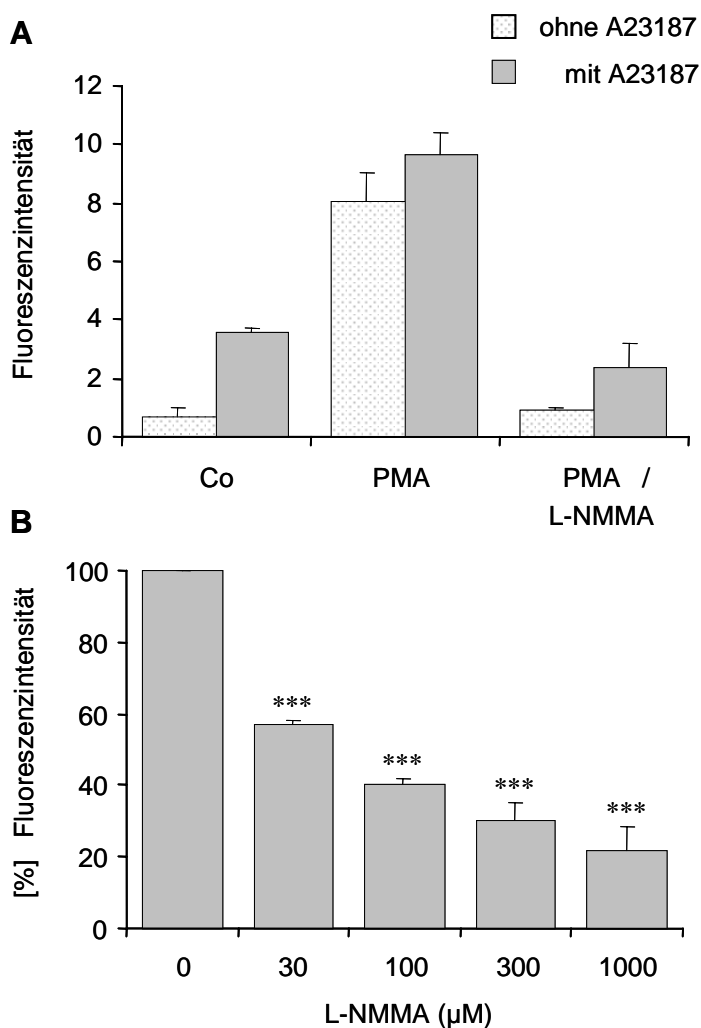
Abweichende Versuchsdurchführungen:

- Messung der basalen NO-Freisetzung: Hier wird das obige Protokoll ohne Zugabe von A23187 durchgeführt.
- Hemmung der NO-Freisetzung mit den eNOS-Hemmern N<sup>G</sup>-monomethyl-L-Arginin (NMMA) und N<sup>G</sup>-Amino-L-Arginin (NAA): NMMA wurde ab der Inkubation mit L-Arginin (100  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. NAA wurde 15 min vor dem Waschen und dann noch mal ab der Inkubation mit L-Arginin (100  $\mu\text{M}$ ) zugegeben.

### 2.7 Bestätigung der Methode durch Positivkontrollen/Hemmer

Um die Aussagekräftigkeit und Richtigkeit der Methode zu untermauern, wurden Versuche mit Positivkontrollen PMA (Montecinos *et al.*, 2000), dem Calciumionophor A23187, sowie dem kompetitiven eNOS Hemmer L-NMMA (Alderton *et al.*, 2001) durchgeführt. Wie Abb. 25A eindrucksvoll zeigt, erhöhte sowohl A23187 (1  $\mu\text{M}$ ) als auch PMA (2 nM) die durch NO-vermittelte DAF-2T Fluoreszenz. Mit L-NMMA konnte eine dosisabhängige signifikante Hemmung der NO-vermittelten Fluoreszenz erzielt werden Abb. 25B.

Diese Methode wurde in FEBS Letters 506 (2001) 131-134 veröffentlicht (Leikert *et al.*, 2001).



**Abb. 25: DAF-2 detektierte NO-Freisetzung von EA.hy926 Zellen nach PMA-Behandlung in Abwesenheit oder Anwesenheit von A23187 und L-NMMA.**

A: Die Zellen wurden entweder nicht behandelt (Co) oder mit PMA (2 nM) für 18h stimuliert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min in 100 µM L-Arginin in PBS, wenn angegeben gleichzeitig noch mit 1 mM L-NMMA inkubiert. Danach wurde, wenn angegeben A23187 (1 µM) zugegeben und dann DAF-2 (0,1 µM). Nach 5 minütiger Reaktion im Dunklen wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. B: Die Zellen wurden 18h mit PMA (2 nM) stimuliert, mit PBS gewaschen und 5 min mit L-Arginin (100 µM) und L-NMMA (1 mM) in PBS vorinkubiert. Danach wurde A23187 (1 µM) und DAF-2 (0,1 µM) zugegeben und nach 5 minütiger Reaktion wurde die Fluoreszenz gemessen. In B sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei Experimenten dargestellt. Signifikanzen: \*\*\*  $P < 0,001$  nach ANNOVA/Bonferroni Berechnung.

## D. Ergebnisse

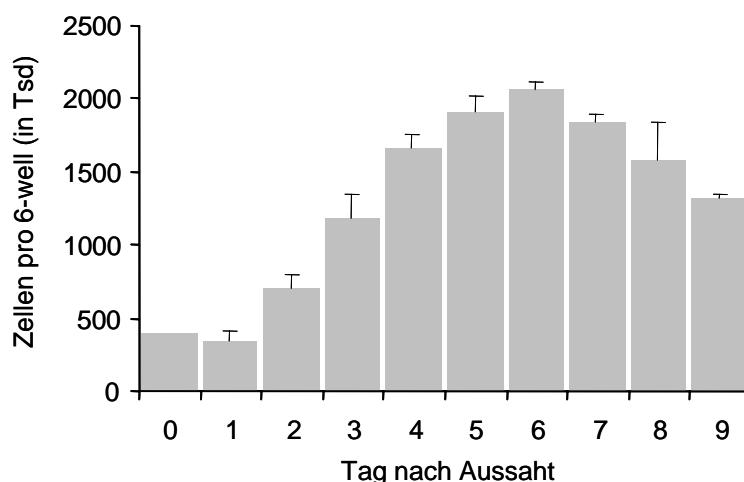
---

### 1 Ermittlung des optimalen Zellproliferationsgrads

#### 1.1 Zeitabhängige Zellproliferation

Um alle Experimente bei einem vergleichbaren und möglichst physiologischen Zellproliferationsgrad durchzuführen, wurden Experimente zur Zellproliferation in Abhängigkeit der Zellkultivierungszeit bei EA.hy926 Zellen durchgeführt. Wie Abb. 26 zeigt, proliferierten die Zellen unter den gewählten Bedingungen von Tag 1 bis Tag 4 stark und von Tag 4 bis Tag 6 nur noch schwach. Ab Tag 6 reduzierte sich die Zellzahl bedingt durch sterbende Zellen. Auf Grund dieses Ergebnisses wurden alle Experimente in dieser Arbeit in der langsamen Zellproliferationsphase von Tag 4 bis Tag 5 durchgeführt, wobei am Tag 4 stimuliert und am Tag 5 die Zellaufarbeitung durchgeführt wurde.

Das Sterben der Zellen ab Tag 6 trat auf Grund von FKS-/Mediummangel ein und konnte durch Zugabe von Medium am Tag 5 unterdrückt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 26: Zeitabhängige Zellproliferation.** EA.hy926 Zellen wurden am Tag 0 (400 Tsd/ well) ausgesät und täglich die Anzahl der Zellen pro Well gezählt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD von drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten

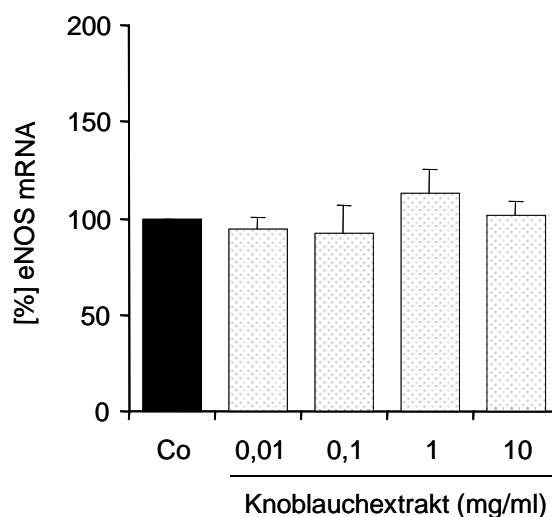


## 2 Einfluss von Knoblauch auf die eNOS

In zahlreichen klinischen Studien, Experimenten am Tier und *in vitro* Untersuchungen wurden nicht übereinstimmende Ergebnisse bezüglich möglicher protektiver kardiovaskulärer Eigenschaften des Knoblauchs gefunden (A.5.1). Diese nicht übereinstimmende Ergebnisse betreffen auch die oft postulierten gefäßerweiternden Eigenschaften des Knoblauchs (A.5.1). Um weitere Hinweise bezüglich dieser potentiellen Eigenschaften zu erhalten, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Knoblauch auf die eNOS in Endothelzellen untersucht.

### 2.1 Einfluss von Knoblauchextrakt auf den eNOS mRNA-Level

Um eine mögliche Langzeitwirkung von Knoblauchextrakt auf die eNOS zu überprüfen, wurde der konzentrationsabhängige Effekt von Knoblauchextrakt nach 20 h Stimulation auf die eNOS-mRNA in EA.hy926 Zellen mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Wie Abb. 27 zeigt, hatte Knoblauchextrakt (0,01-10 mg/ml) keinen Einfluss auf die eNOS mRNA-Menge im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.



**Abb. 27: Einfluss von Knoblauchextrakt auf die eNOS mRNA:** Zellen wurden nicht behandelt (Co) oder 18 h mit Knoblauchextrakt (0,01 mg/ml – 10 mg/ml) stimuliert. Nach RNA-Isolierung und Northern Blot-Analyse wurden die radioaktiven Blots im Phosphoimager ausgewertet (Material und Methoden). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

### 2.2 Einfluss von isolierten Knoblauchinhaltsstoffen, -Metaboliten

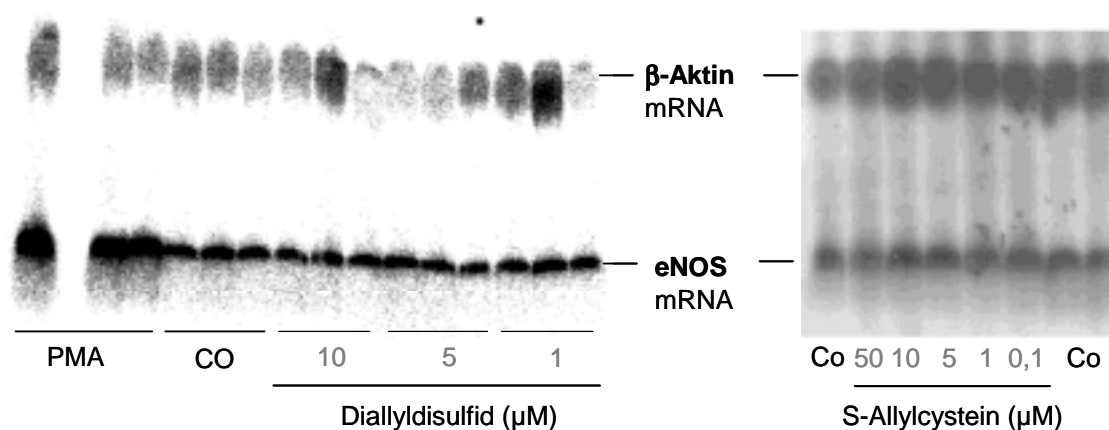
Der Effekt eines Vielstoffgemisches, wie des Knoblauchextraktes, auf ein Target kann auf Grund gegensätzlicher Wirkungen der einzelnen Komponenten insgesamt null sein. Außerdem unterliegen die schwefeligen Knoblauchextraktinhaltsstoffe im Körper einem starken Metabolismus. Deshalb wurde der Effekt von isolierten schwefelhaltigen Knoblauchextraktinhaltsstoffen (Diallyldisulfid, Ajoen, S-Allylcystein) und Metaboliten (Diallyldisulfid, Allylmercaptan) auf die eNOS untersucht.

#### 2.2.1 Keine Wirkung auf die eNOS mRNA

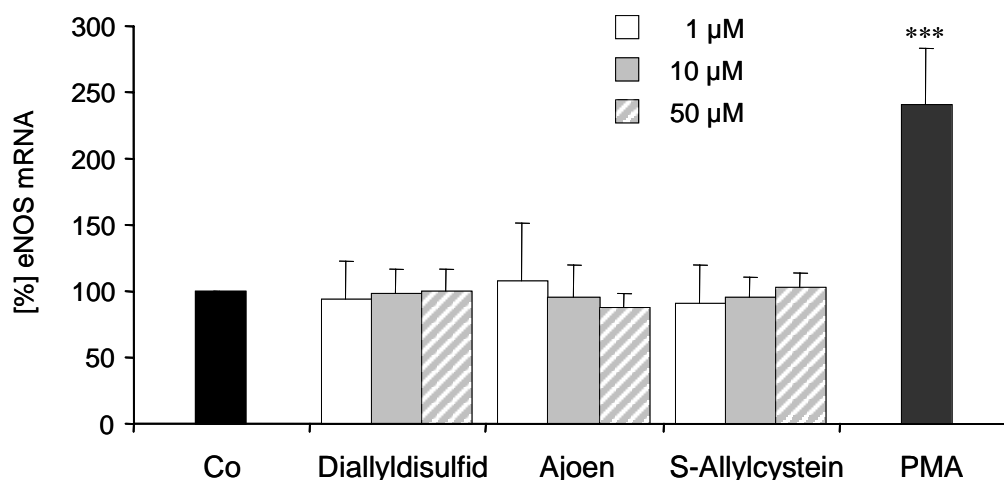
EA.hy926 Zellen wurden 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Diallyldisulfid, S-Allylcystein und Ajoen stimuliert. Abb. 28 zeigt repräsentative Northern Blots nach Detektion mit dem Phosphoimmager. Man sieht, dass bei der Positivkontrolle PMA die eNOS mRNA-Bande deutlich stärker ist, während Diallyldisulfid und S-Allylcystein die eNOS-mRNA Bandenintensität im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht erhöhen. In Abb. 29 ist die relative eNOS mRNA Menge nach Standardisierung auf  $\beta$ -Aktin dargestellt. Die Knoblauchextraktinhaltsstoffe erhöhten die eNOS mRNA nicht, während die Positivkontrolle PMA (2 nM) eine ca. 2.3-fache Erhöhung bewirkte.

#### 2.2.2 Keine Wirkung auf die eNOS Aktivität/ L-Citrullinbildung

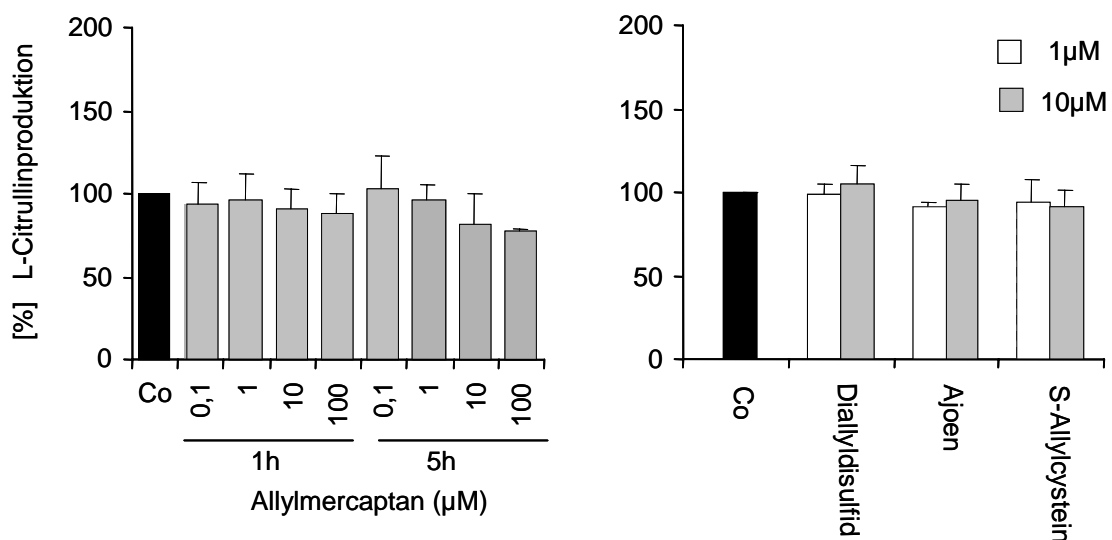
Nachdem die getesteten Knoblauchextraktinhaltsstoffe keine Erhöhung der eNOS mRNA zeigten, sollte nun untersucht werden, ob sie die eNOS Aktivität/L-Citrullinproduktion steigern. Dazu wurden EA.hy926 Zellen 5 h mit Ajoen, Diallyldisulfid und S-Allylcystein (1, 10  $\mu$ M) und Allylmercaptan (0,1-100  $\mu$ M) stimuliert und die eNOS Aktivitäten mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay gemessen. Zusätzlich wurde 1 h mit Allylmercaptan (0,1-100  $\mu$ M) stimuliert, um einen eventuellen noch kurzzeitigeren Effekt zu testen. Keine der getesteten Substanzen zeigte eine Erhöhung der eNOS bedingten L-Citrullinproduktion (Abb. 30).



**Abb. 28: Northern Blots von EA.hy926 Zellen.** Zellen wurden nicht behandelt (Co) oder je 18 h mit PMA (2 nM) oder den angegebenen Konzentrationen Diallyldisulfid- und S-Allylcystein stimuliert. Nach RNA-Isolierung und Northern Blot-Analyse wurden die radioaktiven Gele im Phosphoimmager ausgewertet (Material und Methoden). Die Abbildung zeigt zwei repräsentative Blots.



**Abb. 29: Relative eNOS mRNA Menge (standardisiert auf  $\beta$ -Aktin) nach Stimulation mit isolierten Knoblauchinhaltsstoffen.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit den angegebenen Konzentrationen Diallyldisulfid, Ajoen, S-Allylcystein oder mit PMA (2 nM) stimuliert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$ SD von zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten (Diallyldisulfid, PMA) bzw. von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten (Ajoen, S-Allylcystein). Signifikanzen: \*\*\* P <0,001 nach ANNOVA/Dunnett Berechnung.



**Abb. 30: Einfluss von Knoblauchextraktinhaltsstoffen auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder wurden 5 h bzw. zusätzlich 1 h (Allylmercaptan) mit den Knoblauchextraktinhaltsstoffen stimuliert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen L-Citrullinproduktion aus zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bzw. in Triplikaten (Allylmercaptan). Gemessen wurde die L-Citrullinproduktion mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay (Methodenentwicklungen).

### 3 Einfluss von Weißdornblüten- und Blätterextrakt (WS1442) auf die eNOS

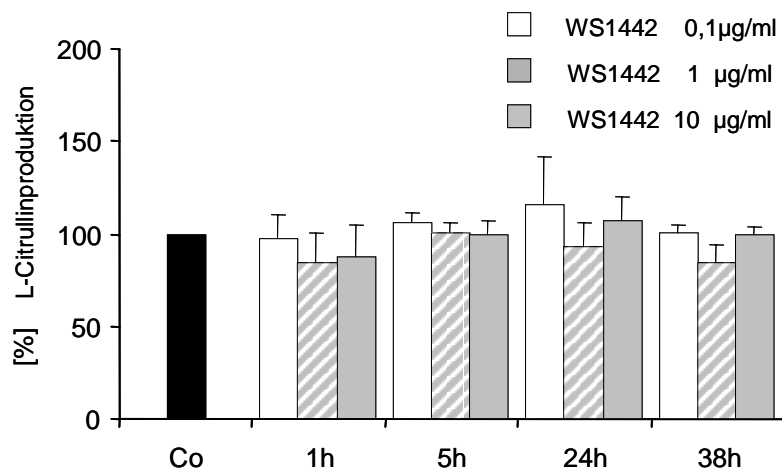
In mehreren klinischen Studien, Tierexperimenten und *in vitro* Untersuchungen wurden positive kardiovaskuläre Effekte von Weißdornextrakten festgestellt (A.5.2). Um einen Hinweis zu bekommen, ob diese Effekte eventuell über die eNOS vermittelt sind, wurde in dieser Arbeit die Wirkung des Weißdornextraktes WS1442 auf die eNOS in Endothelzellen untersucht. Untersucht wurden der Langzeiteffekt (20 h) von WS1442 und der Kurzzeiteffekt (15 min). Bei letzterem ist die Stimulationsdauer vergleichbar wie in den Versuchen mit WS1442 am isolierten Rattenaortenring, die eine Dilatation zeigten (A.5.2).

#### 3.1 Langzeiteffekt von WS1442 auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung

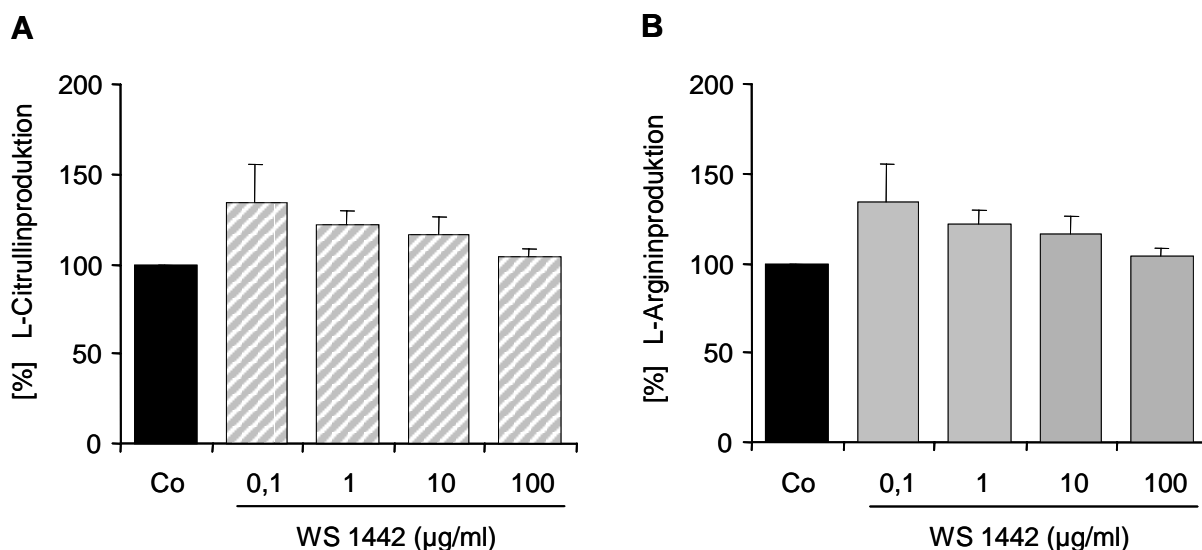
EA.hy926 Zellen wurden unterschiedlich lange (1 h, 5 h, 24 h, 38 h) mit unterschiedlichen Konzentrationen WS1442 (0,1-10 µg/ml) stimuliert. Die eNOS Aktivität/L-Citrullinproduktion wurde mittels dem L-Arginin/L-Citrullinumwandlungsassay ermittelt. Wie Abb. 31 zeigt, erhöht WS1442 weder zeit- noch konzentrationsabhängig die eNOS bedingte L-Citrullinproduktion.

#### 3.2 Kurzzeiteffekt von WS1442 auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung

Um den Kurzzeiteffekt von WS1442 auf die eNOS bedingte L-Citrullinproduktion zu untersuchen, wurden die EA.hy926 Zellen 15 min mit WS1442 stimuliert. Die WS 1442-Zugabe erfolgte zeitgleich mit der Zugabe von A23187. Abb. 32A zeigt, dass WS1442 auf die eNOS L-Citrullinproduktion in EA.hy926 Zellen auch keinen Kurzzeiteffekt hat. Die Erhöhung bei 0,1 µM WS1442 ist nicht signifikant und zum anderen, wie Abb. 32B zeigt, nur auf eine Erhöhung der [<sup>14</sup>C]L-Argininaufnahme zurückzuführen.



**Abb. 31: Langzeit Effekt von WS1442 auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder über die angegebenen Zeiträume mit den angegebenen Konzentrationen WS1442 stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen L-Citrullinproduktion von zwei unabhängigen Versuchen in Triplikaten. Gemessen wurde die L-Citrullinproduktion mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay (Methodenentwicklungen).



**Abb. 32: Kurzeiteffekt von WS1442 auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinproduktion.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 15 min mit den angegebenen Konzentrationen WS1442 stimuliert. Die Stimulation erfolgte zeitgleich mit der A23187 Zugabe. Die Abb. zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen L-Citrullinproduktion von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Es konnten nach ANOVA/ Bonferroni Statistikberechnung keine Signifikanzen berechnet werden. Gemessen wurde die L-Citrullinproduktion mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay (Methodenentwicklungen).

### 4 Wirkung von Soja-Isoflavonen auf die eNOS

In der Vergangenheit bekräftigten epidemiologische Studien und *in vitro* Experimente, dass Soja-Isoflavone positive kardiovaskuläre Eigenschaften haben (A.5.3). In der vorliegenden Arbeit sollte an Endothelzellen untersucht werden, ob diese beschriebenen Effekte eventuell in Zusammenhang mit einer eNOS Beeinflussung stehen könnten.

#### 4.1 Einfluss auf Promotoraktivität

Zunächst wurde der Einfluss der Isoflavone auf die eNOS Promotoraktivität in ECV304 Zellen untersucht.

##### 4.1.1 Zeitabhängige Steigerung

Zuerst wurde mit Genistein (10  $\mu\text{M}$ ) ein Zeitverlauf durchgeführt, um zu wissen wann die maximalen Promotoraktivitätserhöhungen auftreten. Wie Abb. 33 zeigt, steigt die eNOS Promotoraktivität ab 1 h Stimulation mit Genistein kontinuierlich an und erreicht ein Maximum (ca. 1,8-fach) nach 20 h Stimulation. Eine signifikante Erhöhung wurde ab 12 h Stimulation erreicht.

##### 4.1.2 Dosisabhängige Steigerung

Nachdem der Zeitverlauf mit Genistein (10  $\mu\text{M}$ ) eine maximale eNOS Promotoraktivitätserhöhung nach 20 h Stimulation ergab, wurde diese Stimulationsdauer für den Konzentrationsverlauf aller Isoflavone (Genistein, Daidzein, Biochanin A, Equol, Formononetin) gewählt. ECV304 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 – 50  $\mu\text{M}$ ) der Isoflavone stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 34 dargestellt. Alle Isoflavone zeigten eine konzentrationsabhängige Steigerung der eNOS Promotoraktivität. Die maximale Erhöhung wurde stets bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht und betrug zwischen ca. 1,5-fach (Equol) und ca. 2,2-fach (Biochanin). Mit Ausnahme von Equol verminderte sich bei allen Isoflavonen die Promotoraktivitätserhöhung bei 50  $\mu\text{M}$  wieder etwas. Eine Toxizität bei dieser Konzentration kann aber ausgeschlossen werden. Die Positivkontrolle PMA (2 nM) erhöhte die Promotoraktivität um ca. das 2,0-fache.

#### 4.2 Einfluss von Genistein auf die eNOS Proteinmenge

Nachdem die Isoflavone eine signifikante Erhöhung der eNOS Promotoraktivität bewirkten, sollte nun untersucht werden, ob sie auch das eNOS Protein hochregulieren. Wegen des relativ großen Zeitaufwands der Western Blot-Analyse wurden diese Versuche nur mit Genistein, stellvertretend für alle Isoflavone,

durchgeführt. EA.hy926 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Genistein (0,3-30  $\mu\text{M}$ ) 20 h stimuliert und dann wurde mittels Western Blot-Analyse die eNOS Proteinexpression ermittelt. Wie Abb. 37A/B zeigt, beeinflusste Genistein konzentrationsabhängig die eNOS Proteinkonzentration. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  trat eine statistisch signifikante Erhöhung (ca. 1,6-fach) auf, während dann mit steigender Genisteinkonzentration die eNOS Proteinexpression abnahm. Die Positivkontrolle PMA erhöhte signifikant (ca. 2,2-fach) das eNOS Protein.

### 4.3 Einfluss von Genistein und Daidzein auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung

Nachdem Genistein und Daidzein signifikant die eNOS Promotoraktivität und Genistein 1  $\mu\text{M}$  ebenfalls die eNOS Proteinexpression erhöhten, sollte nun untersucht werden ob Genistein und Daidzein die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung beeinflussen. Die Messung der L-Citrullinbildung erfolgte mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay.

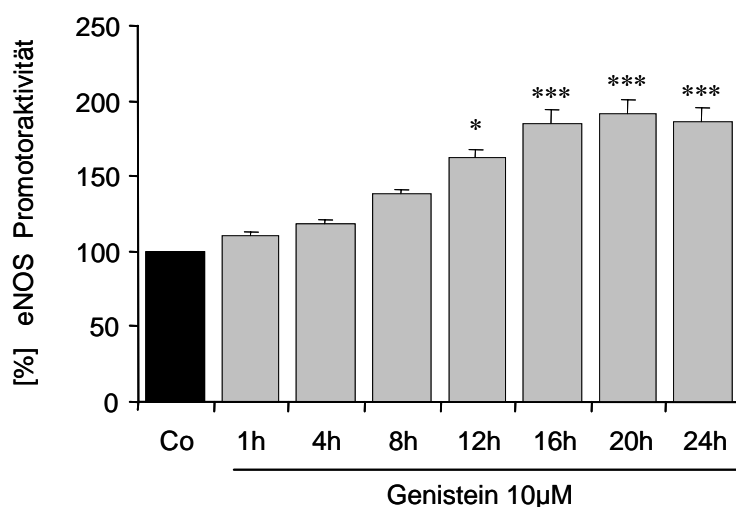
Dazu wurde nach 18 h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen Daidzein und Genistein (jeweils 0,1, 1, 10, 50  $\mu\text{M}$ ) die A23187 stimulierte eNOS L-Citrullinbildung in EA.hy926 Zellen gemessen. Wie Abb. 36A zeigt, konnte Genistein und Daidzein in keiner Konzentration die eNOS L-Citrullinbildung erhöhen. Um sicher zu stellen, dass dieses „negative“ Ergebnis nicht durch die gewählte Stimulationsdauer (18 h) bedingt ist, wurde mit Genistein (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) noch ein Zeitverlauf (1, 16, 20, 24 h) durchgeführt. Doch wie in Abb. 36B zu sehen, konnte mit Genistein auch bei verschiedenen Stimulationszeiten keine erhöhte L-Citrullinproduktion erzielt werden.

### 4.4 Einfluss von Genistein auf die eNOS abhängige NO-Bildung

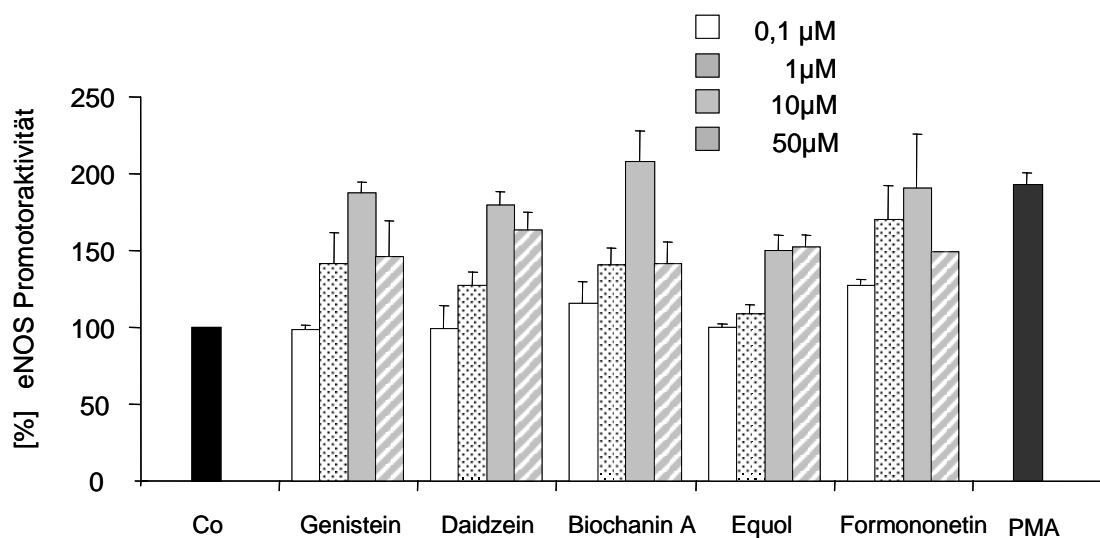
Wie in den vorherigen Punkten beschrieben, konnte an EA.hy926 Zellen nach Stimulation mit Genistein zwar eine erhöhte eNOS Promotoraktivität und Proteinexpression aber keine erhöhte eNOS Aktivität/L-Citrullinproduktion nachgewiesen werden. Um dieses Phänomen zu untermauern, wurde nach der Messung der L-Citrullinproduktion noch eine zweite Endpunktbestimmung, die NO-Messung mittels DAF-2 durchgeführt.

EA.hy926 Zellen wurden 18 h mit Genistein (1, 10  $\mu\text{M}$ ) stimuliert und anschließend wurde die NO-Produktion mit dem DAF-2 Assay gemessen. Wie Abb. 38 zeigt, hatte Genistein auf die NO-Bildung keinen Einfluss.

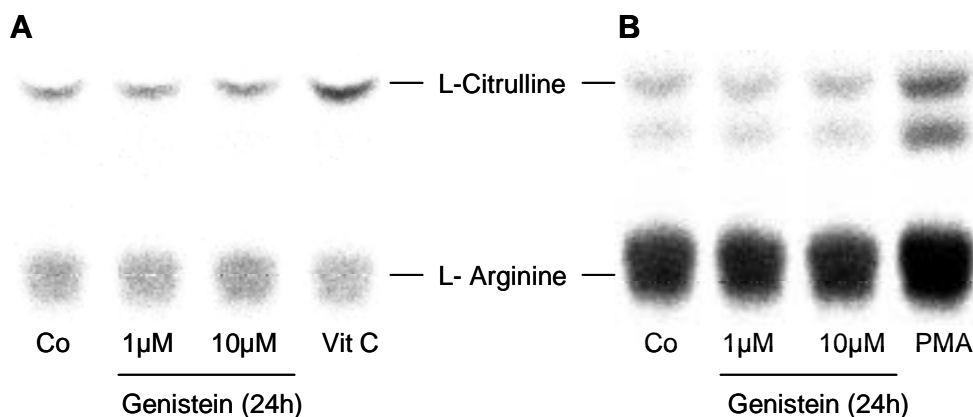




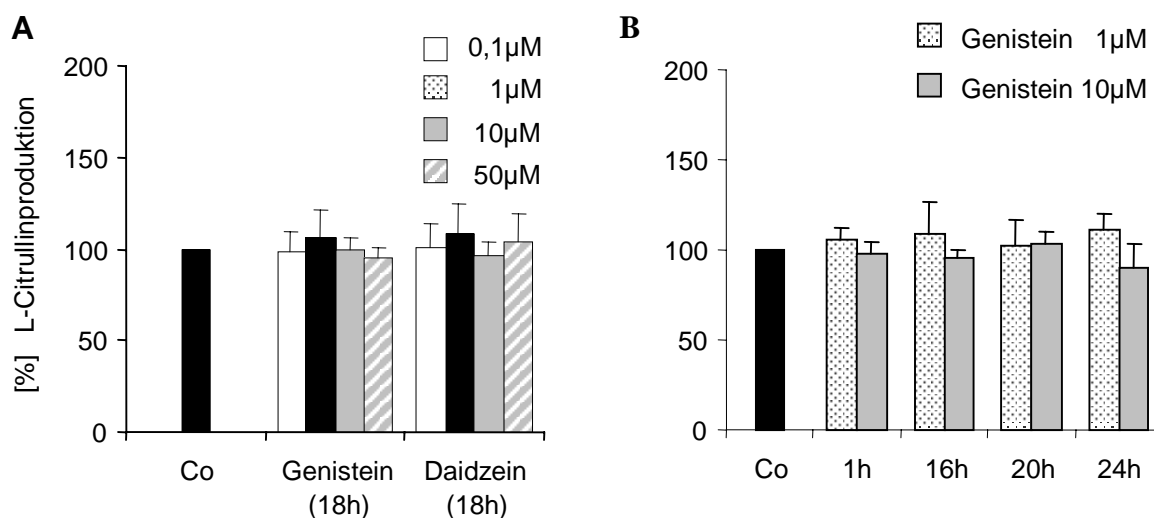
**Abb. 33: Zeitabhängige Steigerung der eNOS Promotoraktivität nach Stimulation mit Genistein 10 µM:** ECV304 Zellen waren unbehandelt (Co) oder verschieden lang (wie angegeben) mit Genistein (10 µM) stimuliert. Die Promotoraktivität wurde mittels Luciferase-Reportergen-Assay (Material und Methoden) ermittelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität von drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Die statistische Berechnung erfolgte mit ANOVA/Dunnett wobei \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  ist.



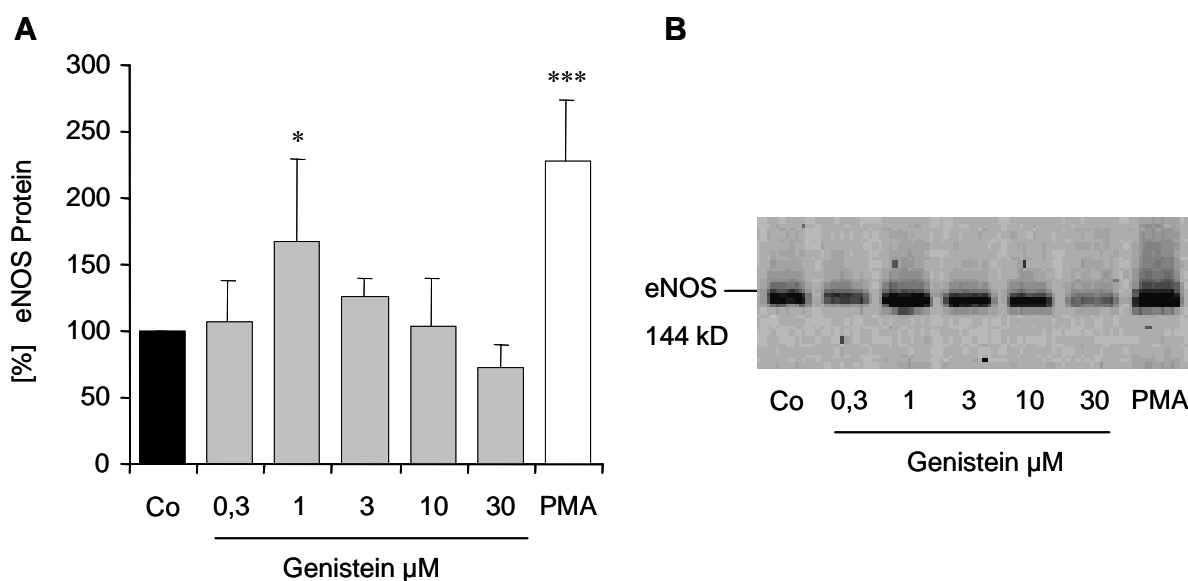
**Abb. 34: Konzentrationsabhängige Steigerung der eNOS Promotoraktivität nach Stimulation mit Isoflavonen.** ECV304 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit den angegebenen Konzentrationen der Isoflavone bzw. PMA (2 nM) stimuliert. Die Promotoraktivität wurde mittels Luciferase-Reportergen-Assay (Material und Methoden) ermittelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität von drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten.



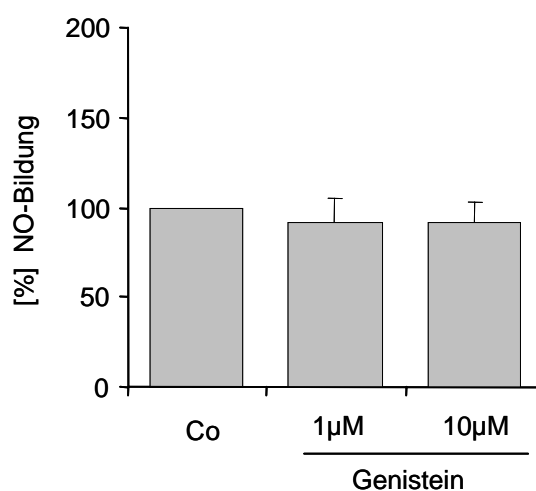
**Abb. 35: Einfluss von Genistein auf die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 24 h mit Genistein (1 μM, 10 μM) und den Positivkontrollen Vitamin C (100 μM) (A) bzw. und PMA (2 nM) (B) stimuliert. Die Abbildungen zeigen je eine repräsentative DC nach Detektion im Phosphoimager, wobei in A die A23187 stimulierte und in B die basale eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung detektiert wurde.



**Abb. 36: Einfluss von Genistein und Daidzein auf die eNOS Aktivität/ L-Citrullinbildung.** Die Messung der A23187 stimulierten L-Citrullinproduktion wurde durchgeführt wie in *Methodenentwicklungen* beschrieben. A: EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit den angegebenen Konzentrationen von Genistein und Daidzein stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen L-Citrullinproduktion aus drei unabhängigen Experimenten in Dublikaten. B: EA.hy926 Zellen waren unbehandelt oder zu unterschiedlichen Zeiten mit Genistein (1, 10 μM) stimuliert. Abbildung B zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen L-Citrullinproduktion aus zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.



**Abb. 37: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Genistein auf die eNOS Expression.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 16 h mit Genistein (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) und PMA (2 nM) stimuliert. Nach Zellyse wurde die eNOS mittels Western Blot nachgewiesen (Material und Methoden). A. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Proteinmenge von drei bzw. sieben (Genistein 1  $\mu\text{M}$ ) unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA/Dunnett durchgeführt, wobei \*  $P < 0,05$  und \*\*\*  $P < 0,001$  ist. B: Die Abbildung zeigt einen repräsentativen von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Western Blots.



**Abb. 38: Einfluss von Genistein auf die endotheliale NO-Bildung.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 20 h mit Genistein (1, 10  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Die NO-Bildung wurde mit dem DAF-2 Assay gemessen (Methodenentwicklungen). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen NO-Bildung aus zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

## 5 Einfluss der Catechingerbstoffe des Grünen Tees EGC / ECG auf die eNOS

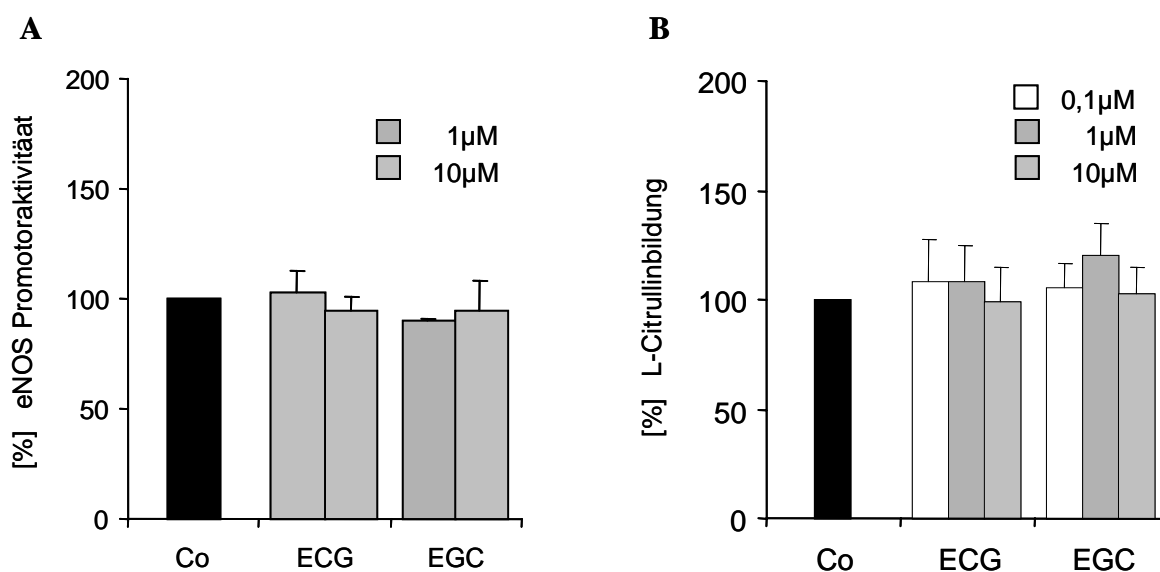
Wie in A.5.4 beschrieben, konnten für grünen Tee vor allem in *in vitro* Modellen einige positive kardiovaskuläre Eigenschaften nachgewiesen werden. Welche Inhaltsstoffe dafür verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch Publikationen, die für isolierte Derivate von Epicatechin positive kardiovaskuläre *in vitro* Eigenschaften, wie Vasodilatation beschreiben (A.5.4). Darum wurde in dieser Arbeit der Einfluss der beiden Epicatechinderivate EGC und ECG auf die eNOS in EA.hy926 Zellen untersucht.

### 5.1 Einfluss auf eNOS Promotoraktivität

Zunächst wurde die Wirkung von ECG und EGC auf die eNOS Promotoraktivität in ECV304 Zellen untersucht. Dazu wurden die ECV304 Zellen 18 Stunden mit ECG und EGC (je 1 und 10  $\mu\text{M}$ ) stimuliert und dann die Promotoraktivität mittels dem Luciferase-Reporter-Gen-Assay gemessen. Wie in Abb. 39A dargestellt, hatten beide Substanzen keine Wirkung auf die eNOS Promotoraktivität.

### 5.2 Einfluss eNOS Aktivität/ L-Citrullinbildung

Nachdem die Epicatechinderivate auf die Promotoraktivität keine Wirkung zeigten, sollte nun untersucht werden ob sie posttranskriptionell oder posttranslationell einen Einfluss auf die eNOS ausüben. Dazu wurden EA.hy926 Zellen 20 h mit verschiedenen Konzentrationen (0,1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) ECG und EGC stimuliert und danach mittels des L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassays die L-Citrullinproduktion gemessen. Das Ergebnis, welches in Abb. 39B dargestellt ist zeigt, dass beide Substanzen die L-Citrullinproduktion nicht erhöhen konnten.



**Abb. 39: Einfluss der Catechingerbstoffe ECG/EGC auf die eNOS Promotoraktivität und eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.** ECV304 Zellen (A) bzw. EA.hy926 Zellen (B) waren unbehandelt (Co) oder 18 h (A) bzw. 20 h (B) mit ECG und EGC mit den angegebenen Konzentrationen stimuliert. A: Dargestellt ist das Ergebnis der eNOS Promotoraktivität, ermittelt mittels Luciferase-Reportergen-Assay (Material und Methoden). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. B: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS L-Citrullinbildung aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten (ECG) bzw. zwei unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmungen (EGC). Die L-Citrullinproduktion wurde mit dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay (siehe Methodenentwicklungen) ermittelt.

## 6 Effekt von Rotwein(extrakten) und isolierten Inhaltsstoffen auf die eNOS

Rotwein schmeckt nicht nur gut, sondern hat, wie in mehreren Studien und experimentellen Arbeiten belegt, auch positive kardiovaskuläre Effekte (A.5.5). Nach kurzfristiger Stimulation mit RWPE wurden u.a. im Modell des isolierten Rattenaortenrings eine Vasodilatation verbunden mit erhöhter Produktion an NO und cGMP gezeigt. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die eNOS durch Rotwein bzw. RWPE beeinflusst werden könnte.

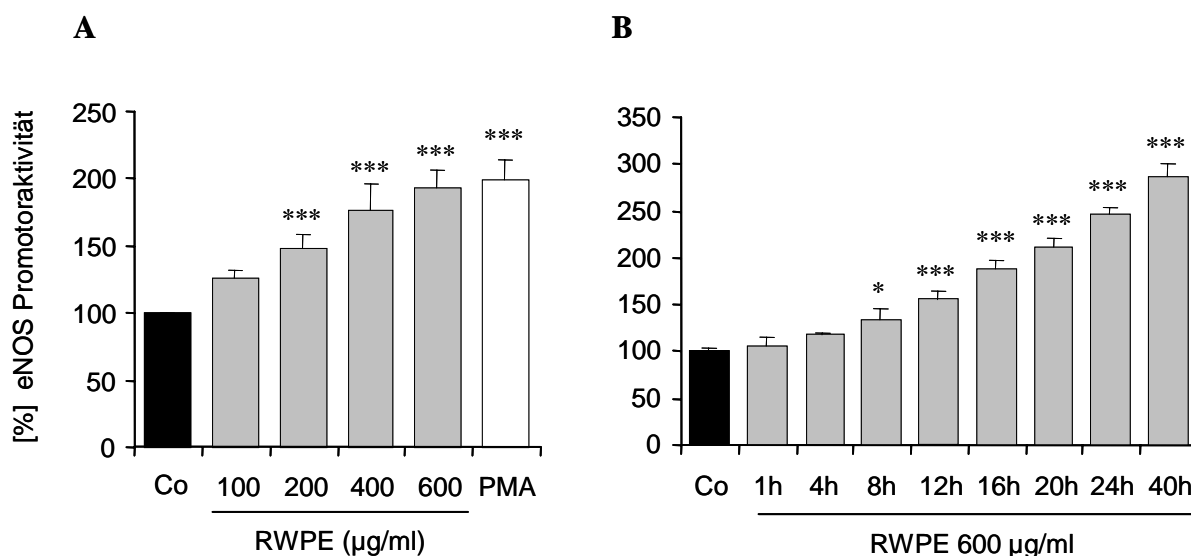
In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob eine langfristige Stimulation mit Rotwein-/RWPE eine Wirkung auf die eNOS in Endothelzellen hat.

### 6.1.1 Erhöhung der eNOS Promotoraktivität

Zunächst sollte ermittelt werden, ob RWPE die Promotoraktivität in ECV304 Zellen beeinflusst. Dazu wurde zunächst ein Zeitverlauf (1 h – 40 h) mit RWPE (600 µg/ml) durchgeführt, um die optimalen Stimulationszeiten zu ermitteln. Wie in Abb. 40B dargestellt, erhöhte sich die eNOS Promotoraktivität ab einer Stimulationsdauer von 1 h, wurde signifikant höher nach 8 h (ca. 1,4-fach) und erreichte ihr Maximum nach 40 h (ca. 2,8-fach).

Die folgenden Versuche zur konzentrationsabhängigen eNOS-Promotoraktivität, Proteinexpression, L-Citrullin- und NO-Produktion wurden alle nach 18 h (Promotoraktivität) bzw. 20 h (alle anderen) Stimulationszeit durchgeführt, da nach dieser Zeit eine eindeutig signifikante Erhöhung der Promotoraktivität eintrat.

Wie Abb. 40A zeigt, erhöhte RWPE nach 20 h Stimulation konzentrationsabhängig (100 – 600 µg/ml) die eNOS Promotoraktivität, wobei die maximale Erhöhung (ca. 1,9-fach) bei 600 µg/ml war.

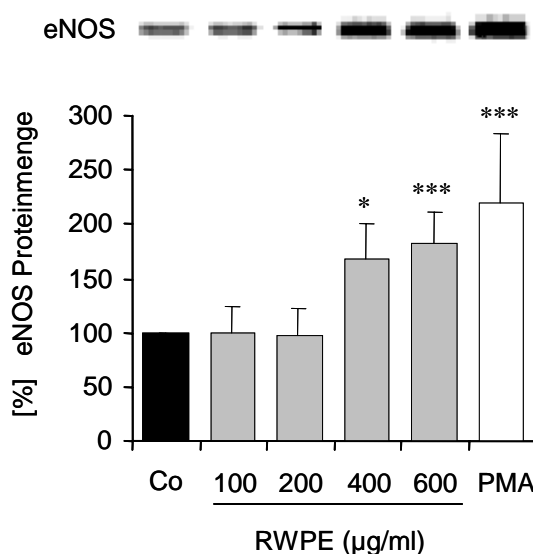


**Abb. 40: Konzentrations- und zeitabhängige Steigerung der eNOS Promotoraktivität nach Stimulation mit RWPE.** ECV304 Zellen wurden mit RWPE stimuliert und die Promotoraktivität mittels Luciferase-Reportergen-Assay (Material und Methoden) ermittelt. A: Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit RWPE (100 µg/ml – 600 µg/ml) oder PMA (2 nM) stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. B: Zellen waren unbehandelt (Co) oder unterschiedlich lange (1-40 h) mit RWPE (600 µg/ml) stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus einem Experiment in Triplikaten. Die Signifikanzen wurden in A und B mit ANOVA/Dunnett berechnet, wobei \* P <0,05, \*\* P <0,01 und \*\*\* P < 0,001 ist.

### 6.1.2 Erhöhung der eNOS Proteinexpression

Nachdem die eNOS Promotoraktivität nach RWPE Stimulation deutlich erhöht war, sollte nun untersucht werden, ob nach RWPE-Exposition eine erhöhte eNOS Proteinmenge vorliegt. Dies wurde durch Western Blot-Analyse an EA.hy926 Zellen untersucht.

In der Tat steigerte die Stimulation mit RWPE (20 h) signifikant die eNOS Proteinmenge. Die Steigerung war bei 400 µg/ml ca. 1,6-fach und bei 600 µg/ml ca. 1,9-fach (Abb. 41).



**Abb. 41: Erhöhung der eNOS Proteinexpression durch RWPE.** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt oder 20 h mit RWPE (100-600 µg/ml) oder mit PMA (2 nM) stimuliert. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Western Blot (Material und Methoden). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Proteinmenge aus sechs unabhängigen Experimenten. Der gezeigte Western Blot stellt einen repräsentativen Blot aus sechs dar. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA/Dunnett ermittelt, wobei \*  $P < 0,05$  und \*\*\*  $P < 0,001$  darstellt.

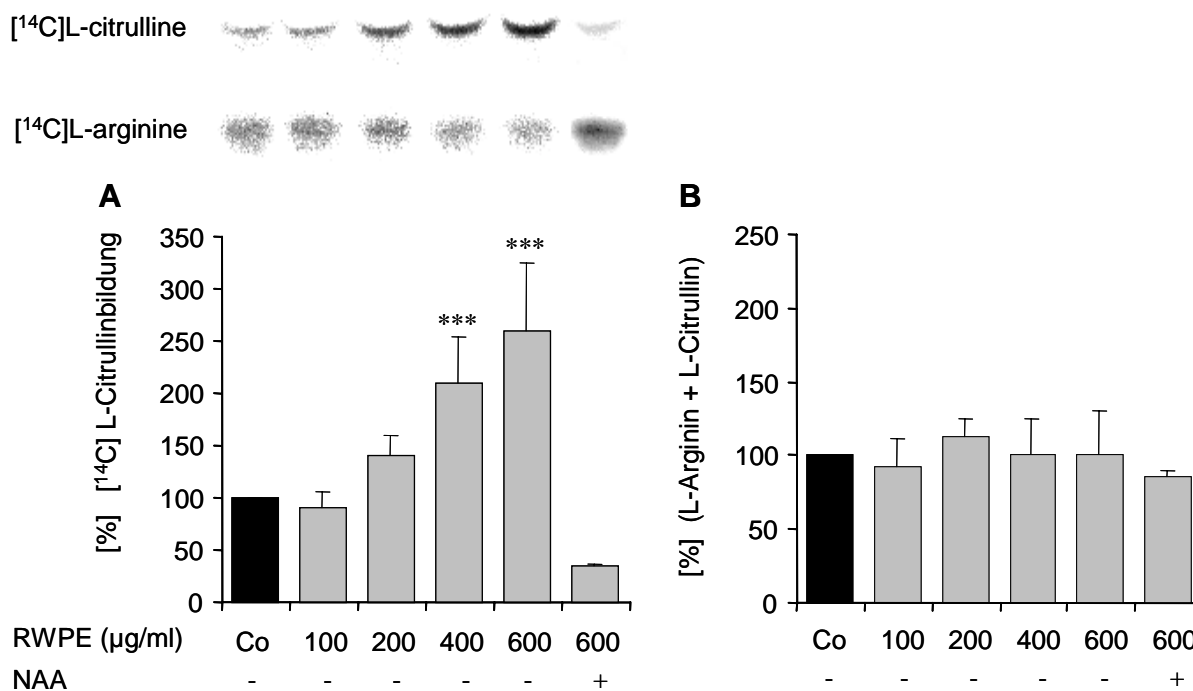
### 6.1.3 Erhöhung der eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung

Physiologisch vermittelt die eNOS ihre Wirkung über NO. Darum war die nächste entscheidende Frage, ob die durch RWPE bewirkte erhöhte Proteinmenge sich auch in einer erhöhten L-Citrullin- und NO-Produktion niederschlägt. Dazu wurde zunächst die eNOS Aktivität/L-Citrullinproduktion an EA.hy926 Zellen mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay ermittelt.

Wie Abb. 42 zeigt, konnten 20 h Stimulation mit RWPE konzentrationsabhängig die L-Citrullinproduktion erhöhen. Wie bei der eNOS Proteinerhöhung war auch die L-Citrullinerhöhung ab 400 µg/ml signifikant (ca. 2,1-fach) und erreichte ein Maximum bei 600 µg/ml (ca. 2,5-fach). Um zu zeigen, dass dieser Effekt eindeutig durch die eNOS vermittelt ist, wurde den RWPE behandelten Zellen vor dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay der irreversible eNOS-Hemmer NAA (200 µM) zugesetzt. NAA reduzierte die L-Citrullinproduktion sogar deutlich unter den Wert der unbehandelten Kontrollen (Abb. 42A). Damit konnte gezeigt werden, dass die RWPE-vermittelte L-Citrullinproduktionserhöhung über die eNOS vermittelt ist.

Außerdem war von Interesse, ob die L-Citrullinproduktionserhöhung durch die erhöhte eNOS Proteinmenge, durch erhöhte eNOS Aktivität oder durch eine erhöhte L-Argininaufnahme in die Zellen bedingt ist. Die relative L-Argininaufnahme kann mittels Vergleich der intrazellulären totalen Radioaktivität ( $\approx [^{14}\text{C}]\text{L-Arginin} + [^{14}\text{C}]\text{L-Citrullin}$ ) bestimmt werden. Wie Abb. 42B zeigt, bewirkte RWPE (100- 600 µg/ml) keine Erhöhung der Gesamtradioaktivität und somit der  $[^{14}\text{C}]\text{L-Argininaufnahme}$ . Ob die eNOS Aktivität durch RWPE erhöht wird, konnte mit den verwendeten Methoden nicht geprüft werden. Allerdings zeigte RWPE keinen Kurzeiteffekt auf die eNOS (Daten nicht gezeigt). Der Effekt trat wie die Steigerung der Promotoraktivität und der eNOS Proteinmenge erst nach ca. 10 h ein (Daten nicht gezeigt).





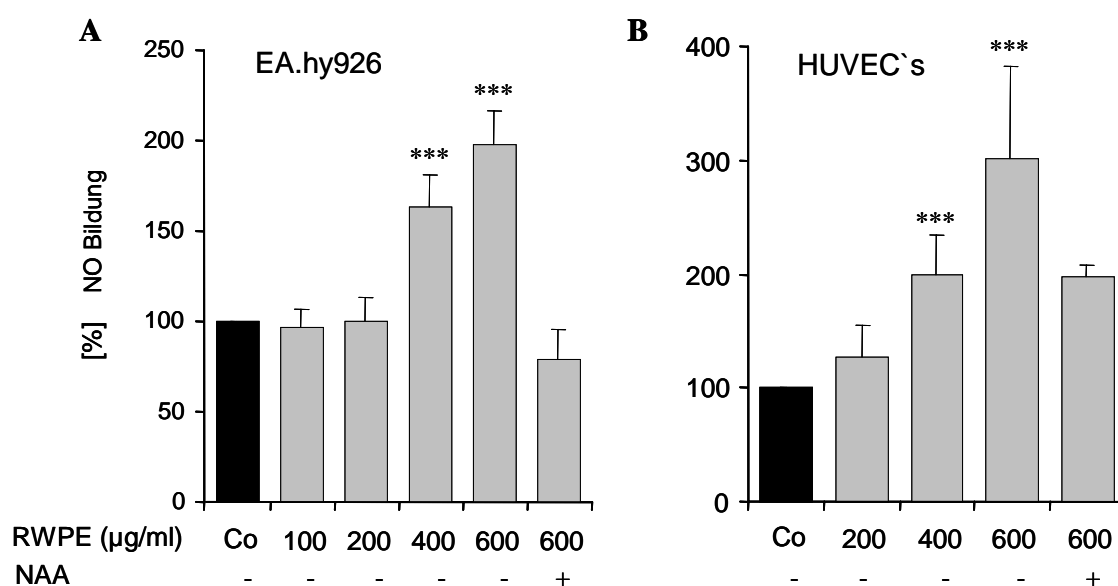
**Abb. 42: Einfluss von RWPE auf eNOS die Enzymaktivität/ L-Citrullinbildung (A) und L-Argininaufnahme (B).** EA.hy926 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 20 h mit RWPE (100-600 µg/ml) stimuliert. Die A23187 stimulierte eNOS Aktivität wurde mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay durchgeführt (siehe Methodenentwicklungen). Wo angegeben, wurde 15 min vor [<sup>14</sup>C]L-Argininzugabe der irreversible eNOS Hemmer NAA (200 µM) zugegeben. A: Mittelwerte ±SD der relativen eNOS [<sup>14</sup>C]L-Citrullinbildung aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. B: Mittelwerte ±SD der relativen Summen aus [<sup>14</sup>C]L-Citrullin und [<sup>14</sup>C]L-Arginin, bestimmt aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Die dargestellte DC-Platte zeigt eine repräsentative Platte nach Auswertung im Phosphoimager. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA/Dunnett ermittelt, wobei \*\*\* P <0,001 darstellt.

#### 6.1.4 Erhöhung der eNOS abhängigen NO-Bildung

Als nächstes sollte bestimmt werden, ob RWPE neben der L-Citrullin- auch die NO-Produktion erhöht. Von allen in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen ist die Bestimmung der eNOS bedingten NO-Produktion für eventuelle physiologische Folgen am Wichtigsten. Deshalb wurde der Einfluss von RWPE auf die NO-Produktion bzw. die NO-Menge an zwei Endothelzelltypen, nämlich an EA.hy926 und an HUVECs untersucht.

Beide Endothelzellen wurden 20 h mit unterschiedlichen Konzentrationen RWPE (EA.hy926: 100 – 600 µg/ml, HUVECs: 200 – 600 µg/ml) stimuliert. Die NO-Produktion bzw. NO-Menge im Zellüberstand wurde mittels DAF-2 durch Fluoreszenzdetektion bestimmt. Abb. 43A zeigt, dass die NO-Produktion in EA.hy926 Zellen nach RWPE-Stimulation anstieg (ca.1,7-fach bei 400 µg/ml und ca. 2,0-fach bei 600µg/ml). In HUVECs führte RWPE ebenfalls zu einer signifikant gesteigerten NO-Produktion (Abb. 43B). Hier stieg die NO-Menge bei 400 µg/ml auf ca. das 2,0-fache und erreichte bei 600 µg/ml ca. das 3,0-fache. Bei beiden Zelltypen konnte die RWPE bedingte NO-Produktionserhöhung durch den eNOS-Hemmer NAA (200 µM) deutlich reduziert, bzw. bei EA.hy926 Zellen komplett unterdrückt werden.

Diese auf zwei unterschiedlichen Zellarten identischen Ergebnisse untermauern deutlich die Aussage, dass RWPE in Endothelzellen die eNOS bedingte NO-Produktion erhöht.



**Abb. 43: RWPE erhöht die eNOS abhängige NO-Produktion in Endothelzellen.**

EA.hy926 Zellen (A) sowie HUVECs (B) waren unbehandelt (Co) oder 20 h mit RWPE (100-600 µg/ml) stimuliert. Die NO-Produktion wurde mittels DAF-2 Assay ermittelt (siehe Methodenentwicklungen). Wenn angegeben wurde, wie in *Methodenentwicklungen* beschrieben, der irreversible eNOS Hemmer NAA (200 µM) zugegeben. Die Abbildungen A und B zeigen die Mittelwerte ±SD der relativen NO-Produktion aus je drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Die Signifikanzen wurden mittels ANOVA/Dunnett ermittelt, wobei \*\*\* P <0,001 darstellt.

### 6.2 Effekt von puren Rotweinen und ihren Polyphenolfractionen

Nachdem RWPE einen deutlichen Effekt auf die eNOS und ihre NO-Produktion zeigte, sollte(n) nun die wirksame(n) Substanz(en) des RWPE gefunden werden.

Da einerseits die vorhandenen Ressourcen des bisher verwendeten RWPE aus Frankreich für die langfristig bevorstehende präparative Analytik zu gering waren und andererseits eine „Rohstoffunabhängigkeit“ angestrebt wurde, sollte ein eigener wirksamer Rotwein zur Herstellung eines RWPE gesucht werden. Wenn ein geeigneter Wein gefunden war, sollte dieser in größerem Maßstab in verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden. Die Fraktionen sollten dann auf eNOS-Wirksamkeit getestet und chemisch analysiert werden: Langfristig sollten Antworten auf folgende Fragen gefunden werden:

1. Welche Substanz bzw. Substanzklassen des Rotweins bzw. des RWPE sind für den Effekt verantwortlich ?
2. Zeigen alle Rotweine bzw. RWPEs den Effekt ?
3. Ist der Effekt abhängig von der Rotweinerkunft, der verwendeten Traubensorte, der Weinlagerung in bestimmten Fassmaterial ?
4. Sind die für den Effekt verantwortlichen Substanzen des RWPE genuin in der Weintraube enthalten, oder entstehen sie erst während der Weinherstellung ?

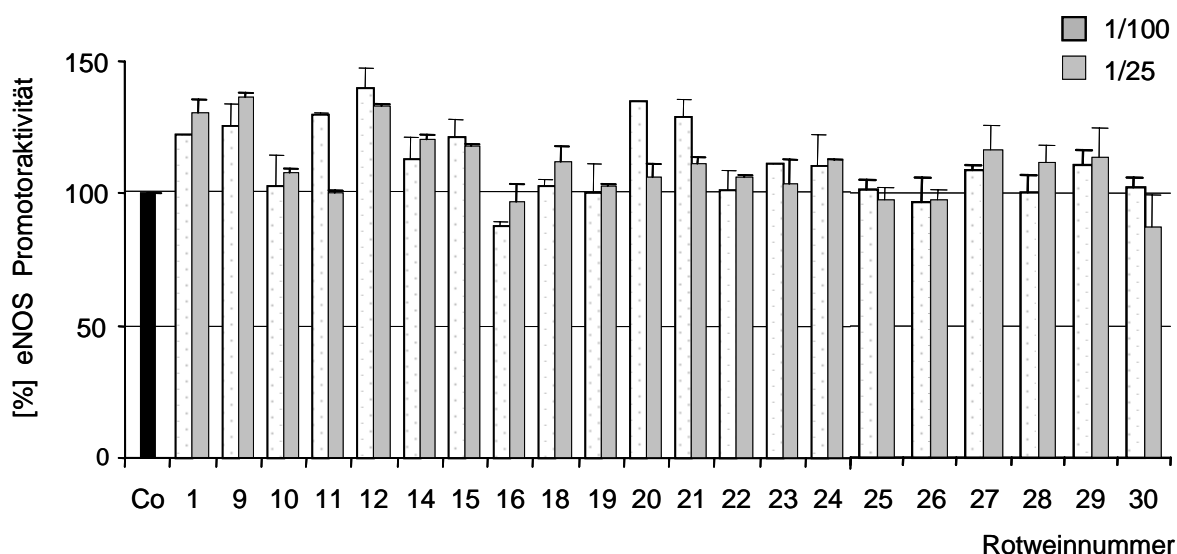
Angesichts der Tatsache, dass RWPE ein Vielstoffgemisch ist, welches viele chemisch ähnliche Verbindungen enthält, stellt vor allem die Findung der wirksamen Substanz(en) eine extrem schwierige Aufgabe dar.

Die Suche nach einem wirksamen Rotwein wurde verbunden mit der Suche auf Antworten zu den obigen Fragen 2 und 3, indem die getesteten Rotweine möglichst aus unterschiedlichen Regionen stammten und unterschiedliche Traubensorten und Weinlagerung hatten. Ziel war es letztlich einen wirksamen Wein zu finden, und aus diesem dann in größerem Maßstab verschiedene Fraktionen für biologische Tests und analytische Zwecke zu gewinnen.

### 6.2.1 Einfluss von puren Rotweinen auf die eNOS Promotoraktivität

Das Screening der Weine erfolgte mittels des Luciferase-Reporter-Gen-Assays, da mit diesem Testsystem im Vergleich zu den anderen Testen der größte Probendurchsatz erzielt werden konnte.

Zur Messung der eNOS Promotoraktivität wurden ECV304 Zellen 18 h mit mehr als 30 Weinen stimuliert. Die Weinkonzentration auf den Zellen betrug 1/100 und 1/25. Abb. 44 zeigt den Einfluss von 21 Weinen auf die eNOS Promotoraktivität. Wie man sieht, erhöhten einige Weine (z.B. Nr.1, 9, 12, 21) die Promotoraktivität relativ deutlich, andere (z.B. Nr. 11, 20, 21) erhöhten sie nur bei der niedrigeren Konzentration und wieder andere (z.B. Nr. 10, 16, 18, 19, 22, 23, 25, 26, 30) zeigten keinen Effekt.



**Abb. 44: Einfluss verschiedener Rotweine auf die eNOS Promotoraktivität.** ECV304 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit verschiedenen puren Rotweinen (1/100 und 1/25) stimuliert. Die Promotoraktivität wurde mittels Luciferase Reporter-Gen Assay (Material und Methoden) bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus einem Experiment in Duplikaten.

Nach dem ersten Weinscreening wurde nun mit Weinen weitergearbeitet, die eine unterschiedliche Aktivität im Luciferase-Reporter-Gen-Assay zeigten. Es wurden Weine ausgesucht, die bei beiden Konzentrationen relativ deutlich aktiv waren (Nr. 1, 9, 12), die in der tieferen Konzentration stärker aktiv waren (Nr. 20, 21), die bei beiden Konzentrationen sehr schwach aktiv waren (Nr. 27, 28, 29) und die gar nicht

aktiv waren (Nr. 26, 30). Von diesen Weinen wurde, wie in *Material und Methoden* beschrieben, mittels Chromatographie über eine Polystyrolsäule eine Vorlauffraktion (VF) und eine Polyphenolfraktion (PPF) gewonnen. Diese reinen Weine und die aus ihnen gewonnenen zwei Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer eNOS Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay verglichen. Ziel war es herauszufinden, ob die PPFs aller Rotweine aktiv sind, ob man von der Aktivität der reinen Weine auf die Aktivität der Fraktionen schließen kann und ob die Aktivität einer Fraktion zugeordnet werden kann.

Dazu wurden ECV304 Zellen 18 h mit reinen Weinen (1/100, 1/25) sowie der daraus gewonnenen VF (1/100, 1/25 µg/ml, bzw. nur 1/50) und PPF (400, 600 µg/ml bzw. nur 400 µg/ml) stimuliert. Das Ergebnis dieses Experimentes, welches in Abb. 45 dargestellt ist, beinhaltet mehrere interessante Aspekte:

- Die PPFs von 6 der 8 getesteten Weine rief relativ konzentrationsunabhängig eine deutlich erhöhte Promotoraktivität hervor (ca. 1,6-fach bei Wein 27 bis 2,7-fach bei Wein 9).
- Bei Wein 26 und 30 bedingte die PPF keine bzw. nur eine sehr geringe Aktivitätserhöhung.
- Die VF erhöhte die Aktivität nur sehr gering (ca. 1,1-1,2-fach bei Wein 9, 12, 20, 27, 28, 29, 30) bzw. gar nicht (Wein 21 und 26).
- Die Aktivitätserhöhung durch die reinen Weine war generell sehr gering.
- Es konnte nur tendenziell aber nicht immer ein klarer Zusammenhang zwischen der Aktivität der reinen Weine und ihrer PPFs festgestellt werden. Zum Beispiel wiesen die PPFs der Weine 20 und 21 eine ca. 2,1-fache Aktivitätssteigerung auf, obwohl ihre reinen Ausgangsweine kaum eine Aktivitätssteigerung zeigten.

Für das weitere Prozedere musste geklärt werden, welche Antworten dieses Experiment auf die ursprünglich gestellten 4 Fragen (C6.2) gibt.

Die Frage 1 und 4 konnten mit diesem Experiment noch nicht beantwortet werden.

Was Frage 2 betrifft, kann man sagen, dass fast alle PPFs (Ausnahme: Nr. 26, 30) diesen Effekt zeigten.

Die Punkte der Frage 3 konnten zum Teil, wenn auch nur eingeschränkt beantwortet werden. Die Weinherkunft betreffend, konnte der Effekt nicht einem einzigen Weinanbaugebiet zugeordnet werden, da die sieben aktivitätssteigernden Weine sowohl aus verschiedenen Regionen Frankreichs (sechs Weine) als auch aus Spanien (einer) waren. Andererseits waren die unwirksamen Weine nicht aus diesen

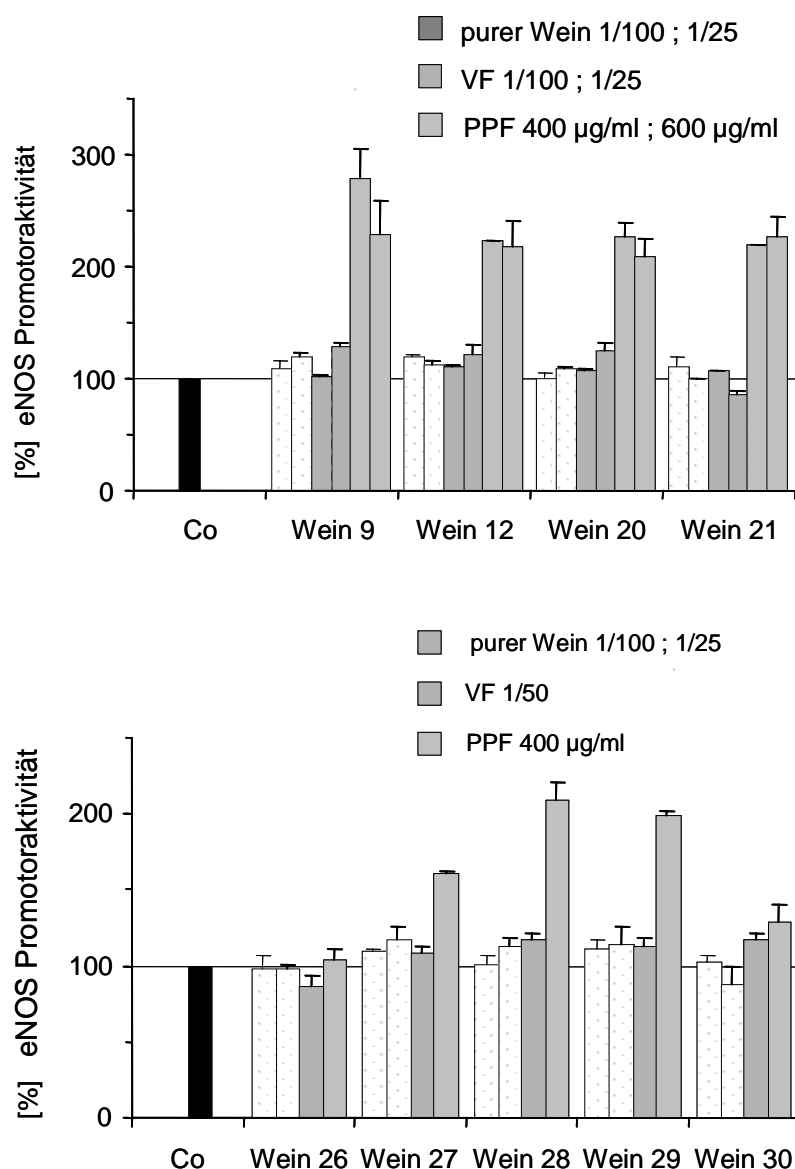
beiden Regionen, sondern aus Deutschland und den USA. Was die verwendete Traubensorte angeht, konnte der Effekt auch nicht einer Traube zugeordnet werden. Die aktivitätssteigernden Weine enthielten z.B. 100% Merlot (Wein 21 und 29), 100 % Syrah (Wein 28), 100 % Cabernet Sauvignon (RWPE aus Frankreich). Andererseits zeigte ein anderer Wein aus 100 % Cabernet Sauvignon (Wein 30 aus USA) keine Aktivitätserhöhung.

### 6.2.2 eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung

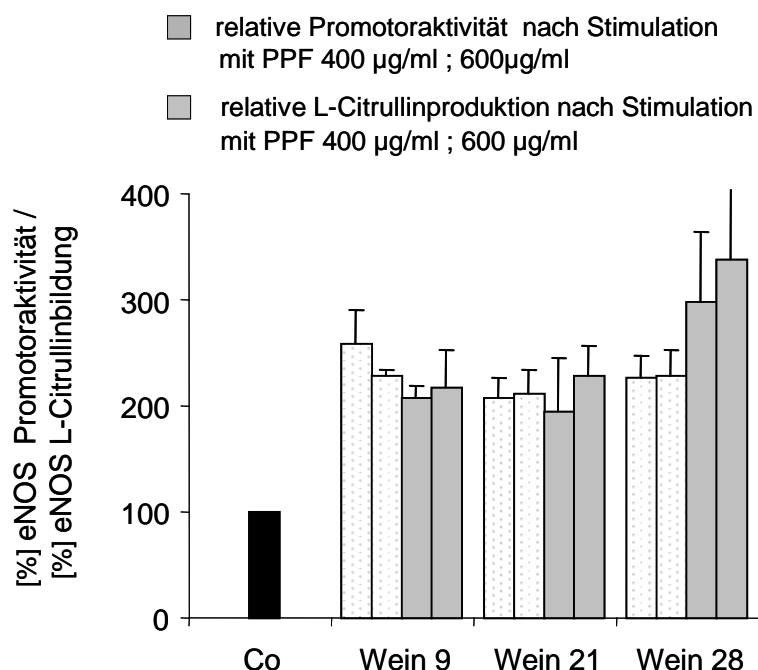
Bevor mit der arbeitsaufwendigen weiteren Suche nach Antworten auf die vier obigen Fragen begonnen wurde, sollte geklärt werden, ob die ausgewählten PPFs auch die eNOS bedingte L-Citrullinbildung in EA.hy926 Zellen erhöhen.

Dazu wurden EA.hy926 Zellen 20 h mit den PPFs (400 , 600 µg/ml) der Weine 9, 21 und 28 stimuliert und die L-Citrullinproduktion mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay gemessen. Wie Abb. 46 zeigt, erhöhten die PPFs der drei Weine neben der eNOS Promotoraktivität auch deutlich (stets > 2,0-fach) die L-Citrullinbildung. Bei Wein 9 und 21 war die Steigerung der L-Citrullinproduktion ähnlich groß wie die Promotoraktivitätssteigerung, bei Wein 28 war sie sogar größer.

Dieses Ergebnis bekräftigte, dass die ausgewählten PPFs auf allen eNOS-Ebenen einen Effekt zeigen und es somit Sinn macht, mit diesen Weinen und ihren Fraktionen die arbeitsaufwendige Suche nach den wirksamen Substanzgruppen zu starten.



**Abb. 45: Effekt von Weinen auf die eNOS Promotoraktivität: Vergleich von reinen Weinen und ihren Vorlauf- und Polyphenolfractionen.** ECV304 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 20 h mit reinen Weinen und den jeweils daraus gewonnenen Polyphenol-freien Vorlauf-fractionen (VF) und der Polyphenolfraction (PP-Fraktion) stimuliert. Die Promotoraktivität wurde mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay bestimmt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus je einem Experiment in Triplikaten.



**Abb. 46: Vergleich der Erhöhung der eNOS Promotoraktivität und eNOS Aktivität durch die PPFs verschiedener Weine.** Zur Bestimmung der eNOS Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay (Material und Methoden) waren ECV304 Zellen unbehandelt (Co) oder 18 h mit den PPFs der drei Weine stimuliert. Zur Bestimmung der eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung mittels des [<sup>14</sup>C]-L-Arginin/[<sup>14</sup>C]-L-Citrullin Umwandlungsassays (siehe *Methodenentwicklungen*) waren EA.hy926 Zellen unbehandelt (Co) oder 20 h mit den PPFs der drei Weine stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten sowie die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Aktivität/ L-Citrullinbildung aus zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

### 6.3 Beeinflussung der eNOS Promotoraktivität durch unterschiedliche Weinlagerung

Während der Lagerung im Eichenfass löst der Wein vor allem Tannine aus dem Fassmaterial heraus, wodurch der Wein eine charakteristisch „schwere, vollmundige“ Eigenschaft bekommt. Tannine könnten für diese positiven kardiovaskulären Eigenschaften des Weins mitverantwortlich sein. Deshalb sollte überprüft werden, ob die Weinlagerung in unterschiedlichem Fassmaterial oder Tannine selbst die eNOS in Endothelzellen beeinflussen.



### 6.3.1 Kein Effekt durch unterschiedliches Fassmaterial

Um den Einfluss des Fassmaterials während der Weinlagerung auf die eNOS zu untersuchen, wurden drei Dornfelder-Weine von einem Winzer bezogen, der den gleichen Wein unterschiedlich gelagert hatte (Stahlfass: Nr. 31, Holzfass: Nr. 32, Eichenfass: Nr. 33). ECV304 Zellen wurden 18 h sowohl mit den drei reinen Weinen (1/100, 1/25) als auch mit ihren PPFs (300, 600 µg/ml) stimuliert und die eNOS Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay gemessen. Wie Abb. 47 zeigt, steigerten die PPFs aller drei Weine die Promotoraktivität, wobei die Steigerung bei den drei Arten der Fasslagerung insgesamt ziemlich ähnlich war (1,7-2,2-fach). Die reinen Weine konnten alle keine Erhöhung der eNOS Promotoraktivität erzielen.

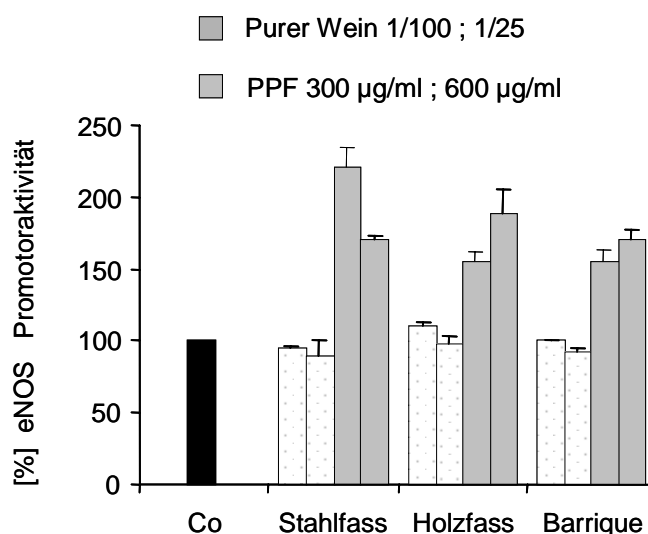
Diese Ergebnisse bedeuteten, dass die Weinlagerung in unterschiedlichem Fassmaterial keinen Einfluss auf die eNOS Promotoraktivität hat.

### 6.3.2 Effekt von zugesetzten Tanninen und Eichenrindenextrakt auf die eNOS Promotoraktivität

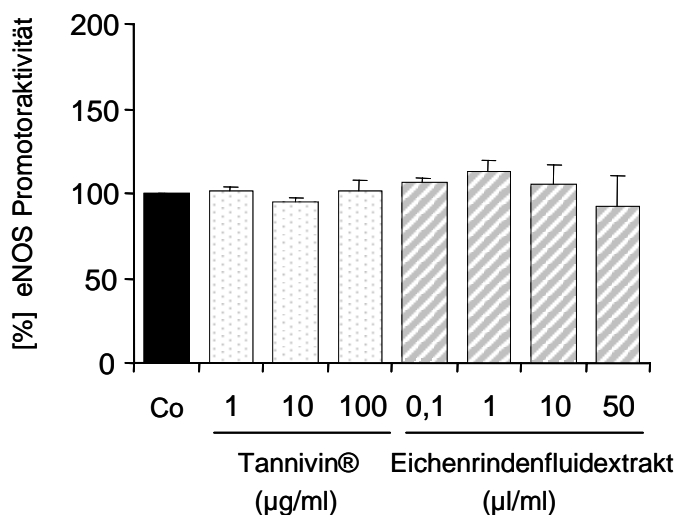
Im vorherigen Punkt konnte gezeigt werden, dass die Eichenfasslagerung des Rotweins keinen Einfluss auf die eNOS Promotoraktivität hat. Um abzusichern, dass Substanzen des Eichenfasses, wie Tannine, die eNOS nicht beeinflussen, wurde untersucht, ob ein selbst hergestellter Eichenrindenfluidextrakt und ein in der Weinindustrie dem Wein zugesetztes Tanningemisch (Tannivin®) eine Wirkung auf die eNOS Promotoraktivität haben. Tannivin® ist ein Pulver aus verschiedenen Tanninen, hergestellt aus unterschiedlichen Hölzern. Dieses Pulver wird den nicht in Eichenfässern gelagerten Weinen oft zugesetzt, um den charakteristischen Geschmack und die „Schwere, Vollmundigkeit“ zu erzeugen, der durch die Eichenfasslagerung entsteht.

ECV304 Zellen wurden 18 h mit dem Eichenrindenfluidextrakt (0,1-50 µl/ml) und Tannivin® (1-100 µg/ml) stimuliert und die Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay gemessen. Weder der Eichenrindenfluidextrakt noch das Tanningemisch konnten die eNOS Promotoraktivität erhöhen (Abb. 48).

Dieses Ergebnis untermauerte die obige Aussage, dass die RWPE Effekte auf die eNOS unabhängig vom Fassmaterial während der Weinlagerung sind. Somit konnte obige Frage 4 (6.2), was das Fassmaterial betreffend, klar mit nein beantwortet werden.



**Abb. 47: Einfluss des Rotweinfassmaterials auf die eNOS Promotoraktivität.** ECV304 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit puren Weinen und den daraus gewonnenen PPFs stimuliert. Die Weine waren identischen Ursprungs, wurden aber dann unterschiedlich gelagert. Die Promotoraktivität wurde mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay ermittelt (*Material und Methoden*). Die Abb. zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus einem Experiment in Triplikaten.



**Abb. 48: Kein Effekt durch Tannine und Eichenrindenfluidextrakt auf die eNOS Promotoraktivität.** ECV304 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit dem Tanningemisch Tannivin® (1-100 µg/ml) und einem Eichenrindenfluidextrakt (0,1-50 µg/ml) stimuliert. Die Promotoraktivität wurde mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay gemessen (*Material und Methoden*). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus einem Experiment in Triplikaten (Tannivin®) bzw. zwei unabhängigen Experimenten in Triplikaten (Eichenrindenfluidextrakt).

### 6.4 Effekt von isolierten Rotweininhaltsstoffen

Um herauszufinden, welche Substanzen bzw. Substanzgruppen im RWPE für die Wirkung auf die eNOS verantwortlich sind (Frage 1), wurden einige „verdächtige“ isolierte Rotweinpolyphenole auf ihre Wirkung getestet. Einerseits mag diese Suche auf Grund der unzähligen Rotweinpolyphenole etwas an die berühmte Suche der Stecknadel im Heuhaufen erinnern, andererseits kann man zumindest diejenigen Rotweinpolyphenole in die engere Auswahl einbeziehen, denen in früheren Arbeiten eine gefäßerweiternde Wirkung zugeschrieben wurde. Für die drei in dieser Arbeit auf ihre eNOS Wirkung getesteten Rotweinpolyphenole (Resveratrol, Delphinidin, Quercetin) trifft dies zu (Flesch *et al.*, 1998; Andriambeloso *et al.*, 1998; Orallo *et al.*, 2002). Um ihre Wirksamkeitsmitbestimmung im RWPE zu untersuchen, wurden sie in den Konzentrationen eingesetzt, in denen sie im RWPE (aus Frankreich) vorlagen: Eine RWPE Konzentration von 400 µg/ml enthielt  $\approx 1$  µM Resveratrol,  $\approx 2,9$  µM Quercetin und  $\approx 1,3$  µM Delphinidin-3-glucosid (Konzentrationsangaben von Prof. Cheynier). Darum wurden alle drei Substanzen mit 1 und 10 µM getestet.

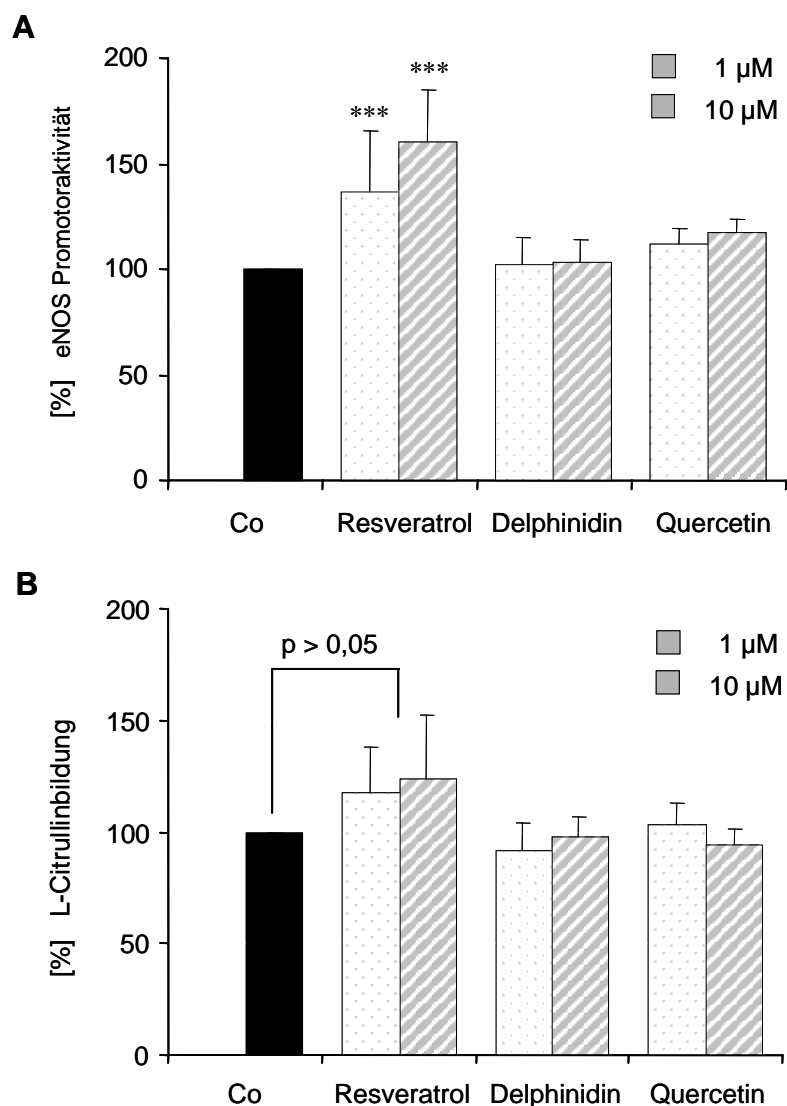
#### 6.4.1 eNOS Promotoraktivität

Zur Bestimmung des Effekts auf die eNOS Promotoraktivität mittels Luciferase-Reportergen-Assay wurden ECV304 Zellen 20 h mit den drei Polyphenolen (Resveratrol, Delphinidin, Quercetin je 1 und 10 µM) stimuliert. Abb. 49A zeigt, dass Resveratrol bei beiden Konzentrationen eine signifikante Aktivitätssteigerung (ca. 1,35-fach bzw. 1,65-fach) bewirkte, während Delphinidin und Quercetin die Aktivität nicht steigern.

#### 6.4.2 eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung

Nachdem Resveratrol die Promotoraktivität erhöhte, sollte nun überprüft werden, ob Resveratrol und die anderen Polyphenole die eNOS L-Citrullinproduktion steigern können. Resveratrol bewirkte eine leichte (ca. 1,17-1,25-fach), aber nicht signifikante Erhöhung, während Delphinidin und Quercetin wiederum keinen Effekt zeigten (Abb. 49B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Delphinidin und Quercetin auf keinen Fall für den eNOS-Effekt von RWPE verantwortlich sind. Resveratrol zeigte zwar auf der eNOS Promotorebene einen Effekt, der aber auf der Ebene der L-Citrullinproduktion nicht mehr signifikant war. Somit ist Resveratrol, wenn überhaupt, nur sehr gering an dem Effekt von RWPE beteiligt.



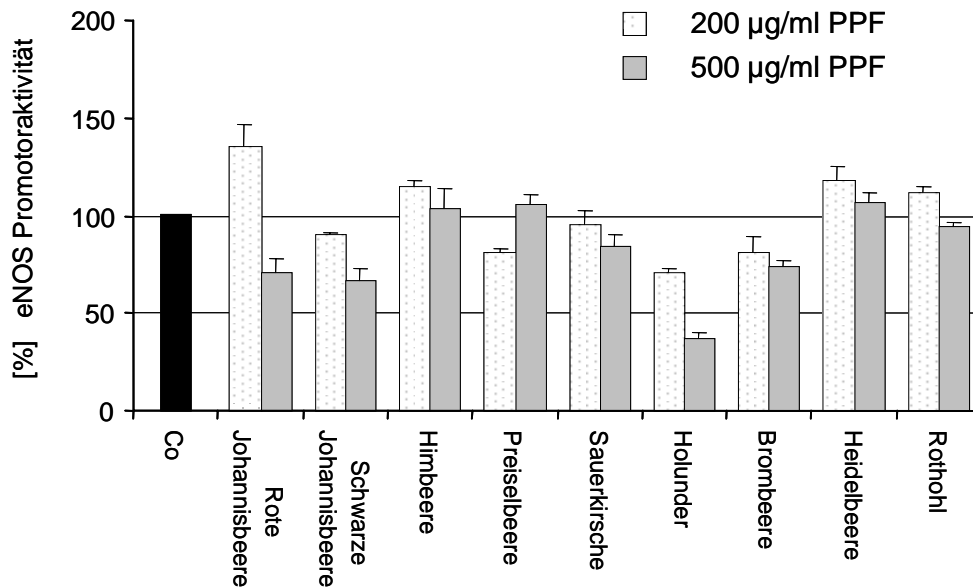
**Abb. 49: Einfluss von isolierten Rotweininhaltsstoffen auf die eNOS Promotoraktivität und eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.** ECV304 Zellen (A) bzw. EA.hy926 Zellen (B) waren unbehandelt oder 18 h (A) bzw. 20 h (B) mit je 1 μM und 10 μM der Rotweininhaltsstoffe stimuliert. A. Die eNOS Promotoraktivität wurde mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ±SD der relativen eNOS Promotoraktivität (A) bzw. der eNOS bedingten L-Citrullinbildung (B) aus je drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. B. Die Bestimmung der eNOS Promotoraktivität erfolgte mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay (Material und Methoden), die Messung der L-Citrullinbildung mittels dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay (Methodenentwicklung). Die Signifikanzen von A und B wurden mit ANOVA/Dunnett berechnet, wobei \*\*\* P < 0,001 darstellt.

## 7 Effekt von Fruchtexttrakten auf die eNOS

Zur Identifizierung der wirksamen Verbindungen im RWPE wurden verschiedene Strategien verfolgt. Neben den oben dargestellten Suchmethoden über die Weinherkunft, Weinlagerung, Traubensorte, RWPE-Fraktionierung und „verdächtige isolierte Rotweinpolyphenole“ wurden auch die PPFs von Fruchtsäften untersucht. Der Grund dafür liegt in der wesentlich einfacheren Polyphenol- und vor allem Anthocyaninzusammensetzung der Früchte im Vergleich zum RWPE. Früchte enthalten oft z.B. nur einen oder wenige Anthocyanidingundtypen. Darum könnte man, falls die PPF einer Frucht keinen Einfluss auf die eNOS zeigt, nach dem Ausschlussprinzip ihre Anthocyane von der Liste der möglichen wirksamen Verbindungen im RWPE streichen.

### 7.1.1 Einfluss auf Promotoraktivität

Von den in Abb. 50 aufgelisteten Früchten stellte Herr Dr. Samtleben aus Fruchtsäften jeweils die PPFs her. ECV304 Zellen wurden 18 h mit den PPFs (200, 500 µg/ml) stimuliert und dann wurde die Promotoraktivität mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay ermittelt. Abb. 50 zeigt, dass die meisten PPFs keine Wirkung auf die eNOS hatten. Lediglich die PPF der Roten Johannisbeere konnte die Aktivität relativ deutlich (ca. 1,35-fach) erhöhen. Zur Interpretation der Ergebnisse betreffend der oft eingetretenen Erniedrigung der Promotoraktivität bei der höheren PPF-Konzentration ist anzumerken, dass in diesen Fällen meist eine Zelltoxizität beobachtet wurde.



**Abb. 50: Effekt der PPF aus Fruchtsäften auf die eNOS Promotoraktivität.** ECV304 Zellen waren unbehandelt (Co) oder 18 h mit den PPF (200 µg/ml, 500 µg/ml) verschiedener Früchte stimuliert. Die Promotoraktivität wurde mittels Luciferase Assay (Material und Methoden) ermittelt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$ SD der relativen eNOS Promotoraktivität aus zwei Experimenten in Duplikaten.

## E. Diskussion

---

### 1 Bestimmung der eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung mit dem L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay

Die in dieser Arbeit durchgeführte Weiterentwicklung des L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassays brachte entscheidende Verbesserungen im Vergleich zu herkömmlich angewendeten Formen des Umwandlungsassays:

- Selektive und optisch überprüfbare Detektion von [ $^{14}\text{C}$ ]L-Arginin und [ $^{14}\text{C}$ ]L-Citrullin sowie möglicher anderer radioaktiver Produkte.
- Geringer Kosten- und Zeitaufwand verbunden mit einem im Vergleich zu anderen Methoden in diesem Bereich relativ großen zeitgleichen Probendurchsatz ( $\approx 30\text{-}40$  Proben).

Darüberhinaus ist positiv zu bewerten, dass dieser Assay an intakten Zellen durchgeführt werden kann und dass eine ausreichend hohe Sensitivität auch die Messung der basalen L-Citrullinproduktion ermöglicht.

Ein Nachteil dieses Assays ist allerdings die Quantifizierung der Radioaktivität mittels Phosphoimmager. Die Radioaktivität wird nicht wie bei der herkömmlichen Methode (Trennung der Aminosäuren mittels Anionenaustauschersäule) mit dem  $\beta$ -Counter direkt gemessen, sondern indirekt über einen Screen. Dies ergibt eine potentielle Fehlerquelle. Ein weiteres Problem der Messung mittels Screen/Phosphoimmager ergab sich aus der extrem geringen Strahlungsreichweite der [ $^{14}\text{C}$ ]-Strahlung. Liegen die Screens auf Grund von leichten Verbiegungen des Screens oder leichten Unebenheiten der DC nicht auf allen Stellen der DC exakt plan auf, ist der Abstand zwischen den strahlenden Aminosäuren und dem Screen nicht immer exakt gleich. Dies kann sich dann in erheblichen Unterschieden (bis zu Faktor 2!) der im Phosphoimmager gemessenen Intensitäten widerspiegeln.

Diese Messprobleme können allerdings durch festes Einspannen des Screen/DC-Sandwiches in der Kassette oder durch Beschwerung des Sandwiches weitgehend beseitigt werden. Äußerst präzise Eichgeraden mit [ $^{14}\text{C}$ ]L-Arginin haben dies bewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt).

## 2 Messung der eNOS bedingten NO-Produktion mittels des DAF-2 Fluoreszenzassays

Die in dieser Arbeit weiterentwickelte Methode zur Messung von NO mittels DAF-2 ermöglicht die selektive und sensitive Messung von extrazellulärem endothelialen NO im biologischen Medium. Dies konnte durch Optimierung (geringere DAF-2 Konzentration, Subtraktion der DAF-2 Eigenfluoreszenz) einer von einer japanischen Arbeitsgruppe publizierten Methode erreicht werden. Diese neue Methode ist nicht zu teuer, relativ einfach, selektiv und sensitiv. Darum könnte sie in vielen Labors als akzeptable Methode zur Detektion von extrazellulärem NO dienen.

Die Methode hat aber auch Nachteile: Wie in Abb. 19 gezeigt, reagiert DAF-2 nicht direkt mit NO zu DAF-2T, sondern mit dem starken Nitrosiereagenz  $N_2O_3$ . Dies entsteht im Verlauf der Sauerstoff-Oxidation von  $NO\cdot$  zu  $NO_2^-$ . In welchem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit  $NO\cdot$  zu  $N_2O_3$  oxidiert, hängt von vielen Faktoren, wie der Anwesenheit anderer Substanzen im Reaktionsgemisch ab. So können z.B. Reduktionsmittel wie Vitamin C, Glutathion und Catecholamine (z.B. Dopamin, Norepinephrin) die Reaktion von NO mit DAF-2 unterdrücken (Nagata et al., 1999). Auch in unseren Experimenten konnten wir an EA.hy926 Zellen nach Stimulation mit Vitamin C (100  $\mu$ M, 5 h), trotz einer gemessenen erhöhten L-Argininproduktion, keine erhöhte NO-Produktion mittels dem DAF-2-Assay detektieren. Auch nach Zugabe eines NO-Donors zeigten die Vitamin C vorbehandelten Zellen eine deutlich geringere DAF-2T Bildung (Daten nicht gezeigt). Grund dafür könnte sein, dass diese Reduktionsmittel die Oxidation von NO zu  $N_2O_3$  verhindern bzw. einschränken.

Diese Phänomene müssen deshalb bei Anwendung dieser Methode beachtet werden. Das heißt: Will man die NO Produktion von Endothelzellen nach Stimulation mit der Substanz X mittels DAF-2 messen, muss erst geprüft werden ob diese Substanz X auf die Reaktionskette von  $NO \rightarrow N_2O_3/DAF-2 \rightarrow DAF-2T$  einen Einfluss hat. Dies erfolgt z.B. dadurch, dass man die Zellen mit der Substanz X stimuliert und dann überprüft, ob nach Zugabe eines NO-Donors auf stimulierte Zellen und Kontrollzellen die DAF-2T Fluoreszenzveränderung gleich oder unterschiedlich ist.



### 3 Keinen Einfluss auf die eNOS in Endothelzellen haben: Knoblauchextrakt, isolierte Knoblauchextraktinhaltsstoffe, Weißdornextrakt (WS1442) und ECG/EGC des grünen Tees.

Bei all den in der Überschrift aufgelisteten Extrakten und Naturstoffen schien es durch Ergebnisse früherer Arbeiten sehr naheliegend, dass sie die eNOS beeinflussen können.

Knoblauchextrakt bewirkte in *in vitro* und *in vivo* Versuchen u.a. eine erhöhte NO-Produktion an isolierten Blutplättchen (Das *et al.*, 1995) und eine Blutdrucksenkung sowie Nitrat/Nitrit Exkretionserhöhung bei Ratten, denen durch dauerhafte Gabe des NOS-Hemmers L-NAME eine künstliche Hypertonie gesetzt wurde (Pedraza-Chaverri *et al.*, 1998). Mit WS1442 und anderen Weißdornextrakten konnte nach kurzzeitiger Stimulation am Modell des mit Phenylephrin kontrahierten Rattenaortenrings eine signifikante Dilatation und cGMP-Erhöhung erzielt werden. Diese Effekte konnten durch NOS-Hemmer ausgeblockt werden (Chen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000). Eine Kurzzeitstimulation mit den Catechingerbstoffen des Grünen Tees bewirkte in diesem Modell ähnliche Effekte (Huang *et al.*, 1998). Außerdem erhöhte eine kurzfristige Gabe von WS1442 im perfundierten Rattenherz den Koronarfluss signifikant. Auch dieser Effekt konnte mit NOS-Hemmern unterdrückt werden (Koch and Chatterjee, 2000).

All diese Extrakte und Naturstoffe zeigten in unseren Endothelzellmodellen keinen Einfluss auf die eNOS Promotoraktivität und die eNOS Aktivität/L-Citrullinbildung.

Folgende Gründe könnten dafür verantwortlich sein:

1. Alle obigen Effekte wurden an anderen Modellen bzw. Zellen erzielt. Sowohl das Modell des mit Phenylephrin kontrahierten Rattenaortenring als auch das Modell der nach L-NAME-Gabe hypertonen Mäuse stellte einen pathophysiologischen Zustand dar. Die physiologische vaskuläre Homöostase ist nicht mehr gegeben und die eNOS könnte deshalb auf den gesetzten Stimulus anders reagieren als in unserem Modell der „gesunden“ Endothelzellen. Abgesehen davon sind unsere Endothelzellen menschliche venösen Nabelschnurendothelzellen, welche durch Hybridisierung mit Krebszellen immortalisiert wurden. Es ist nicht sicher, dass diese immortalen Zellen exakt die gleichen Eigenschaften wie Endothelzellen im lebenden Organismus aufweisen. Sie können sich z.B. in der Expression mancher Gene unterscheiden (Takahashi *et al.*, 1990; Edgell *et al.*, 1983). Darüberhinaus wurden obige Versuche oft an Aorten und nicht an Venen

Keinen Einfluss auf die eNOS in Endothelzellen haben: Knoblauchextrakt, isolierte Knoblauchextraktinhaltsstoffe, Weißdornextrakt (WS1442) und ECG/EGC des grünen Tees.

---

durchgeführt. Auch dies ist bei der Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse zu beachten.

2. Die obigen Effekte sind bis auf die im Modell der hypertonen Maus reine Kurzzeiteffekte (1-5 min Stimulation). Wenn sie über die eNOS vermittelt wären, müssten sie durch posttranslationelle Enzymaktivierung bedingt sein. In unseren Versuchen wurden stets (Ausnahme Weißdorn: hier zusätzlich kurze Stimulationsdauer) die Langzeiteffekte (5-20 h) getestet. Wenn die posttranslationellen Effekte nach Langzeitstimulation nicht auftreten, ist die physiologische Bedeutung der Kurzzeiteffekte aus zwei Gründen sehr fraglich: Zum einen ist eine nur kurzfristig erhöhte NO-Produktion physiologisch wenig interessant. Zum anderen dürfte der Stimulus, um den Kurzzeiteffekt überhaupt erzielen zu können, auch nur kurzzeitig (wenige Minuten) im Plasma vorhanden sein. Allerdings dürfte es im Falle einer Arzneimitteltherapie äußerst schwierig sein, einen Stimulus mit einer so kurzen Halbwertszeit zu finden, geschweige denn therapeutisch effektiv einzusetzen.
3. Die Zusammensetzung von pflanzlichen Extrakten kann stark schwanken und hängt vor allem von folgenden Faktoren ab: verwendete Stammpflanze/Drogenteil, Drogenanbaubedingungen (Boden, Düngung, Klima), Zeitpunkt der Ernte, Lagerung und Trocknung der Droge sowie vom Extrakterstellungsverfahren. Dieser Punkt muss bei der Interpretation und dem Vergleich unserer Ergebnisse mit den bisher publizierten Ergebnisse besonders bei den Knoblauchextrakten aber auch in geringerem Umfang, trotz der guten Standardisierung, beim WS1442 beachtet werden.
4. Bei in vivo Applikation von Extrakten werden viele Extraktinhaltsstoffe z.B. in der Leber metabolisiert. Dadurch kann ein Extrakt im Plasma ein ganz anderes Substanzspektrum als *in vitro* im Zellüberstand aufweisen.
5. Die meisten Effekte, welche durch die obigen Extrakte und Naturstoffe in früheren Publikationen gezeigt wurden, könnten auch über eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit begründet sein. Dies wurde in unseren Versuchen nicht überprüft.

## 4 Wirkung von Soja-Isoflavonen auf die eNOS

Generell konnte in epidemiologischen Studien bei sojareicher Ernährung eine reduzierte Arterioskleroserate nachgewiesen werden (Barnes, 1998). Isoflavone erzeugten eine akute Vasodilatation im Modell des isolierten Rattenaortenrings (Mishra *et al.*, 2000) und in Experimenten am menschlichen Unterarm (Walker *et al.*, 2001). Diese Effekte konnten jeweils mit einem NOS-Hemmer ausgeblockt werden. Deshalb war es naheliegend, dass diese Effekte über die eNOS vermittelt sind.

In unseren Experimenten steigerten die untersuchten Isoflavone nach 18 h Stimulation signifikant die eNOS Promotoraktivität. Genistein bewirkte zudem in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$  eine eNOS Proteinerhöhung. Allerdings hatte Genistein und Daidzein auf die eNOS bedingte Produktion an L-Citrullin und NO keinen Einfluss. Das bedeutet, dass nach unseren Ergebnissen die Isoflavone trotz der Erhöhung der eNOS Proteinmenge keinen physiologischen Effekt vermitteln.

Die Diskrepanz der publizierten Daten zu unseren lässt sich mit den abweichenden Versuchsmodellen bzw. Zellen und den unterschiedlichen Stimulationszeiten erklären (siehe E3: Grund 1 und 2).

Welche Gründe gibt es, dass Genistein (stellvertretend für die Isoflavone) in unseren Experimenten unterschiedliche Ergebnisse auf den verschiedenen Ebenen der eNOS zeigt ?

- Die Promotoraktivität wurde an ECV304 Zellen gemessen, während alle anderen Experimente an EA.hy926 Zellen durchgeführt wurden. Auch hier sind eventuell unterschiedliche Eigenschaften der beiden Endothelzelltypen zu beachten (siehe E3: Grund 1).
- Die Isoflavone könnten eine beschleunigte eNOS mRNA-Degradation verursachen und somit könnte der Effekt der gesteigerten Transkription egalisiert werden.
- Die Isoflavone könnten posttranslationell die eNOS Enzymaktivität reduzieren, wodurch sich die erhöhte eNOS Proteinmenge nicht in einer gesteigerten Produktion an L-Citrullin und NO niederschlagen würde.

## 5 Wirkung von RWPE auf die eNOS

In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass Kurzzeitstimulation mit RWPE im Modell des mit Phenylephrin kontrahierten Rattenaortenrings eine Vasodilatation und Erhöhung an cGMP bedingt. Diese Effekte konnten mit NOS-Hemmern rückgängig gemacht werden (Stoclet, 2001). Erst kürzlich (März 2002) wurde gezeigt, dass die langfristige RWPE-Fütterung an L-NAME-hypertonen Ratten, zu einer Blutdrucksenkung und Erhöhung der NO-Synthese Aktivität in Aortenhomogenaten führte (Bernatova, I *et al.*, 2002).

In unseren Experimenten an Endothelzellen bedingte die RWPE-Langzeitstimulation (18-20 h) eine signifikante Erhöhung der eNOS Promotoraktivität, eNOS Proteinmenge und eNOS bedingten Produktion an L-Citrullin und NO. Dagegen konnte nach Kurzzeitstimulation (15 min) keine Erhöhung der eNOS bedingten L-Citrullinproduktion gemessen werden.

Die in der Literatur beschriebenen Kurzeiteffekte konnten in unserem Endothelzellmodell nicht gesehen werden. Erklärungen hierfür sind die unterschiedlichen Versuchsmodelle und Zellen sowie die nicht gewährte gleiche RWPE-Zusammensetzung (siehe E3: Gründe 1, 3).

Der am Modell der hypertonsierten Ratte gezeigte Langzeiteffekt von RWPE (Bernatova, I *et al.*, 2002) könnte wie in unserem Zellmodell durch eine nach Langzeitstimulation (20 h) erhöhte eNOS-bedingte NO-Produktion bedingt sein.

Des weiteren stellt sich die Frage, ob die gezeigte eNOS-bedingte Steigerung der NO- und L-Citrullinproduktion in der Tat auf transkriptionellen Effekten beruht. Da in dieser Arbeit keine Untersuchungen zur posttranslationellen Regulierung der eNOS durchgeführt wurden, kann diese Frage nicht eindeutig beantwortet werden. Allerdings weisen die folgenden zwei Tatsachen darauf hin, dass der RWPE wahrscheinlich nicht über posttranslationelle Effekte vermittelt:

- Erstens trat eine signifikant erhöhte L-Citrullinproduktion erst nach ca. 10 h RWPE-Stimulation auf (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht in etwa dem Zeitverlauf der Promotoraktivierung. Dagegen setzt eine Steigerung der eNOS Aktivität über die bis jetzt bekannten posttranslationellen Wege (z.B. Phosphorylierung, Protein-Proteininteraktionen) in der Regel schon nach wenigen Minuten ein (Garcia-Cardena *et al.*, 1998; Garcia-Cardena *et al.*, 1997; Scotland *et al.*, 2002).

- Zweitens unterstützt folgender Versuch diese These: EA.hy926 Zellen wurden mit RWPE stimuliert und danach zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 1, 2, 4, 8, 20 h) das Medium mit RWPE abgenommen. Nach Waschen mit PBS wurde den Zellen jeweils bis zum Versuchsstart (also 19, 18, 16, 12 und 0 h) normales Medium (ohne RWPE) gegeben. Das Ergebnis (Daten nicht gezeigt): Die nur 1 h stimulierten Zellen zeigten nach 20 h schon 80 % der L-Citrullinproduktion derjenigen Zellen, die 20 h stimuliert waren und ca. 170 % der unbehandelten Kontrollzellen. Die nur 2 h stimulierten zeigten schon fast 95 %. Das bedeutet, eine nur 2 stündige Stimulation reicht aus, um 20 h später annähernd den gleichen Effekt wie nach 20 h kontinuierlicher Stimulation zu erzielen. Auch dies spricht für eine transkriptionelle und nicht für eine posttranslationelle Beeinflussung der eNOS durch RWPE.

## 6 Wirkung von Beeren- und Fruchtexttrakten auf eNOS

Was bringt das Ergebnis der Fruchtsäfte für die Suche nach den wirksamen Verbindungen im RWPE ?

Zunächst ist zu sagen, dass alle getesteten Früchte reichlich Anthocyane enthalten. Diese leiten sich von drei Anthocyanidin-Grundtypen (Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin) ab. Von diesen Grundtypen leiten sich wiederum durch z.B. Veretherung einer phenolischen OH-Gruppe zu einer Methoxygruppe weitere Aglyka ab. Diese sind z.B. Malvidin = Delphinidin-3',5'-dimethylether und Paeonidin = Cyanidin-3'-methylether (Schweppe, 1993).

Einige Früchte enthalten ausschließlich bzw. vorwiegend nur ein Anthocyanidingrundtyp. Schwarzer Holunder enthält z.B. nur Cyanidinglykoside (Schweppe, 1993). Wenn eine solche Frucht keine Promotoraktivitätserhöhung zeigt, hätte man ein Indiz dafür, dass diese Glykoside bzw. Aglyka wahrscheinlich nicht wirksam sind.

Wider den Erwartungen bewirkten die getesteten Fruchtsaft-PPFs allerdings bis auf die PPF des Saftes der schwarzen Johannisbeere keine Erhöhung der eNOS Promotoraktivität. Auch diese PPF erhöhte die Promotoraktivität nur schwach (ca. 1,3-fach).

Die Folgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass wahrscheinlich Anthocyanine keine Erhöhung der eNOS Promotoraktivität bewirken. Dies gilt allerdings nur eingeschränkt, da es theoretisch möglich wäre, dass die PPFs der Fruchtsäfte andere Substanzen enthalten, welche die Promotoraktivität reduzieren. Somit wäre im Falle einer Promotoraktivitätssteigerung der Anthocyane der Gesamteffekt gleich null.

## 7 Mögliche wirksame Inhaltsstoffe(gruppen) im RWPE

Langfristiges Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es die/den Inhaltsstoff(e) im RWPE zu identifizieren, welche/welcher für die Wirkung auf die eNOS verantwortlich ist/sind.

In dieser Arbeit konnten die wirksamen Bestandteile des RWPE (noch) nicht ermittelt werden. Allerdings konnten durch Testung von Reinsubstanzen des RWPE einige Substanzen für die Wirksamkeit ausgeschlossen werden. Darüberhinaus wurden Frucht-/Drogenextrakte untersucht, die jeweils hohe Anteile an RWPE-charakteristischen Inhaltsstoffen(gruppen) enthalten. Durch die Ergebnisse der Langzeitstimulationen (18-20 h) mit Reinsubstanzen und Extrakten konnten folgende Hinweise über eventuell wirksame und vor allem unwirksame Bestandteile des RWPE gewonnen werden:

- Die oft „verdächtigten“ Rotweinpolyphenole Delphinidin und Quercetin haben keinen Einfluss auf die eNOS.
- Die im Rotwein enthaltenen Polyphenole Epicatechin und Rutin (Ergebnisse nicht gezeigt) haben keinen Einfluss auf die eNOS.
- Resveratrol (oft als gefäßprotektive Komponente von RWPE beschrieben) hat in diesen Konzentrationen ebenfalls keinen oder nur einen äußerst geringen Einfluss auf die eNOS. Allerdings enthält RWPE weitere Stilbenderivate. Falls diese ebenfalls leicht aktiv wären, könnten die Stilbenderivate insgesamt zumindest wirksamkeitsmitbestimmend sein.
- Die Ergebnisse der PPFs der Fruchtextrakte indizieren, dass Anthocyane wahrscheinlich nicht an der Wirkung beteiligt sind.
- Die Ergebnisse der unterschiedlichen Weinlagerung legen nahe, dass die Tannine im RWPE wahrscheinlich keinen Einfluss auf die eNOS haben.
- Flavonoidreiche Drogenextrakte wie WS1442 und ein Ginkgoextrakt (Ergebnis nicht gezeigt) hatten keinen Einfluss auf die eNOS. Dies indiziert, dass wahrscheinlich ubiquitär vorkommende Flavonoide nicht für die Wirkung des RWPE verantwortlich sind.
- Eine auf 57,8 % (m/m) oligomere-Procyanide angereicherter Extrakt, der aus WS1442 fraktioniert wurde (Chatterjee *et al.*, 1997), hatten keinen Einfluss auf die eNOS. Dies indiziert, dass oligomere Procyanidine im RWPE wahrscheinlich nicht zu der Wirkung beitragen.

Diese Hinweise können beim weiteren Prozedere der Suche nach den aktiven Verbindungen hilfreich sein.

## F. Zusammenfassung

---

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Drogenextrakten und Naturstoffen auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in humanen Endothelzellen (Primärkulturen und Zelllinien). Insbesondere wurde dabei ihr Einfluss auf den verschiedenen zellulären Ebenen (Transkription, Proteinexpression, NO-Synthese) untersucht.

Da es in dieser Arbeitsgruppe die erste Arbeit auf dem Gebiet der eNOS war, mussten zunächst Methoden etabliert und entwickelt werden, mit denen die eNOS auf den verschiedenen zellulären Ebenen detektiert werden kann. Etabliert wurden ein Luciferase-Reporter-Gen-Assay zur Messung der eNOS Promotoraktivität, eine Northern Blot-Methode zur Bestimmung der eNOS-mRNA und eine Western Blot-Methode zur Messung der eNOS Proteinmenge. Entwickelt wurden ein L-Arginin/L-Citrullin Umwandlungsassay zur Bestimmung der eNOS-bedingten L-Citrullinproduktion und ein DAF-2 Fluoreszenzassay zur Messung der eNOS-bedingten NO-Produktion.

Getestet wurden Extrakte und Naturstoffe, bei denen bereits positive kardiovaskuläre Eigenschaften wie Vasodilatation bekannt bzw. in der Diskussion waren.

Keinen Einfluss auf die eNOS hatten:

- Knoblauchextrakte und schwefelhaltige Knoblauchextraktinhaltsstoffe
- Der Weißdornblüten- und Blätterextrakt WS1442
- Die Catechinderivate Epicatechin-3-gallat und Epigallocatechin-3-gallat
- Die Rotweinpolyphenole Delphinidin, Quercetin, Epicatechin und Rutin

Dagegen konnten Isoflavone der Sojabohne, wie Genistein, Daidzein, Formononetin, Biochanin A und Equol die eNOS Promotoraktivität konzentrationsabhängig erhöhen. Genistein (stellvertretend für alle Isoflavone im Western Blot getestet) erhöhte auch die eNOS Proteinmenge. Allerdings bewirkte Genistein, trotz der Erhöhung der Proteinmenge, keine Erhöhung der eNOS abhängigen Bildung an L-Citrullin und NO.

Positive Ergebnisse brachten die Tests mit einem Rotweinpolyphenolextrakt (RWPE). Dieser Extrakt erhöhte signifikant die NO-Produktion in den beiden getesteten Endothelzellarten (EA.hy926 Zellen und HUVECs). Um den molekularen Mechanismus der NO-Produktionserhöhung durch RWPE aufzuklären, wurden verschiedene Ebenen der eNOS Regulation untersucht. Dabei konnte in dieser

Arbeit zum ersten mal gezeigt werden, dass RWPE sowohl die eNOS Promotoraktivität als auch die eNOS Proteinexpression erhöht.

Die nächste Frage war, ob die NO-Produktionserhöhung kausal mit der gemessenen Transkriptionserhöhung zusammenhängt. Zeitabhängige Untersuchungen auf den verschiedenen Ebenen der eNOS Regulation ergaben ähnliche Ergebnisse mit einer signifikant messbaren Beeinflussung stets nach ca. 10 h. Dies deutet darauf hin, dass RWPE die eNOS-abhängige NO-Produktion über eine Erhöhung der eNOS Transkription/Translation erhöht. Allerdings konnte dies auf Grund fehlender Experimente über eine posttranslationelle eNOS Beeinflussung nicht eindeutig bewiesen werden.

Abschließend sollte mit der Suche nach den wirksamen Bestandteilen im RWPE begonnen werden. Auch wenn im Verlauf dieser Arbeit die wirksamen Verbindungen noch nicht gefunden wurden, konnten zumindest einige Substanzen als wirksamkeitsbestimmend oder -mitbestimmend ausgeschlossen werden. Neben einigen nicht wirksamen Rotweinpolyphenolen (Delphinidin, Rutin, Quercetin, Epicatechin) geben die durchgeführten Experimente Hinweise darauf, dass auch Anthocyane, Tannine und oligomere Procyanidine unwirksam sind. Das Stilbenderivat Resveratrol, welches oft als eine kardiovaskulär aktive Komponente im Rotwein angesehen wird, hatte nur einen sehr geringen und auf der Ebene der NO-Produktion nicht signifikanten Effekt auf die eNOS.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit ein Modell zur Messung von Einflüssen auf die eNOS aufgebaut. Von den getesteten Extrakten und Naturstoffen beeinflusste nur RWPE signifikant die eNOS. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass RWPE in Endothelzellen nach Langzeitstimulation (20 h) die eNOS Transkription, eNOS Expression und eNOS bedingte NO-Produktion erhöht. Dieses Ergebnis ist physiologisch äußerst interessant. Denn bisher bekannte, die eNOS Expression erhöhende Substanzen (z.B: Östradiol, Cyclosporin A, Insulin, Phorbol ester, Wasserstoffperoxid, Staurosporin, Angiotensin II) sind auf Grund ihrer vielseitigen physiologischen/toxischen Wirkungen therapeutisch zur Prophylaxe und Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen kaum einsetzbar.

Die Aufgabe zukünftiger Arbeiten wird es sein, die Wirkung von RWPE *in vivo* zu untersuchen und die für die Wirkung verantwortlichen Bestandteile des RWPE zu finden.



## G. Anhang

### 1 Abkürzungen

A.U.	Arbitrary Units
% (m/m)	Massenprozent
% (v/v)	Volumenprozent
μM	mikro molar ( $10^{-6}$ )
Abb.	Abbildung
AMPK	AMP-aktivierte-Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BH <sub>4</sub>	5, 6, 7, 8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel (Zerfälle pro Sekunde)
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3`,5`-monophosphat
Co	Kontrolle
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAF-2DA	4,5-diaminofluoresceindiacetat
DAF-2T	Triazolofluorescein
DMEM	Dulbecco`s Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol (threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
ECG	Epicatechin-3-gallat
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N`, N`, N`, N`-tetraessigsäure
EGG	Epigallocatechin-3-gallat
eNOS	Endotheliale NO-Synthase

## Abkürzungen

---

ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FKS	Fötales Kälberserum
fM	fento molar ( $10^{-12}$ )
FMN	Flavinmononukleotid
GDP	Glyoxal-DMSO-Phosphat
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Häm	Eisen Protoporphyrin IX
HbO <sub>2</sub>	Oxyhämoglobin
HDL	High-lipodensity-protein
Hsp90	Hitzeschock Protein 90
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDL	Low-lipodensity-protein
L-NAA	N <sup>G</sup> -Amino-L-Arginin
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Argininmethylester
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Nitro-monomethyl-L-Arginin
L-NNA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MeOH	Methanol
metHB	Methämoglobin
MKR	Multiple Klonierungsregion
mM	milli molar ( $10^{-3}$ )
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaAc	Natriumacetat

NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nM	nano molar ( $10^{-9}$ )
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxidradikal
NO <sup>-</sup>	Nitroxylat-Anion
NO <sup>+</sup>	Nitrosyl-Kation
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxidradikal
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
nt	Nukleotid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
O <sub>3</sub>	Ozon
OD	Optische Dichte
OONO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Probenpuffer
PPF	Polyphenolfraktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RWPE	Rotweinpolyphenolextrakt
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde

sGC	Lösliche Guanylylcyklase
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitratpuffer
STE	Natriumchlorid, Tris, EDTA-Puffer
STET	Natriumchlorid, Tris, EDTA-Puffer mit Triton X-100
TBE	Tris, Borat, EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N <sup>^</sup> , N <sup>^</sup> , N <sup>^</sup> , N <sup>^</sup> -Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
totRNA	Totale RNA
U	Unit
UTP	Uridin-5`-triphosphat
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	vaskular endothelial growth factor
VF	Vorlauffraktion

## 2 Alphabetische Firmenliste

Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland

Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland

Beckman Instruments GmbH, München, DEUTSCHLAND

Becton Dickinson, San Jose, CY, USA

Bio Whittaker Bioproducts, Heidelberg, Deutschland

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

Eastman Kodak Company, New York, USA

Eppendorf, Maintal, Deutschland

Fluka Chemikalien AG, Deisenhofen, Deutschland

Fuji Film, Tokio, Japan

Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

Greiner, Würzburg, Deutschland

Heraeus Instruments, München, Deutschland

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland  
Münchner Medizin Mechanik GmbH, München, Deutschland  
NEN™ Life Science Products, Boston, USA  
Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland  
PESKE, Aindling-Pichl, Deutschland  
Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland  
Promega, Heidelberg, Deutschland  
Promo Cell, Europa  
Quiagen, Hilden, Deutschland  
Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland  
Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland  
Schleicher & Schüll GmbH, Dassel, Deutschland  
Serva, Heidelberg, Deutschland  
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland  
Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland  
Transduction Laboratories, Hamburg, Deutschland  
Uni Equip, München, Deutschland  
Wallac, Turku, Finnland

## H. Literaturverzeichnis

---

### 1 Zitierte Veröffentlichungen

Alderton WK, Cooper C E and Knowles R G (2001) Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition. *Biochem J* 357: pp 593-615.

Alheid U, Frolich J C and Forstermann U (1987) Endothelium-Derived Relaxing Factor From Cultured Human Endothelial Cells Inhibits Aggregation of Human Platelets. *Thromb Res* 47: pp 561-571.

Andriambeloson E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet J C and Andriantsitohaina R (1998) Natural Dietary Polyphenolic Compounds Cause Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta. *J Nutr* 128: pp 2324-2333.

Anthony MS, Clarkson T B and Williams J K (1998) Effects of Soy Isoflavones on Atherosclerosis: Potential Mechanisms. *Am J Clin Nutr* 68: pp 1390S-1393S.

Arnal JF, Tack I, Besombes J P, Pipy B and Negre-Salvayre A (1996) Nitric Oxide and Superoxide Anion Production During Endothelial Cell Proliferation. *Am J Physiol* 271: pp C1521-C1526.

Bai Y, Suzuki A K and Sagai M (2001) The Cytotoxic Effects of Diesel Exhaust Particles on Human Pulmonary Artery Endothelial Cells in Vitro: Role of Active Oxygen Species. *Free Radic Biol Med* 30: pp 555-562.

Barnes S (1998) Evolution of the Health Benefits of Soy Isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: pp 386-392.

Bernatova I, I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S and Andriantsitohaina R (2002) Wine Polyphenols Improve Cardiovascular Remodeling and Vascular Function in NO-Deficient Hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: pp H942-H948.

Birnboim HC and Doly J (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: pp 1513-1523.

Bodkin DK and Knudson D L (1985) Sequence Relatedness of Palyam Virus Genes to Cognates of the Palyam Serogroup Viruses by RNA-RNA Blot Hybridization. *Virology* 143: pp 55-62.

Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: pp 248-254.

Broillet M, Randin O and Chatton J (2001) Photoactivation and Calcium Sensitivity of the Fluorescent NO Indicator 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2): Implications for Cellular NO Imaging. *FEBS Lett* 491: pp 227-232.

Caderni G, De Filippo C, Luceri C, Salvadori M, Giannini A, Biggeri A, Remy S, Cheynier V and Dolara P (2000) Effects of Black Tea, Green Tea and Wine Extracts on Intestinal Carcinogenesis Induced by Azoxymethane in F344 Rats. *Carcinogenesis* 21: pp 1965-1969.

Cardona-Sanclemente LE and Born G V (1995) Effect of Inhibition of Nitric Oxide Synthesis on the Uptake of LDL and Fibrinogen by Arterial Walls and Other Organs of the Rat. *Br J Pharmacol* 114: pp 1490-1494.

Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa W C and Bender J R (1997) 17 Beta-Estradiol Regulation of Human Endothelial Cell Basal Nitric Oxide Release, Independent of Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Mobilization. *Circ Res* 81: pp 885-892.

Chatterjee SS, Koch E, Jaggy H and Krzeminski T (1997) [In Vitro and in Vivo Studies on the Cardioprotective Action of Oligomeric Procyanidins in a Crataegus Extract of Leaves and Blooms]. *Arzneimittelforschung* 47: pp 821-825.

Chen ZY, Zhang Z S, Kwan K Y, Zhu M, Ho W K and Huang Y (1998) Endothelium-Dependent Relaxation Induced by Hawthorn Extract in Rat Mesenteric Artery. *Life Sci* 63: pp 1983-1991.

Chirgwin JM, Przybyla A E, MacDonald R J and Rutter W J (1979) Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid From Sources Enriched in Ribonuclease. *Biochemistry* 18: pp 5294-5299.

Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162: pp 156-159.

Corson MA, James N L, Latta S E, Nerem R M, Berk B C and Harrison D G (1996) Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. *Circ Res* 79: pp 984-991.

Das I, Hirani J and Sooranna S (1996) Arginine Is Not Responsible for the Activation of Nitric Oxide Synthase by Garlic. *J Ethnopharmacol* 53: pp 5-9.

Das I, Khan N S and Sooranna S R (1995) Potent Activation of Nitric Oxide Synthase by Garlic: a Basis for Its Therapeutic Applications. *Curr Med Res Opin* 13: pp 257-263.

Dedio J, Konig P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W and Muller-Esterl W (2001) NOSIP, a Novel Modulator of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *FASEB J* 15: pp 79-89.

Deguchi T and Yoshioka M (1982) L-Arginine Identified As an Endogenous Activator for Soluble Guanylate Cyclase From Neuroblastoma Cells. *J Biol Chem* 257: pp 10147-10151.

Delp MD and Laughlin M H (1997) Time Course of Enhanced Endothelium-Mediated Dilatation in Aorta of Trained Rats. *Med Sci Sports Exerc* 29: pp 1454-1461.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher A M (1999) Activation of Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cells by Akt-Dependent Phosphorylation. *Nature* 399: pp 601-605.

Drenkhahn, D. and Zenker, W. Anatomie, Band 1, 15. Auflage. 652-685. 1994.

Duchstein HJ, Riederer S and Erbach C (1999) [Active Nitrogen Species. A New Research Area for Pharmaceutical Chemistry]. *Pharm Unserer Zeit* 28: pp 197-207.

Edgell CJ, McDonald C C and Graham J B (1983) Permanent Cell Line Expressing Human Factor VIII-Related Antigen Established by Hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: pp 3734-3737.

Egen-Schwind C, Eckard R and Kemper F H (1992) Metabolism of Garlic Constituents in the Isolated Perfused Rat Liver. *Planta Med* 58: pp 301-305.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager J P and Balligand J L (1999) Hypercholesterolemia Decreases Nitric Oxide Production by Promoting the Interaction of Caveolin and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *J Clin Invest* 103: pp 897-905.

Feron O, Michel J B, Sase K and Michel T (1998) Dynamic Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Complementary Roles of Dual Acylation and Caveolin Interactions. *Biochemistry* 37: pp 193-200.

Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp B E and Busse R (2001) Phosphorylation of Thr(495) Regulates Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *Circ Res* 88: pp E68-E75.

Flesch M, Schwarz A and Bohm M (1998) Effects of Red and White Wine on Endothelium-Dependent Vasorelaxation of Rat Aorta and Human Coronary Arteries. *Am J Physiol* 275: pp H1183-H1190.

Förstermann U (1994) Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide Synthases. *Arzneimittelforschung* 44: pp 402-407.

Förstermann 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: pp 773-790.

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U and Starke K (2001) *Allgemeine Und Spezielle Pharmakologie Und Toxikologie*.

Freedman JE, Parker C, III, Li L, Perlman J A, Frei B, Ivanov V, Deak L R, Iafrafi M D and Folts J D (2001) Select Flavonoids and Whole Juice From Purple Grapes Inhibit Platelet Function and Enhance Nitric Oxide Release. *Circulation* 103: pp 2792-2798.

Fulcrand H, Remy S, Souquet J M, Cheynier V and Moutounet M (1999) Study of Wine Tannin Oligomers by on-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 47: pp 1023-1028.

Fulton D, Gratton J P and Sessa W C (2001) Post-Translational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Why Isn't Calcium/Calmodulin Enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299: pp 818-824.

Furchgott RF, Cherry P D, Zawadzki J V and Jothianandan D (1984) Endothelial Cells As Mediators of Vasodilation of Arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2: pp S336-S343.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A and Sessa W C (1998) Dynamic Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Hsp90. *Nature* 392: pp 821-824.



- 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: pp 25437-25440.
- Goetz RM, Thatte H S, Prabhakar P, Cho M R, Michel T and Golan D E (1999) Estradiol Induces the Calcium-Dependent Translocation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: pp 2788-2793.
- Govers R and Rabelink T J (2001) Cellular Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: pp F193-F206.
- Gray GA, Sharif I, Webb D J and Seckl J R (2001) Oestrogen and the Cardiovascular System: the Good, the Bad and the Puzzling. *Trends Pharmacol Sci* 22: pp 152-156.
- Green LC, Tannenbaum S R and Goldman P (1981) Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. *Science* 212: pp 56-58.
- Groves JT and Wang C C (2000) Nitric Oxide Synthase: Models and Mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4: pp 687-695.
- 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: pp 8254-8260.
- Hibbs JB, Jr., Taintor R R and Vavrin Z (1987) Macrophage Cytotoxicity: Role for L-Arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science* 235: pp 473-476.
- Hirata K, Miki N, Kuroda Y, Sakoda T, Kawashima S and Yokoyama M (1995) Low Concentration of Oxidized Low-Density Lipoprotein and Lysophosphatidylcholine Upregulate Constitutive Nitric Oxide Synthase mRNA Expression in Bovine Aortic Endothelial Cells. *Circ Res* 76: pp 958-962.
- Huang A, Vita J A, Venema R C and Keaney J F, Jr. (2000) Ascorbic Acid Enhances Endothelial Nitric-Oxide Synthase Activity by Increasing Intracellular Tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 275: pp 17399-17406.
- Huang Y, Zhang A, Lau C W and Chen Z Y (1998) Vasorelaxant Effects of Purified Green Tea Epicatechin Derivatives in Rat Mesenteric Artery. *Life Sci* 63: pp 275-283.
- Katusic ZS (2001) Vascular Endothelial Dysfunction: Does Tetrahydrobiopterin Play a Role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: pp H981-H986.
- Keefer LK, Nims R W, Davies K M and Wink D A (1996) "NONOates" (1-Substituted Diazen-1-ium-1,2-Diolates) As Nitric Oxide Donors: Convenient Nitric Oxide Dosage Forms. *Methods Enzymol* 268: pp 281-293.
- Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y and Hirobe M (1993a) Detection of Nitric Oxide Production From a Perfused Organ by a Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> System. *Anal Chem* 65: pp 1794-1799.

Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y and Hirobe M (1993b) Real Time Measurement of Nitric Oxide Produced Ex Vivo by Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Chemiluminescence Method. *J Biol Chem* 268: pp 23106-23110.

Kim SH, Kang K W, Kim K W and Kim N D (2000) Procyanidins in Crataegus Extract Evoke Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Aorta. *Life Sci* 67: pp 121-131.

Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H and Förstermann U (1998) Estrogens Increase Transcription of the Human Endothelial NO Synthase Gene: Analysis of the Transcription Factors Involved. *Hypertension* 31: pp 582-588.

Kleschyov AL, Mollnau H, Oelze M, Meinertz T, Huang Y, Harrison D G and Munzel T (2000) Spin Trapping of Vascular Nitric Oxide Using Colloid Fe(II)- Diethyldithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun* 275: pp 672-677.

Koch E and Chatterjee S S (2000) Crataegus Extract WS-1442 Enhances Coronary Flow in the Isolated Rat Heart by Endothelial Release of Nitric Oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Suppl.* 4, R48: pp 361.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y and Nagano T (1998a) Detection and Imaging of Nitric Oxide With Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70: pp 2446-2453.

Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y and Nagano T (1998b) Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 46: pp 373-375.

Komarov AM, Kramer J H, Mak I T and Weglicki W B (1997) EPR Detection of Endogenous Nitric Oxide in Postischemic Heart Using Lipid and Aqueous-Soluble Dithiocarbamate-Iron Complexes. *Mol Cell Biochem* 175: pp 91-97.

Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: pp 680-685.

Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner B M and Marsden P A (1992) Effects of Interferon-Gamma on Nitric Oxide Synthase Activity and Endothelin-1 Production by Vascular Endothelial Cells. *J Clin Invest* 90: pp 879-887.

Lawson LD, Wang Z J and Hughes B G (1991) Identification and HPLC Quantitation of the Sulfides and Dialk(En)YL Thiosulfinates in Commercial Garlic Products. *Planta Med* 57: pp 363-370.

Leikert JF, Rathel T R, Muller C, Vollmar A M and Dirsch V M (2001) Reliable in Vitro Measurement of Nitric Oxide Released From Endothelial Cells Using Low Concentrations of the Fluorescent Probe 4,5-Diaminofluorescein. *FEBS Lett* 506: pp 131-134.

Li H and Förstermann U (2000) Nitric Oxide in the Pathogenesis of Vascular Disease. *J Pathol* 190: pp 244-254.

- Li H, Oehrlein S A, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshofer T, Jessen T, Herget T, Förstermann U and Kleinert H (1998) Activation of Protein Kinase C Alpha and/or Epsilon Enhances Transcription of the Human Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Mol Pharmacol* 53: pp 630-637.
- Liao JK, 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: pp 319-324.
- Linder L, Kiowski W, Buhler F R and Luscher T F (1990) Indirect Evidence for Release of Endothelium-Derived Relaxing Factor in Human Forearm Circulation in Vivo. Blunted Response in Essential Hypertension. *Circulation* 81: pp 1762-1767.
- Liu J, Garcia-Cardena G and Sessa W C (1995) Biosynthesis and Palmitoylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Mutagenesis of Palmitoylation Sites, Cysteines-15 and/or -26, Argues Against Depalmitoylation-Induced Translocation of the Enzyme. *Biochemistry* 34: pp 12333-12340.
- Luscher TF, Tanner F C, Tschudi M R and Noll G (1993) Endothelial Dysfunction in Coronary Artery Disease. *Annu Rev Med* 44: pp 395-418.
- Malinski T, Mesaros S and Tomboulian P (1996) Nitric Oxide Measurement Using Electrochemical Methods. *Methods Enzymol* 268: pp 58-69.
- Mandel M and Higa A (1970) Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection. *J Mol Biol* 53: pp 159-162.
- Michel JB, Feron O, Sacks D and Michel T (1997) Reciprocal Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin and Caveolin. *J Biol Chem* 272: pp 15583-15586.
- Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power D A, Sim A T and Kemp B E (2001) Coordinated Control of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the CAMP-Dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 276: pp 17625-17628.
- Miller RT, Martasek P, Roman L J, Nishimura J S and Masters B S (1997) Involvement of the Reductase Domain of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Superoxide Anion Production. *Biochemistry* 36: pp 15277-15284.
- Minor RL, Jr., Myers P R, Guerra R, Jr., Bates J N and Harrison D G (1990) Diet-Induced Atherosclerosis Increases the Release of Nitrogen Oxides From Rabbit Aorta. *J Clin Invest* 86: pp 2109-2116.
- Mishra SK, Abbot S E, Choudhury Z, Cheng M, Khatab N, Maycock N J, Zavery A and Aaronson P I (2000) Endothelium-Dependent Relaxation of Rat Aorta and Main Pulmonary Artery by the Phytoestrogens Genistein and Daidzein. *Cardiovasc Res* 46: pp 539-546.
- Montecinos VP, Aguayo C, Flores C, Wyatt A W, Pearson J D, Mann G E and Sobrevia L (2000) Regulation of Adenosine Transport by D-Glucose in Human Fetal Endothelial Cells: Involvement of Nitric Oxide, Protein Kinase C and Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Physiol* 529 Pt 3: pp 777-790.

- Nagata N, Momose K and Ishida Y (1999) Inhibitory Effects of Catecholamines and Anti-Oxidants on the Fluorescence Reaction of 4,5-Diaminofluorescein, DAF-2, a Novel Indicator of Nitric Oxide. *J Biochem (Tokyo)* 125: pp 658-661.
- Nakaki T, Nakayama M and Kato R (1990) Inhibition by Nitric Oxide and Nitric Oxide-Producing Vasodilators of DNA Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Eur J Pharmacol* 189: pp 347-353.
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T and Nagano T (1998) Direct Evidence of Nitric Oxide Production From Bovine Aortic Endothelial Cells Using New Fluorescence Indicators: Diaminofluoresceins. *FEBS Lett* 427: pp 263-266.
- Navarro-Antolin J, Lopez-Munoz M J, Klatt P, Soria J, Michel T and Lamas S (2001) Formation of Peroxynitrite in Vascular Endothelial Cells Exposed to Cyclosporine A. *FASEB J* 15: pp 1291-1293.
- Nunokawa Y and Tanaka S (1992) Interferon-Gamma Inhibits Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells by Nitric Oxide Generation. *Biochem Biophys Res Commun* 188: pp 409-415.
- Ohara Y, Peterson T E and Harrison D G (1993) Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *J Clin Invest* 91: pp 2546-2551.
- Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro J M, Gomez E and Fernandez P (2002) The Possible Implication of Trans-Resveratrol in the Cardioprotective Effects of Long-Term Moderate Wine Consumption. *Mol Pharmacol* 61: pp 294-302.
- Palmer RM, Ferrige A G and Moncada S (1987) Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* 327: pp 524-526.
- Paul T, Hassan M A, Korth H G, Sustmann R and Avila D V (1996) Reaction of Phenyl-Substituted O-Quinodimethanes With Nitric Oxide. Are Benzocyclobutenes Suitable Precursors for Nitric Oxide Cheletropic Traps? *J Org Chem* 61: pp 6835-6848.
- Pedraza-Chaverri J, Tapia E, Medina-Campos O N, los Angeles G M and Franco M (1998) Garlic Prevents Hypertension Induced by Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis. *Life Sci* 62: pp L-7.
- Radomski MW, Palmer R M and Moncada S (1987) The Anti-Aggregating Properties of Vascular Endothelium: Interactions Between Prostacyclin and Nitric Oxide. *Br J Pharmacol* 92: pp 639-646.
- Rahman K (2001) Historical Perspective on Garlic and Cardiovascular Disease. *J Nutr* 131: pp 977S-979S.
- Renaud S and de Lorgeril M (1992) Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart Disease. *Lancet* 339: pp 1523-1526.
- Riemersma RA, Rice-Evans C A, Tyrrell R M, Clifford M N and Lean M E (2001) Tea Flavonoids and Cardiovascular Health. *QJM* 94: pp 277-282.
- Roberts RJ and Macelis D (1992) Restriction Enzymes and Their Isoschizomers. *Nucleic Acids Res* 20 Suppl: pp 2167-2180.

Rusche KM, Spiering M M and Marletta M A (1998) Reactions Catalyzed by Tetrahydrobiopterin-Free Nitric Oxide Synthase. *Biochemistry* 37: pp 15503-15512.

Sakoda T, Hirata K, Kuroda R, Miki N, Suematsu M, Kawashima S and Yokoyama M (1995) Myristoylation of Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase Is Important for Extracellular Release of Nitric Oxide. *Mol Cell Biochem* 152: pp 143-148.

Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G and Siracusa M A (2002) Progress in the Development of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors. *Curr Pharm Des* 8: pp 177-200.

Schweppe H (1993) *Handbuch Der Naturfarbstoffe*.

Scotland RS, Morales-Ruiz M, Chen Y, Yu J, Rudic R D, Fulton D, Gratton J P and Sessa W C (2002) Functional Reconstitution of Endothelial Nitric Oxide Synthase Reveals the Importance of Serine 1179 in Endothelium-Dependent Vasomotion. *Circ Res* 90: pp 904-910.

Sessa WC, 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: pp 349-353.

Shaul PW, Smart E J, Robinson L J, German Z, Yuhanna I S, Ying Y, Anderson R G and Michel T (1996) Acylation Targets Endothelial Nitric-Oxide Synthase to Plasmalemmal Caveolae. *J Biol Chem* 271: pp 6518-6522.

Sohn HY, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J and Pohl U (2000) Differential Role of Angiotensin II Receptor Subtypes on Endothelial Superoxide Formation. *Br J Pharmacol* 131: pp 667-672.

Stoclet JC (2001) Bonum Vinum Laetificat Cor Hominum. *Med Sci Monit* 7: pp 842-847.

Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambeloson E, Diebolt M and Andriantsitohaina R (1999) Endothelial NO Release Caused by Red Wine Polyphenols. *J Physiol Pharmacol* 50: pp 535-540.

Stuehr DJ and Marletta M A (1985) Mammalian Nitrate Biosynthesis: Mouse Macrophages Produce Nitrite and Nitrate in Response to Escherichia Coli Lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: pp 7738-7742.

Suzuki N, Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Hirata Y and Nagano T (2002) Orthogonality of Calcium Concentration and Ability of 4,5-Diaminofluorescein to Detect NO. *J Biol Chem* 277: pp 47-49.

Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, Mukai K and Goto T (1990) Spontaneous Transformation and Immortalization of Human Endothelial Cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: pp 265-274.

Tarpey MM and Fridovich I (2001) Methods of Detection of Vascular Reactive Species: Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite. *Circ Res* 89: pp 224-236.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters B S, Karoui H, Tordo P and Pritchard K A, Jr. (1998) Superoxide Generation by Endothelial Nitric Oxide Synthase: the Influence of Cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: pp 9220-9225.

Walker HA, Dean T S, Sanders T A, Jackson G, Ritter J M and Chowienczyk P J (2001) The Phytoestrogen Genistein Produces Acute Nitric Oxide-Dependent Dilation of Human Forearm Vasculature With Similar Potency to 17 $\beta$ -Estradiol. *Circulation* 103: pp 258-262.

Weikl A, Assmus K D, Neukum-Schmidt A, Schmitz J, Zapfe G, Noh H S and Siegrist J (1996) [Crataegus Special Extract WS 1442. Assessment of Objective Effectiveness in Patients With Heart Failure (NYHA II)]. *Fortschr Med* 114: pp 291-296.

Wever RM, Luscher T F, Cosentino F and Rabelink T J (1998) Atherosclerosis and the Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 97: pp 108-112.

Woodman CR, Muller J M, Laughlin M H and Price E M (1997) Induction of Nitric Oxide Synthase mRNA in Coronary Resistance Arteries Isolated From Exercise-Trained Pigs. *Am J Physiol* 273: pp H2575-H2579.

Yang CS (1999) Tea and Health. *Nutrition* 15: pp 946-949.

Yeh YY and Liu L (2001) Cholesterol-Lowering Effect of Garlic Extracts and Organosulfur Compounds: Human and Animal Studies. *J Nutr* 131: pp 989S-993S.

Yoshizumi M, Perrella M A, Burnett J C, Jr. and Lee M E (1993) Tumor Necrosis Factor Downregulates an Endothelial Nitric Oxide Synthase mRNA by Shortening Its Half-Life. *Circ Res* 73: pp 205-209.

Zapfe jG (2001) Clinical Efficacy of Crataegus Extract WS 1442 in Congestive Heart Failure NYHA Class II. *Phytomedicine* 8: pp 262-266.

Zollner S, Aberle S, Harvey S E, Polokoff M A and Rubanyi G M (2000) Changes of Endothelial Nitric Oxide Synthase Level and Activity During Endothelial Cell Proliferation. *Endothelium* 7: pp 169-184.

## 2 Eigene Veröffentlichungen

### 2.1 Originalpublikationen

Leikert JF, Räthel TR, Müller C, Vollmar AM, Dirsch VM **2001** Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Letters* 506:131-134

Leikert JF, Räthel TR, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM **2002** Red wine polyphenols enhance nitric oxide release from endothelial cells and increase endothelial nitric oxide synthase expression. submitted to *Circulation* (in rebuttle)

### 2.2 Abstracts zu Postern

Leikert JF, Vollmar AM, Dirsch VM Soy isoflavones increase NOS III promoter activity in endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology, Supplement to Volume 363, No.4 2001*

Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2001,

## I. Lebenslauf

---

Name: Jürgen Friedrich Leikert  
Geburtsdatum: 13.01.1974  
Geburtsort: Traunstein  
Eltern: Margrit Leikert, geb. Taaks  
Roland Leikert

---

Schulbildung 1980 – 1984 Grundschule Siegsdorf  
1984 – 1993 Chiemgau-Gymnasium-Traunstein  
Juni 1993: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Pharmazie 1993 – 1997 Ludwigs-Maximilians-Universität München  
WS 93 – SS 95 Grundstudium 09/95: 1. Staatsexamen  
WS 95 – SS 97 Hauptstudium 10/97: 2. Staatsexamen  
11/97 – 10/98 Pharmaziepraktikum  
1. Halbjahr: Westkreuz-Apotheke in München  
2. Halbjahr: Hexal AG in Holzkirchen

Arbeit während dem Studium mehrmalige Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Arbeitskreis von Prof. Wanner in der pharmazeutischen Chemie der LMU München

Approbation 12/98

Arbeit als Apotheker 01/99-02/99 Marien-Apotheke in Siegsdorf

Wissenschaftliche Tätigkeit Seit 03/99 Anfertigung einer Dissertation unter Anleitung von Frau Prof. Vollmar am Department für Pharmazie der LMU München