

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



**Untersuchungen zum Einfluß von Sojaisoflavonen und
Rotweinpolyphenolextrakten auf die Expression und Aktivität der
endothelialen NO-Synthase**

von
Thomas Ralph Räthel
aus
München
2005

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs.3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Professor Dr. V. M. Dirsch betreut

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 28.01.2005

Thomas R. Räthel

Dissertation eingereicht am	28.01.2005
1. Gutachter	Professor Dr. V. M. Dirsch
2. Gutachter	Professor Dr. F. Bracher
Mündliche Prüfung am	28.02.2005

meinen Lehrern
Norbert Stamminger
Franz Wieand

I Inhalt

I	INHALT	1
II	EINLEITUNG	5
1	ÜBERSICHT UND FRAGESTELLUNG	5
2	STICKSTOFFMONOXID ALS SIGNALMOLEKÜL	6
2.1	<i>Physiologische Wirkungen von NO</i>	6
2.2	<i>NO und Atherosklerose</i>	7
3	NO QUELLEN IM KÖRPER: DIE NOS ISOENZYME	8
3.1	<i>Unterscheidungsmerkmale der NO-Synthasen</i>	8
4	DIE ENDOTHELIALE NO-SYNTHASE	9
4.1	<i>Das eNOS Protein</i>	9
4.1.1	Allgemeines	9
4.1.2	NO Bildung durch die eNOS	9
4.2	<i>Regulation der eNOS Expression</i>	10
4.3	<i>Regulation der intrazellulären Lokalisation der eNOS</i>	12
4.4	<i>Regulation der eNOS Aktivität</i>	13
4.4.1	Ca ²⁺ regulierte Aktivierung	13
4.4.2	Protein-Protein Wechselwirkungen	13
4.4.3	Phosphorylierung	14
4.4.4	Zusammenfassung der eNOS aktivierenden Mechanismen	15
5	SOJA UND DIE eNOS.....	16
6	ROTWEIN UND DIE eNOS.....	17
III	MATERIAL UND METHODEN	18
1	ZELLKULTUR	18
1.1	<i>Zelllinien</i>	18
1.1.1	EA.hy926:.....	18
1.1.2	EA.hy926-heNOS-Luc:	18
1.1.3	RAW 264.7	18
1.2	<i>Primärzellen</i>	18
1.2.1	HUVEC:	18
1.3	<i>Nährmedien und Zusätze</i>	19
1.3.1	Nährmedien	19
1.3.2	Besonderheiten und Zusätze:	19
1.4	<i>Lösungen und Puffer</i>	20
1.4.1	Sterilität:	20
1.4.2	PBS:.....	20
1.4.3	PBS ⁺ :.....	20
1.4.4	T/E:.....	20
1.5	<i>Zellkultur</i>	21
1.5.1	EA.hy926:.....	21
1.5.2	HUVEC:	22
1.5.3	RAW 264.7:.....	22
1.5.4	Zellzahlbestimmung	23
2	ROTWEINEXTRAKTE UND NATURSTOFFE	24
2.1	<i>Herstellung der Rotwein- und Traubenextrakte</i>	24
2.2	<i>Untersuchte Weine</i>	24
2.3	<i>Fruchtsaft-Polyphenolextrakte</i>	27
2.4	<i>Naturstoffe</i>	27
2.4.1	Resveratrol.....	27
2.4.2	Soja-Inhaltsstoffe.....	28
2.4.3	Estrogen.....	29
2.4.4	Weitere Naturstoffe und Naturstoffderivate.....	29
3	BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DES HUMANEN eNOS PROMOTORS MITTELS LUZIFERASE REPORTERGEN EXPERIMENTEN	31
3.1	<i>Theorie</i>	31
3.2	<i>Lösungen</i>	31
3.3	<i>Versuchsablauf</i>	31
4	MRNA BESTIMMUNG MITTELS REAL TIME PCR	33
4.1	<i>Theorie</i>	33
4.2	<i>Lösungen</i>	34

4.2.1	RNA Isolierung.....	34
4.2.2	RNA Gelelektrophorese.....	34
4.2.3	RealTime RT-PCR.....	34
4.3	<i>Versuchsablauf</i>	34
4.3.1	RNA Isolierung.....	35
4.3.2	Reverse Transkription.....	35
4.3.3	PCR Reaktion.....	35
5	PROTEIN DETEKTION MITTELS WESTERN BLOT.....	37
5.1	<i>Theorie</i>	37
5.2	<i>Lösungen</i>	38
5.2.1	Lysepuffer:.....	38
5.2.2	Proteaseinhibitor, Stocklösung:.....	38
5.2.3	5-fach Probenpuffer:.....	39
5.2.4	Sammelgel:.....	39
5.2.5	Trenngel:.....	39
5.2.6	Elektrophorese-Puffer:.....	39
5.2.7	Transfer-Puffer:.....	40
5.2.8	TBS-T:.....	40
5.2.9	Antikörper Lösungen.....	40
5.2.10	Hausgemachtes Chemolumineszenz Reagenz.....	40
5.2.11	Färbelösungen.....	41
5.3	<i>Versuchsablauf</i>	41
5.3.1	Zellvorbereitung und Ernte.....	41
5.3.2	SDS Polyacrylamid Disk-Gelelektrophorese.....	41
5.3.3	Protein Transfer auf die PVDF Membran (blotten).....	42
5.3.4	Immunologische Detektion.....	42
5.3.5	Kontrolle des Proteintransfers und Ladungskontrolle.....	43
6	ARGININ-CITRULLIN UMWANDLUNGSEXPERIMENT ZUR BESTIMMUNG DER eNOS ENZYMAKTIVITÄT IN LEBENDEN ZELLEN.....	44
6.1	<i>Theorie</i>	44
6.2	<i>Lösungen</i>	45
6.2.1	Hepes-Puffer:.....	45
6.2.2	HBSS:.....	45
6.2.3	Laufmittelgemisch für Dünnschichtchromatographie:.....	45
6.3	<i>Versuchsablauf</i>	46
7	DAF-2 FLUORESCENZ MESSUNG ZUR BESTIMMUNG DER NO FREISETZUNG AUS ENDOTHELIALEN ZELLEN.....	47
7.1	<i>Theorie</i>	47
7.2	<i>Lösungen</i>	48
7.2.1	PBS mit Ca ²⁺ :.....	48
7.2.2	HBSS:.....	48
7.2.3	Arginin Stocklösung (100mM):.....	48
7.2.4	Argininhaltiger Puffer (100µM):.....	49
7.2.5	A23187 Stocklösung (10mM):.....	49
7.2.6	A23187 Lösung (2mM):.....	49
7.2.7	DAF-2-Lösung (20µM):.....	49
7.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	49
IV	ERGEBNISSE.....	50
1	EINFLUß VON SOJAIISOFLAVONEN IM VERGLEICH ZU 17-B-ESTRADIOL AUF DIE eNOS.....	50
1.1	<i>Einfluß von Sojaisoflavonen auf die eNOS Promotor Aktivität</i>	50
1.1.1	Sojaisoflavone steigern die eNOS Promotoraktivität.....	50
1.1.2	17-β-Estradiol hat keinen Einfluß auf die eNOS Promotoraktivität.....	51
1.2	<i>Einflüsse auf die eNOS mRNA-Konzentration</i>	52
1.2.1	Sojaisoflavone zeigen keinen signifikanten Einfluß auf die eNOS mRNA Konzentration.....	52
1.3	<i>Einflüsse auf die eNOS Enzymaktivität</i>	53
1.3.1	Sojaisoflavone haben einen unterschiedlichen Einfluß auf die eNOS Enzymaktivität.....	53
1.3.2	17-β-Estradiol hat keinen Einfluß auf die eNOS Enzymaktivität.....	54
1.4	<i>Einflüsse auf die eNOS vermittelte NO Produktion</i>	55
1.4.1	Genistein erhöht die eNOS vermittelte NO Produktion.....	55
1.4.2	17-β-Estradiol führt zu einer schwachen Steigerung der eNOS vermittelten NO-Produktion.....	58
1.5	<i>Einflüsse auf die eNOS Proteinmenge</i>	60
1.5.1	Sojaisoflavone haben keinen Einfluß auf die eNOS Proteinmenge.....	60
2	EINFLUß VON RWPE AUF DIE eNOS.....	61
2.1	<i>Einflüsse auf die eNOS Promotor Aktivität</i>	61
2.1.1	Einfluß von RWPE auf die eNOS Promotor Aktivität in Abhängigkeit von Anbaugbiet und Rebsorte.....	61

2.1.2	Faßmaterialien bei der Lagerung zeigen einen Einfluß auf die Aktivierung des eNOS Promotors durch RWPE	65
2.1.3	Die Aktivität von Rotweinpolyphenolextrakten kann durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln vermindert werden.....	66
2.1.4	Traubensaftpolyphenolextrakte haben weniger Einfluß auf die eNOS Promotor Aktivität als RWPE....	67
2.1.5	Blüten- und Fruchtpolyphenolextrakte haben überwiegend keinen Einfluß auf die eNOS Promotor Aktivität	68
2.1.6	Einfluß von Resveratrol, Resveratrolderivaten und polyphenolischen Reinsubstanzen auf die eNOS Promotor Aktivität.....	70
2.2	<i>Einflüsse auf die eNOS Enzym Aktivität</i>	70
2.2.1	RWPE steigern die eNOS Enzym Aktivität.....	71
2.2.2	Die aktivitätssteigernde Wirkung der RWPE auf das eNOS Enzym wird durch Ausschütteln mit Diethylether nicht verringert.	72
2.2.3	TSPE erhöhen die eNOS Enzym Aktivität in geringerem Umfang als RWPE	73
2.2.4	Einfluß von Resveratrol und anderen Reinsubstanzen auf die eNOS Enzym Aktivität	74
2.2.5	Zeitabhängigkeit der Enzymaktivierung.....	74
2.3	<i>Einflüsse auf die eNOS Proteinexpression</i>	75
2.3.1	RWPE und TSPE steigern die eNOS Enzymexpression.....	75
2.4	<i>Einflüsse auf die eNOS vermittelte NO Produktion</i>	76
2.4.1	Einfluß von RWPE auf die eNOS vermittelte NO Produktion	76
2.4.2	Einfluß von Resveratrol und anderen polyphenolischen Reinsubstanzen auf die eNOS vermittelte NO Produktion	76
V	NEUE METHODEN ZUR DETEKTION VON NO: ANWENDUNG DER CARS MIKROSKOPIE ZUR DETEKTION VON NO IN LEBENDEN ZELLEN	77
1	VORTEILE DER CARS MIKROSKOPIE LEBENDER ZELLEN	77
2	THEORETISCHER HINTERGRUND DER CARS MIKROSKOPIE	78
2.1	<i>Physikalischer Hintergrund</i>	78
2.1.1	Kurze Übersicht über die Prinzipien der Lichtstreuung.....	78
2.1.2	Theorie des CARS Prozesses.....	79
2.2	<i>Aufbau des CARS Experimentes</i>	81
3	EXPERIMENTE ZUR ANWENDUNG DER CARS MIKROSKOPIE ZUR DETEKTION VON NO	82
3.1	<i>Nachweis der Spektralen Selektivität: Darstellung von Zellen</i>	82
3.2	<i>Darstellung der räumlichen Auflösung: Mikroskopie eines Presslings aus Kaliumbromid mit Nitroprussid-Na Kristallen</i>	83
3.3	<i>Messung der zeitabhängigen NO Freisetzung aus Nitroprussid-Na in Lösung</i>	84
3.4	<i>Messung der zeitabhängigen NO Freisetzung aus NOC-9 in Lösung</i>	86
3.5	<i>Darstellung der NO Bildung in Zellen</i>	87
VI	DISKUSSION.....	89
1	EINFLUß VON SOJAISOFLAVONEN AUF DIE ENOS	89
2	WEIN UND WEININHALTSSTOFFE	92
2.1	<i>Polyphenolextrakte aus dem Wein verstärken eNOS Expression und Funktion in Abhängigkeit von Rebsorte und Anbauggebiet</i>	92
2.1.1	RWPE verstärken eNOS Expression und Aktivität in Abhängigkeit von Rebsorte und Anbauggebiet.....	92
2.1.2	WWPE verstärken die eNOS Promotor Aktivität vergleichbar den RWPE.....	93
2.2	<i>Der Vinifikationsprozeß, nicht aber die Lagerung in bestimmten Faßmaterialien verstärkt die RWPE vermittelten Effekte</i>	94
2.2.1	Traubensaftpolyphenole (TSPE) haben einen geringeren Einfluß auf die eNOS Expression	94
2.2.2	Weinlagerung in Eichenholzfässern vermindert den Effekt von RWPE auf den eNOS Promotor.....	94
2.3	<i>Fraktionierung der RWPE durch Ausschütteln mit Diethylether</i>	95
2.4	<i>Blüteninhaltsstoffe haben nur einen schwachen Effekt auf die eNOS Promotor Aktivität</i>	95
2.5	<i>Rotwein Reinsubstanzen</i>	96
2.5.1	Resveratrol erhöht in Konzentrationen über 10 µM die Expression der eNOS.....	96
2.5.2	Weitere Reinsubstanzen.....	96
2.6	<i>Probleme bei Versuchen mit RWPE</i>	97
2.6.1	Diskrepanzen zwischen eNOS Promotor Aktivität und eNOS Enzym Aktivität	97
2.6.2	Probleme bei der Bestimmung der NO Freisetzung aus RWPE stimulierten Zellen	97
3	DETEKTION VON NO IN LEBENDEN ZELLEN MITTELS CARS MIKROSKOPIE	99
VII	ZUSAMMENFASSUNG	101
VIII	ANHANG	103
1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	103
2	ALPHABETISCHES FIRMENVERZEICHNIS	105

IX	LITERATUR	106
1	ZITIERTER LITERATUR.....	106
2	EIGENE PUBLIKATIONEN	115
2.1	<i>Abstracts</i>	115
2.2	<i>Originalarbeiten</i>	115
X	DANKSAGUNG	116
XI	LEBENS LAUF.....	117

II Einleitung

1 Übersicht und Fragestellung

1980 veröffentlichten Furchgott und Mitarbeiter an der State University von New York eine für das Verständnis der Biologie der Blutdruckregulation sehr wichtige Arbeit. Sie hatten entdeckt, daß Aortenringe, aus denen das Endothel entfernt wurde, nicht mehr mit Dilatation auf einen Acetylcholinstimulus reagieren. Damals postulierten sie, daß Acetylcholin nicht direkt die Gefäße erweitert, sondern an Endothelzellen die Ausschüttung eines Botenstoffes bewirkt. Dieser löst seinerseits die Gefäßdilatation aus. Sie nannten diesen Botenstoff „Endothelium-derived Relaxing Factor“, EDRF¹.

1987 identifizierten Palmer et al². EDRF als Stickstoffmonoxid, NO. Mit der Identifizierung dieses kleinen hochreaktiven Moleküls als Botenstoff revolutionierten sie die bis dahin anerkannten Vorstellungen über die zelluläre Signalübertragung.

NO wird im Endothel durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet. Neben der Steuerung des Gefäßtonus übernimmt NO noch weitere wichtige Funktionen bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase³.

Steht für eine reibungslose Gefäßfunktion nicht mehr ausreichend NO zur Verfügung, spricht man von einer endothelialen Dysfunktion. Folgen einer endothelialen Dysfunktion sind Erkrankungen des Gefäßsystems, wie Atherosklerose, Thrombose, Angina Pectoris, Bluthochdruck und Gefäßerkrankungen bei Diabetespacienten³.

Die Erforschung von Substanzen, die die Produktion oder Bioverfügbarkeit von NO verbessern können, liefert für die Therapie dieser Erkrankungen wichtige Erkenntnisse.

Eine reichhaltige Quelle für solche Substanzen sind Drogenextrakte und isolierte Naturstoffe. Für eine Vielzahl von Naturprodukten wurden in epidemiologischen Studien und *in vivo* Untersuchungen protektive kardiovaskuläre Wirkungen beschrieben. Manche dieser Berichte deuten auf die Beteiligung einer verbesserten endothelialen NO Produktion am Gesamteffekt hin.

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob isolierte Isoflavone aus Soja die Expression des menschlichen eNOS Gens in einem Endothelzellmodell *in vitro* verstärken.

In vorangegangenen Arbeiten konnten wir zeigen, daß Rotweinpolyphenolextrakte (RWPE) die Expression des eNOS Gens verstärken. Der zweite Schwerpunkt der Arbeit sollte einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe des Rotweins liefern. In diesem Teil wollten wir daher überprüfen, welchen Einfluß Anbaugebiet, Rebsorte und Vinifikationsprozeß auf den Effekt der RWPE auf die eNOS Expression ausüben.

2 Stickstoffmonoxid als Signalmolekül

2.1 Physiologische Wirkungen von NO

NO erfüllt im menschlichen Körper vielfältige Aufgaben als Botenstoff. Die Zielmoleküle werden durch Nitrosierung freier –SH Gruppen oder durch Komplexbildung mit Cu, Fe oder Zn Atomen aktiviert oder deaktiviert. Die Nitrosierung von –SH Gruppen von Caspasen führt zu Beispiel zu deren Hemmung und zum Überleben der Zelle⁴. Wichtigstes Zielmolekül von NO ist die lösliche Guanylatcyclase (sGC). Über aktivierte sGC führt NO zu einem Anstieg des Second Messengers cGMP in den Zielzellen. cGMP aktiviert die Proteinkinase G (PKG)⁵. Diese wiederum phosphoryliert diverse Zielmoleküle und vermittelt dadurch verschiedenste Effekte (siehe auch **Abb. 1**).

Besonders wichtig im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist die Wirkung von NO bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase³.

- NO löst eine Erschlaffung der glatten Muskulatur in der Media von Blutgefäßen aus. Durch den verminderten Muskeltonus kommt es zur Erweiterung der Gefäße und zum Blutdruckabfall.
- NO antagonisiert die Gefäßkonstriktion durch das sympathische und das Renin-Angiotensin System.
- Die parasympathisch ausgelöste Gefäßdilataion wird durch NO vermittelt.
- NO verhindert die intravasale Koagulation der Blutplättchen und deren Adhäsion an die Gefäßwand. Somit wirkt es der Entstehung thrombotischer Verschlüsse entgegen. Zusätzlich verhindert es die Freisetzung von PDGF aus Thrombozyten.
- NO hemmt die Freisetzung von Cytokinen (z.B. MCP-1) und die Anlagerung von inflammatorischen Zellen an, sowie deren Migration in die Gefäßwand durch verminderte Expression endothelialer Adhäsionsproteine wie VCAM, ICAM und P-Selectin.
- NO hemmt die Proliferation glatter Muskelzellen.
- NO hemmt die Oxidation von LDL.

NO spielt in Bezug auf das Gefäßsystem außerdem noch eine wichtige Rolle bei Angiogenese⁶ und Wundheilung⁷.

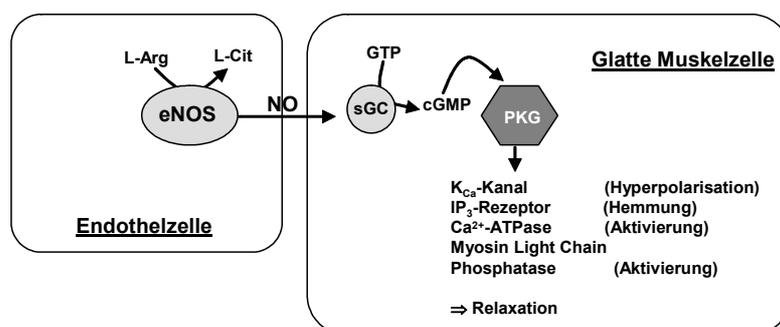


Abb. 1: Mechanismus der NO vermittelten Gefäßdilataion.

Die Bedeutung des Botenstoffes NO ist aber nicht auf das Gefäßsystem beschränkt. Im Nervensystem ist NO beteiligt an der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Nervenzellen⁸. In nitrengen Neuronen kommt es als synaptischer Überträgerstoff vor. Als Neurotransmitter der Non-Adrenergen / Non-Cholinergen (NANC) Neuronen vermittelt es die Erschlaffung glatter Muskelzellen in vielen Geweben, etwa im Magen-Darm System. Dort steuern diese Neurone zum Beispiel die Motilität des Darmes. Im Zentralnervensystem ist NO ebenfalls Neurotransmitter. Im Gehirn wirkt es bei der Ausbildung des Gedächtnisses mit⁹. Auch an der Steuerung der Sexualfunktionen sind nitrengere Neuronen beteiligt. So wird etwa die Aufrechterhaltung der Erektion durch NO mediiert¹⁰.

In höheren Konzentrationen erfüllt NO als „Waffe“ von Immunzellen eine wichtige Funktion bei der Infektabwehr. Nach dem Kontakt mit Bestandteilen der bakteriellen Zellwand, wie z. B. den Lipopolysacchariden (LPS), oder nach Stimulation durch Cytokine bilden Makrophagen und Granulozyten nach Expression einer induzierbaren Form der NO-Synthase (iNOS) große Mengen von NO. NO wirkt in hohen Konzentrationen toxisch auf Bakterien, Pilze und Protozoen und auf Tumorzellen. Wird NO am falschen Ort oder in zu hohen Konzentrationen freigesetzt, etwa bei Autoimmunerkrankungen, Schlaganfall oder Sepsis, hat NO auch auf den eigenen Organismus schädliche Auswirkungen. Es kommt zur Zerstörung körpereigenen Gewebes und chronischen Entzündungen. Bei einer Sepsis kann es unter Beteiligung von NO zum Zusammenbruch des Kreislaufs und der Mikrozirkulation kommen^{3,11}.

Auf genomischer Ebene beeinflusst NO die Expression verschiedener Gene durch die Aktivierung oder die Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren¹².

2.2 NO und Atherosklerose

Durch die oben aufgeführte Regulation der Gefäßfunktion und die Hemmung der Infiltration von Immunzellen in die Gefäßwand, sowie der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und der Proliferation der glatten Muskulatur wirkt NO einer Atheroskleroseentstehung entgegen. Es wurde beobachtet, daß schon einige Zeit vor der sichtbaren Manifestation atherosklerotischer Gefäßveränderungen eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO nachgewiesen werden kann³. Zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO kann es kommen durch

- verminderte eNOS Expression¹³,
- verminderte Verfügbarkeit des eNOS Substrates L-Arginin oder anderer Kofaktoren¹⁴,
- verminderte Aktivierung der eNOS durch veränderte zelluläre Signalübertragung¹⁵
- oder vermehrte Elimination von NO durch Reaktion mit Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS)¹⁶.

Der verminderten NO Bioverfügbarkeit, etwa bei der Koronaren Verschußkrankheit, versucht man durch die Verabreichung NO freisetzender Pharmaka wie Nitroglycerin, Isosorbitnitraten oder Nitroprussid-Na zu begegnen.

3 NO Quellen im Körper: die NOS Isoenzyme

3.1 Unterscheidungsmerkmale der NO-Synthasen

NO wird im Körper durch NO-Synthasen (NOS) gebildet. Zwischen 1991 und 1994 wurden aus verschiedenen Geweben drei Isoformen der NO Synthasen isoliert und kloniert¹⁷. Die Isoformen haben unterschiedliche Molekulargewichte und sind Produkte dreier unterschiedlicher Gene.

Man unterschied ursprünglich die neuronale NOS (nNOS oder auch NOS I) mit 160 kDa, die induzierbare NOS (iNOS oder NOS II) mit 130 kDa und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS III) mit 133 kDa Molekulargewicht.

Die Namensgebung erfolgte nach den Geweben, in denen sie gefunden wurden. Heute weiß man, daß diese Gewebespezifität strenggenommen nicht gilt. Alle Isoformen wurden in einer Vielzahl von Geweben gefunden¹⁸. Zum Beispiel wurde in Endothelzellen auch die Expression von nNOS beobachtet¹⁹. Lange Zeit wurden sie auch nach Expressionsmuster und Ca^{2+} -Abhängigkeit unterschieden. Als konstitutiv exprimiert und Ca^{2+} /Calmodulin abhängig galten nNOS und eNOS, als induzierbar und Ca^{2+} -unabhängig wurde die iNOS angesehen. Mittlerweile wurden mehrere Spleißvarianten von nNOS und iNOS entdeckt. Für alle drei Untertypen wurde eine Induktion durch bestimmte Stimuli gefunden. Für die iNOS ist neuerdings auch eine konstitutive Expression, z.B. in glatten Muskelzellen beschrieben worden²⁰.

Beim Menschen weisen alle drei Isoformen eine Sequenzhomologie von 51-57% auf. Die Proteine bestehen aus einer Oxygenase-Domäne und einer Reduktase-Domäne. Werden sie aktiviert, bilden alle Isoformen Dimere und katalysieren bei Anwesenheit verschiedener Kofaktoren die Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Die Aktivierung und katalytische Funktion der NO-Synthasen soll für die eNOS im folgenden Abschnitt näher besprochen werden. **Abb. 2** zeigt die Domänenorganisation der drei NOS Isoformen im Überblick.

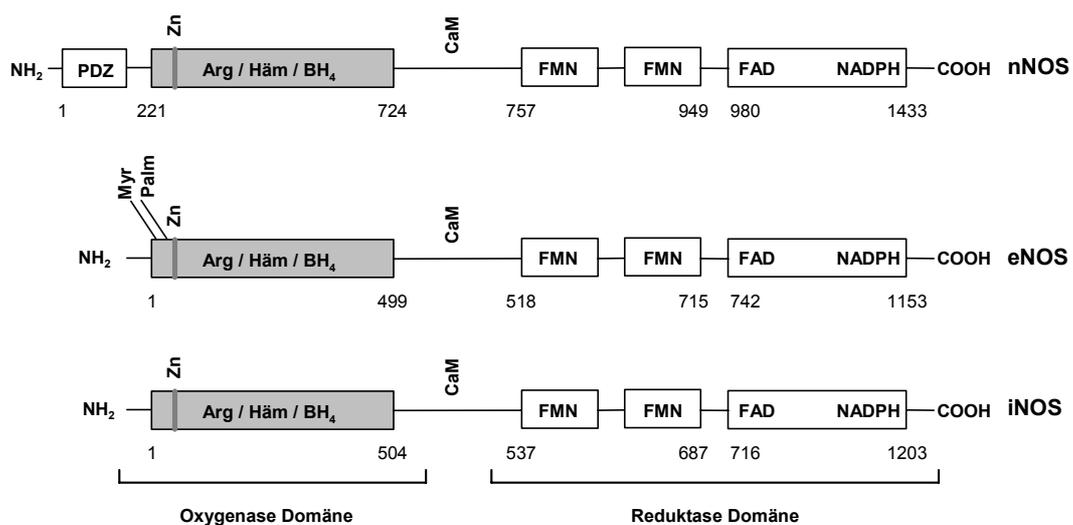


Abb. 2: Domänenorganisation der menschlichen NOS Enzyme im Vergleich.

Die kleinen Zahlen geben die Aminosäurenummer der Sequenz an, bei der die Domänen beginnen und enden. Die Bindungsstellen für Substrat und Kofaktoren sind angegeben (nach¹⁷):

Arg = Arginin CaM = Calmodulin BH₄ = Tetrahydrobiopterin FMN = Flavinmononucleotid FAD = Flavin-Adenin-Dinucleotid NADPH = Nikotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat Myr = Myristinsäurerest Palm = Palmitinsäurerest Zn = Zink Häm = Eisen Protoporphyrin IX

4 Die endotheliale NO-Synthase

4.1 Das eNOS Protein

4.1.1 Allgemeines

Der Genlocus für die eNOS liegt beim Menschen auf Chromosom 7 (7q35-7q36). Das Produkt des menschlichen eNOS Gens ist ein 133 kDa schweres Protein, das im wesentlichen in zwei Domänen unterteilt ist, eine Oxygenase-Domäne und die Reduktase-Domäne (siehe **Abb. 2**). Dazwischen liegt eine Bindungsstelle für Calmodulin. Die Reduktase-Domäne weist eine 36%ige Sequenzhomologie zur CytochromP₄₅₀-Reduktase auf¹⁷.

4.1.2 NO Bildung durch die eNOS

Die eNOS katalysiert in einer 5-Elektronen-Oxidationsreaktion die Oxidation des Guanidino-Stickstoffs von L-Arginin unter Verbrauch molekularen Sauerstoffs über die Zwischenstufe N-Hydroxyarginin zu NO. Nebenprodukt der Reaktion ist L-Citrullin (**Abb. 3**).

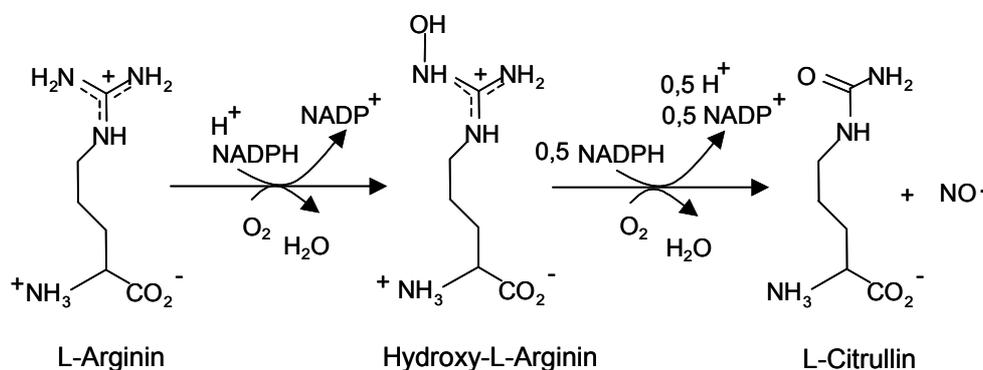


Abb. 3: eNOS katalysierte Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO (nach ²¹)

Die aktive eNOS bildet ein Homodimer aus zwei eNOS Untereinheiten. Ein Zinkatom stabilisiert den dimeren Zustand. Um NO synthetisieren zu können, müssen an die Reduktase-Domäne die Kofaktoren NADPH, FMN, FAD und Calmodulin gebunden sein. An die Oxygenase-Domäne binden Tetrahydrobiopterin und eine Häm-Gruppe, die das aktive Zentrum für die Oxidationsreaktion darstellt. Calmodulin ermöglicht die Dimerbildung und stabilisiert diesen Zustand. Zusätzlich kontrolliert Ca²⁺/Calmodulin den Elektronentransport von der Reduktase- zur Oxygenase-Domäne. NADPH liefert die Redoxäquivalente für die Reaktion. Pro Molekül NADPH werden zwei Elektronen zur Verfügung gestellt, die nacheinander einzeln über FAD und FMN auf die Häm-Gruppe der Oxygenase-Domäne des jeweils anderen Monomers übertragen werden. Vom Häm werden die Elektronen dann auf den

Guanidino-Stickstoff von L-Arginin übertragen, das an die Oxygenase-Domäne gebunden vorliegt (siehe **Abb. 4**)²¹.

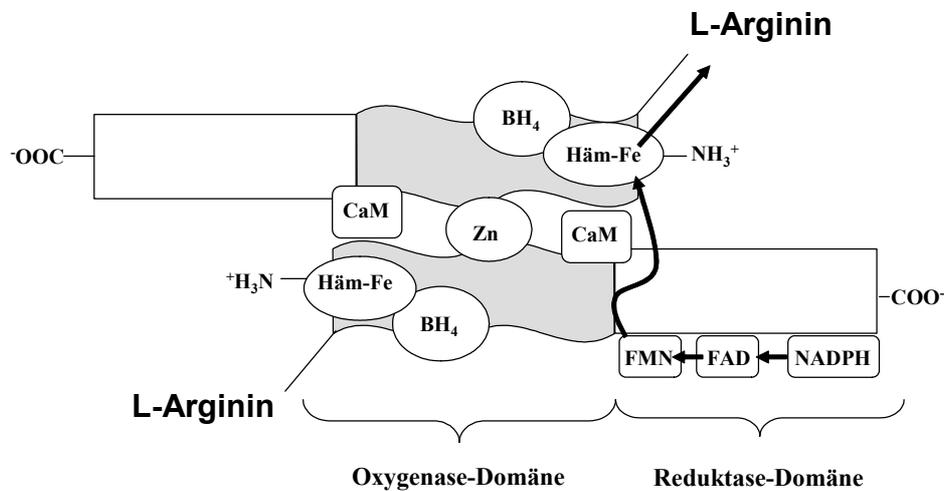


Abb. 4: Struktur des aktiven eNOS Homodimers.
Die dicken schwarzen Pfeile geben den Elektronenfluß von NADPH zu L-Arginin wieder.

Tetrahydrobiopterin (BH₄) spielt bei der Funktion der eNOS eine besondere Rolle. Zum einen ist es ein weiterer Redox-Kofaktor der eNOS katalysierten Reaktion. Daneben stabilisiert es den High-Spin Zustand des Häm Eisens und unterstützt die Bindung des Substrates L-Arginin. Bei Mangel an BH₄ oder zu geringer Verfügbarkeit des Substrates L-Arginin kann es zu einer Übertragung der Elektronen von NADPH über die Häm-Gruppe direkt auf molekularen Sauerstoff kommen. Bei diesem Vorgang, der als eNOS Entkopplung bekannt ist, entsteht dann das Superoxid-Radikal O₂^{•-}²². Solche Engpässe können bei Krankheiten auftreten. Bei Hypercholesterolämie wurde eine verminderte Verfügbarkeit von reduziertem BH₄ beobachtet. Die Superoxidproduktion durch entkoppelte eNOS bewirkt eine zusätzlich verminderte Bioverfügbarkeit von NO, das mit Superoxid sofort zu Peroxynitrit, ONOO⁻, abreagiert.

4.2 Regulation der eNOS Expression

Die eNOS galt zunächst als konstitutiv exprimiertes Enzym. Mittlerweile wurden jedoch unter bestimmten physiologischen Umständen und unter dem Einfluß verschiedener Substanzen Veränderungen in der eNOS Expression beschrieben.

Scherstreß durch den vermehrten Blutfluß unter körperlicher Anstrengung erhöht die Expression der eNOS.

In Bovinen Aorten Endothelzellen (BAECs) wurde ein 3- bis 6-facher Anstieg an eNOS mRNA und eNOS Protein in proliferierenden Zellen im Vergleich zu konfluenten beobachtet. Ein solcher Anstieg wurde auch in proliferierenden Zellen nach Endothelverletzungen und an Wundrändern gefunden.

Die Wachstumsfaktoren TGF-β1, bFGF, VEGF und PDGF verstärken die eNOS Expression. Auch für Hormone wie Estrogen, Insulin, Angiotensin II und Endothelin-1 wurde eine verstärkte, bei Langzeitbehandlung mit Thrombin dagegen eine verminderte eNOS Expression beobachtet. Neben

diesen bekanntesten beeinflussen viele weitere Cytokine und Botenstoffe die eNOS Expression. Interessanterweise führt auch eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zu einer Steigerung der eNOS Expression. Für NO wurde ein negativer Feedbackmechanismus mit verminderter eNOS Expression vorgeschlagen^{Review: 18}. Die Expression des eNOS Proteins wird durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor des eNOS Gens gesteuert.

Der eNOS Promotor enthält keine TATA Box. In der Promotorregion des eNOS Gens finden sich Bindungsstellen für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren. Die wichtigsten sind Sp1, GATA, AP-1, AP-2, NF-κB, p53 und andere¹⁸.

Die Stabilität der eNOS mRNA ist ebenfalls reguliert und beeinflusst somit die eNOS Expression. Eine Verminderung der eNOS mRNA Stabilität unter dem Einfluß von TNFα wurde gezeigt. Sie wird vermutlich durch die Reaktion eines cytosolischen 60 kDa Proteins mit der 3'-UTR der eNOS mRNA vermittelt²³. Ein weiteres cytosolisches Protein um die 51 kDa wurde identifiziert, das durch Bindung an die letzten 545 Nucleotide der 3'-UTR die Stabilität der eNOS mRNA ebenfalls vermindert.

Außer durch TNFα wird die Halbwertszeit der eNOS mRNA noch durch LPS und oxidiertes LDL vermindert. Im Zustand der Hypoxie nimmt die Stabilität der eNOS mRNA ebenfalls ab. Verlängerte Halbwertszeiten der eNOS mRNA bewirken VEGF, Estrogen, Wasserstoffperoxid und Zellproliferation¹⁸.

Die Halbwertszeit des eNOS Proteins beträgt ca. 20 h. Berichte über eine Regulation der eNOS Proteinmenge durch Veränderung der Halbwertszeit liegen bisher nicht vor²⁴.

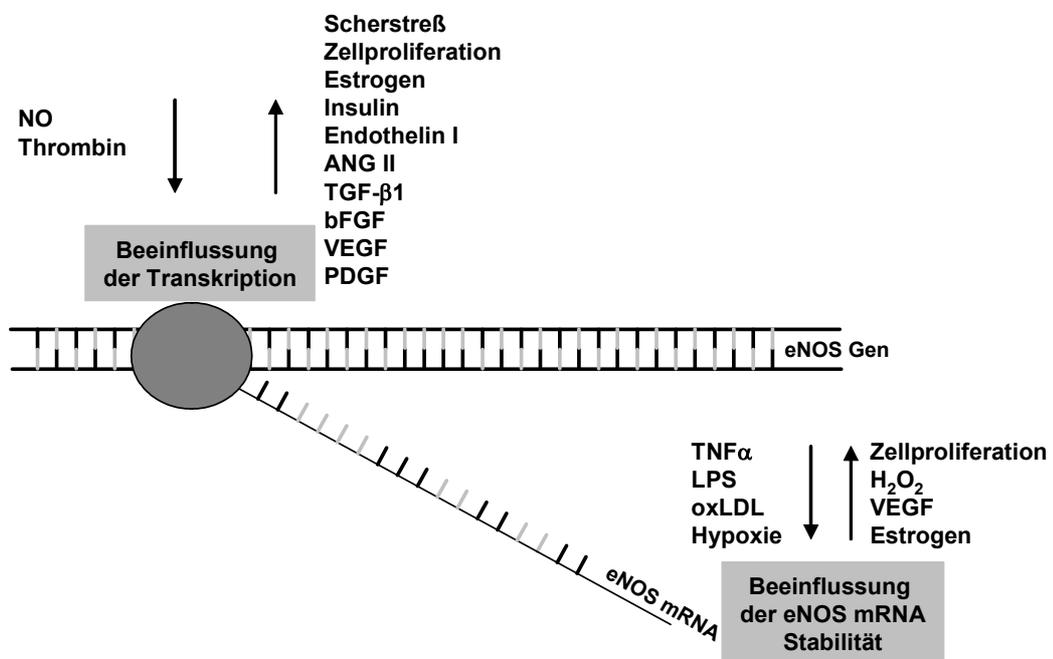


Abb. 5: Regulation der eNOS Expression.

Die Abb. zeigt eine Auswahl von Substanzen und physiologischen Zuständen, die die eNOS Transkription und die Halbwertszeit der eNOS mRNA beeinflussen im Überblick.

4.3 Regulation der intrazellulären Lokalisation der eNOS

Während der Translation wird das eNOS Protein an einem Glycinrest am N-Terminus (Gly²) mit einem Myristoylrest versehen. Diese Myristoylgruppe verankert das eNOS Protein in der Plasmamembran. Dadurch wird seine räumliche Nähe zu wichtigen Signalmolekülen, Calciumkanälen und Kofaktoren sichergestellt. Wahrscheinlich dient die Myristoylgruppe auch einem Targeting zum Golgi Apparat. Dort werden an zwei N-terminalen Cysteinresten (Cys¹⁵/Cys²⁶) der eNOS Palmitoylreste angehängt. Mutierte Proteine, die nicht mehr myristoyliert werden können, werden auch nicht mehr palmitoyliert. Nicht myristoylierte eNOS liegt vollständig cytosolisch vor, die Fähigkeit zur Katalyse ist *in vitro* nicht gestört aber es kommt nur zu einer geringen NO Produktion in der Zelle. Die Palmitoylierung der eNOS ist im Gegensatz zur Myristoylierung reversibel. Sie stabilisiert die Assoziation der eNOS mit der Plasmamembran. Ob dieser reversiblen Proteinmodifikation eine funktionelle Bedeutung bei der Aktivierung durch Agonisten zukommt, ist unklar.^{24, 25} Mutanten, die noch myristoyliert, aber nicht mehr palmitoyliert werden können, wandern nicht zur Plasmamembran, sondern akkumulieren im Golgi Apparat²⁵. Eventuell spielt eine Palmitoylierung auch eine Rolle beim Targeting der eNOS in die sogenannten „Caveolae“. Dabei handelt es sich um flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran, die das Protein Caveolin-1 in größerer Menge enthalten. Diese Membranbereiche sind angereichert mit Sphingolipiden, Glykosphingolipiden und Cholesterol. In den Caveolae befinden sich gehäuft Signalmoleküle sowie membranständige Rezeptoren²⁶. Viele Proteine, die in Caveolae gefunden werden, sind palmitoyliert. In den Caveolae liegt der größte Teil der membranständigen eNOS an Caveolin-1 gebunden vor. Diese Bindung an Caveolin-1 hält die eNOS im inaktiven Zustand. Einer Aktivierung durch Agonisten folgt eine Umverteilung der aktivierten eNOS von der Plasmamembran in die Cytoplasmafraktion. Wie diese Umverteilung bewerkstelligt wird, ist noch nicht geklärt. Später kehrt das eNOS Protein wieder an die Plasmamembran zurück oder wird zum Golgi Apparat transportiert.

Chronisch falsche Lokalisation der eNOS im Cytosol führt zu endothelialer Dysfunktion.

Die Lokalisation der eNOS in der Zelle hängt auch vom Proliferationsgrad ab. In proliferierenden Zellen wurden eNOS und Caveolin-1 kolokalisiert an den Zellmembranen der Wachstumsfront gefunden. In konfluenten endothelialen Zellen liegt der größte Anteil des eNOS Proteins im Golgi Apparat oder an den interzellulären Berührungsflächen in Nachbarschaft zu einem Adhäsionsmolekül, dem Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1) vor^{27, 28}.

Fulton und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Lokalisation in der Zelle auch einen Einfluß auf den Mechanismus der eNOS Aktivierung hat. Lag die eNOS an die Plasmamembran gebunden vor, war sie konstitutiv phosphoryliert, aktiv und sensitiv für Veränderungen der Ca²⁺ Konzentration durch transmembranären Einstrom. Am Golgi Apparat gebundene eNOS reagierte weniger stark auf Veränderungen der Ca²⁺ Konzentration, wurde jedoch nach Phosphorylierung durch Protein Kinase B (PKB/Akt) stark aktiviert. Dieses Verhalten könnte für das weitere Signaling wichtig sein. Am Golgi Apparat produziertes NO vermittelt vermutlich eher autokrine Funktionen, während membranständig gebildetes NO in Nachbarzellen diffundieren könnte, um dort parakrine Signale auszulösen²⁸.

Eine geordnete Regulation der intrazellulären Lokalisation der eNOS ist für ihre Aktivierung, eine geordnete Translokation für ihre Funktion von großer Wichtigkeit.

4.4 Regulation der eNOS Aktivität

4.4.1 Ca^{2+} regulierte Aktivierung

eNOS ist die NOS Isoform, deren Aktivität am meisten durch Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration beeinflusst wird.

Einströmendes Ca^{2+} bindet an Calmodulin. Der resultierende Ca^{2+} /Calmodulin Komplex bindet an die eNOS und verdrängt Caveolin-1 aus seiner Bindung. Der hemmende Einfluß der Caveolin-1 Bindung erlischt und das aktive eNOS Homodimer kann sich bilden. Durch die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin wird die Konformation einer autoinhibitorischen Schleife derart verändert, daß Elektronen von der Reduktase-Domäne zur Oxygenase-Domäne fließen können. Die eNOS wird aktiviert^{27, 29}. Calciummobilisierende Substanzen wie Bradykinin, Histamin, Estradiol, Acetylcholin und Calciumionophore vermitteln über diesen Mechanismus schnelle Effekte auf die eNOS vermittelte NO Produktion.

4.4.2 Protein-Protein Wechselwirkungen

In den letzten Jahren wurden immer neue Proteine aufgefunden, die mit der eNOS interagieren. Eines der wichtigsten eNOS bindenden Proteine ist Caveolin-1. Wie bereits unter 4.3 ausgeführt, ist Caveolin-1 ein Hauptbestandteil der Caveolae der Zellmembran. Bindung an Caveolin-1 hält die eNOS in den Caveolae. Bindung an Caveolin-1 antagonisiert außerdem die Bindung von Calmodulin und hemmt damit die eNOS Enzymaktivität²⁶.

Ein weiteres sehr wichtiges eNOS bindendes Protein ist das Chaperon Hsp90. Es ist maßgeblich an der Faltung der NOS Isoenzyme beteiligt. Auch mit dem fertig gefalteten eNOS Protein tritt Hsp90 in Kontakt. Stimuli, die die eNOS aktivieren, verstärken zugleich auch die Interaktionen zwischen eNOS und Hsp90. Hsp90 wird dabei phosphoryliert³⁰. Bei der Aktivierung durch Serin¹¹⁷⁷ Phosphorylierung bildet Hsp90 ein Gerüstprotein für eNOS und Akt^{26, 27}.

Dynamin-2 interagiert ebenfalls mit der eNOS. Beide Proteine assoziieren im Golgi Apparat. Die Assoziation mit Dynamin-2 verstärkt die eNOS abhängige NO Produktion und wird durch erhöhte Ca^{2+} Spiegel verstärkt. Dynamin ist ein Motorprotein, das normalerweise für die Sequestrierung von Rezeptoren verantwortlich ist. Seine genaue Funktion im Zusammenhang mit der eNOS ist noch unklar, es könnte bei Transportprozessen der eNOS zwischen verschiedenen Zellkompartimenten von Bedeutung sein²⁷.

Eine Assoziation der eNOS mit der intrazellulären Domäne 4 bestimmter G-Proteingekoppelter Rezeptoren (Kinin B₂ Rezeptor, Endothelin ET-B Rezeptoren) wurde ebenfalls diskutiert. Diese Assoziation wirkt sich hemmend auf die eNOS aus. Die Meinungen hierzu sind jedoch kontrovers²⁷.

Bei Untersuchungen mit einem Yeast Two-Hybrid System wurden zwei weitere Proteine gefunden, die mit der eNOS interagieren. Das erste wurde eNOS Interacting Protein (NOSIP) genannt³¹. Bei Koexpressionsstudien in nicht endothelialen Zellen wurde eine hemmende Wirkung für NOSIP auf die eNOS beobachtet. Eine Beteiligung am Transport der eNOS von der Plasmamembran zu intrazellulären Kompartimenten wird diskutiert.

Der zweite neu entdeckte Bindungspartner der eNOS war der eNOS Traffic Inducer (NOSTRIN)^{26, 32}. NOSTRIN wird in Gefäßendothelzellen und in stark vaskularisierten Geweben exprimiert. NOSTRIN Überexpression führte zu einer Umverteilung der eNOS in vesikelähnliche Strukturen und hemmte gleichzeitig die NO Freisetzung.

Das C-terminal-Hsp70-Interacting Protein (CHIP) interagiert nicht nur mit Hsp70, sondern bindet auch an Hsp90. Die eNOS Funktion wird in einem Komplex aus Hsp90, eNOS und CHIP negativ reguliert. Dieser Komplex wird zum Golgi Apparat transportiert, wo eNOS anschließend in unlöslicher Form vorliegt³³.

4.4.3 Phosphorylierung

Die eNOS selbst wird an verschiedenen Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert. Am meisten ist bisher über die Konsequenzen einer Phosphorylierung an Serin¹¹⁷⁷ und am Threonin⁴⁹⁵ bekannt.

Serin¹¹⁷⁷ ist unter normalen Bedingungen unphosphoryliert, wird jedoch nach der Applikation bestimmter Reize (Scherstreß, VEGF, Insulin und andere) schnell durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert. Kinasen, die eNOS an Serin¹¹⁷⁷ phosphorylieren können, sind Akt, PKA, AMP-activated Protein kinase (AMPK) und CaMK II³⁴. Durch Phosphorylierung an Serin¹¹⁷⁷ steigt die NO Produktion um das 2- bis 3-fache an. Steigernde Wirkung auf die eNOS Aktivität wurde auch für Substanzen beobachtet, die zu einer verstärkten PI3-Kinase Aktivität führen. PI3-K phosphoryliert die Akt, die wiederum eNOS an Serin¹¹⁷⁷ phosphoryliert und damit aktiviert.

Threonin⁴⁹⁵ ist konstitutiv phosphoryliert und bewirkt eine verminderte NO Produktion, was durch eine Interaktion mit der Ca²⁺/Calmodulin Bindung erklärt wird. Threonin⁴⁹⁵ wird wahrscheinlich durch die PKC phosphoryliert und durch Protein Phosphatase-1 (PP1) dephosphoryliert. PKC phosphoryliert daneben auch die Protein Phosphatase 2A (PP2A). Diese wird damit aktiv und dephosphoryliert eNOS an Serin¹¹⁷⁷. PKC sorgt so für eine sichere Inaktivierung der eNOS. Meist erfolgt eine Dephosphorylierung von Threonin⁴⁹⁵ als Antwort auf Stimuli, die auch einen vermehrten Ca²⁺ Einstrom auslösen, z.B. Bradykinin oder Histamin. Beide Effekte zusammen, erhöhter Ca²⁺ Einstrom und Threonin⁴⁹⁵ Dephosphorylierung, steigern die NO Produktion durch die eNOS 10- bis 20-fach²⁷.

Einzelne Berichte liegen vor, daß neben Serin¹¹⁷⁷ noch Serin⁶³³ und Serin¹¹⁴ phosphoryliert werden können. Die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen ist jedoch noch nicht völlig aufgeklärt.

Daneben wurde beobachtet, daß die eNOS Aktivität durch Tyrosinkinase oder Tyrosinphosphatasen beeinflusst werden kann. Auch die Bedeutung dieser Tyrosinphosphorylierung ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Eine Regulation der Bindung verschiedener Gerüstproteine wird jedoch diskutiert²⁶.

4.4.4 Zusammenfassung der eNOS aktivierenden Mechanismen

Die eNOS kann durch Ca^{2+} Einstrom, Phosphorylierung hauptsächlich an Serin¹¹⁷⁷ bzw. Dephosphorylierung an Threonin⁴⁹⁵ aktiviert werden. Die **Abb. 6** zeigt das Zusammenspiel der einzelnen Proteine noch einmal in der Übersicht.

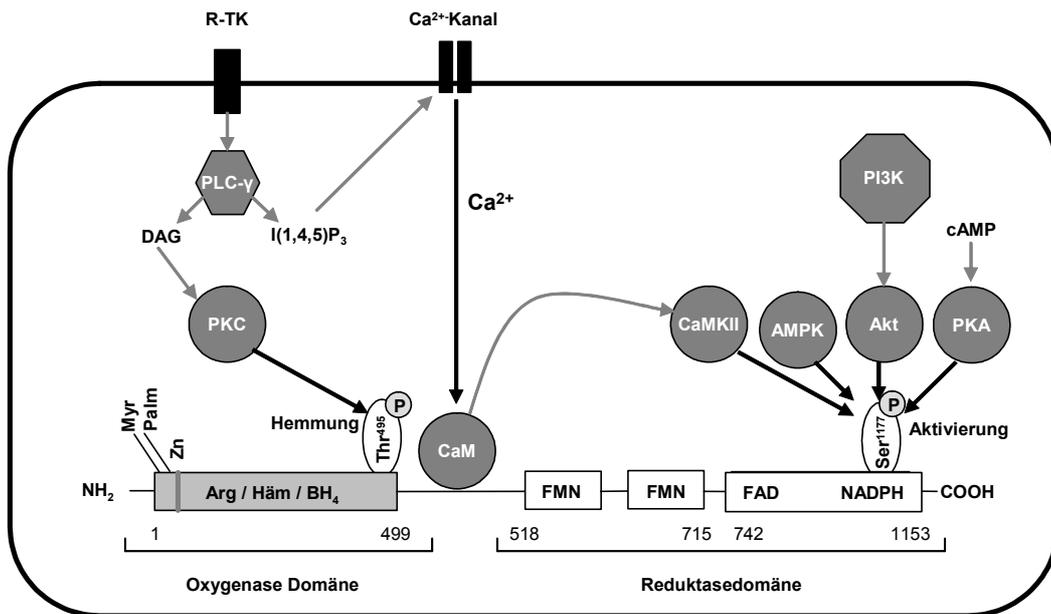


Abb. 6: Die Aktivierung der eNOS im Überblick.

Durch Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ wird die eNOS aktiviert. Phosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ führt zur Inaktivierung. Die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) führt ebenfalls zu einer Aktivierung des eNOS Enzyms. (In Anlehnung an ³⁴).

R-TK = Rezeptortyrosinkinase PLC = Phospholipase C DAG = Diacylglycerin I(1,4,5)P₃ = Inositol-1,4,5-trisphosphat PKC = Proteinkinase C CaM = Calmodulin CaMKII = Calmodulinabhängige Kinase II AMPK = AMP = AMP aktivierte Protein Kinase PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase Akt = Proteinkinase B cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat PKA = Proteinkinase A

5 Soja und die eNOS

Bereits 1941 wurde beobachtet, daß der Austausch einer Diät tierischer Proteine gegen Sojaproteine sowohl eine Hyperlipoproteinämie als auch die Atheroskleroseentstehung bei Hasen reduzierend beeinflussen kann³⁵. Seither haben sich immer wieder Studien mit diesem Thema befaßt. Während manche den Schwerpunkt auf die Untersuchung von Veränderungen der Plasma-Lipid Konzentrationen legen³⁶⁻³⁸, befaßten sich andere eingehend mit lipidunabhängigen Effekten. Neben allgemeinen antioxidativen Eigenschaften von Sojaisoflavonen^{39, 40} wurden auch Einflüsse auf Gefäßdilatation und Gefäßverhärtung beschrieben^{36, 41-44}. Einige letztens publizierte *in vivo* Studien deuten darauf hin, daß der Konsum von Sojaisoflavonen eine beeinträchtigte Funktion des endothelialen NO Systems wieder herstellen und damit der Entstehung und Progression atherosklerotischer Veränderungen entgegenwirken kann^{41, 45-47}. NO ist ein wichtiger Botenstoff im Zusammenhang mit der Bildung atherosklerotischer Gefäßverengungen. Eine verminderte Bildung von NO ist bereits vor der Manifestation klinischer Veränderungen der Gefäßarchitektur zu beobachten³. Die Ergebnisse der oben genannten *in vivo* Studien und die dabei gemachten Beobachtungen unterstützen die Hypothese, daß Sojaisoflavone in der Lage sind, die Bildung sowie die Verfügbarkeit endothelialen NOs zu verbessern. Da alle bisher gewonnenen Erkenntnisse aus *in vivo* Studien oder aus Experimenten mit tierischen Aortenringen stammen, fehlt bisher ein Beleg dafür, daß nach der Behandlung mit Sojaisoflavonen tatsächlich mehr endotheliales NO gebildet und freigesetzt wird. Wir haben deshalb *in vitro* Experimente an Zellkulturen durchgeführt, die diese Wissenslücke schließen sollen. Da für Sojaisoflavone eine estrogenartige Wirkung beschrieben ist⁴⁸ und darüber hinaus beobachtet wurde, daß Estrogen die Expression der eNOS erhöhen kann⁴⁹⁻⁵⁰, wurden die Wirkung der Isoflavone mit der Wirkung von 17- β -Estradiol verglichen.

6 Rotwein und die eNOS

Neben Soja wurden noch einige weitere Lebensmittel identifiziert, deren Verzehr sich nutzbringend auf kardiovaskuläre Erkrankungen auswirken kann⁵²⁻⁵⁶. Dabei stehen nicht immer nur die antioxidativen Eigenschaften der polyphenolischen Inhaltsstoffe im Vordergrund. Neben diesen wurden konkrete Wirkungen auf die Gefäßfunktion beschrieben. Der erste Verdacht zur kardiovaskulären Wirkung von Rotwein wurde bereits 1819 geäußert. Damals stellte Samuel Blac⁵⁷ eine erstaunlich niedrige Rate kardiovaskulärer Erkrankungen bei der Autopsie von Leichen fest, die aus Mittelmeerländern stammten. Diese niedrige Rate stand im krassen Gegensatz zu der, die er bei der irischen Bevölkerung fand. Diese Beobachtungen wurden immer wieder mit der mediterranen Diät in Verbindung gebracht, im Speziellen mit einem hohen Konsum an Rotwein^{58, 59}. Der Widerspruch zwischen fettreicher Ernährung und deutlich verminderter Sterblichkeit an koronaren Herzleiden in Frankreich ist unter dem Namen „French Paradox“ in den wissenschaftlichen Sprachgebrauch eingegangen. Da Koronare Herzerkrankungen mit ihren Spätfolgen Herzinfarkt und Schlaganfall durch Bluthochdruck die Todesursache Nr. 1 in den westlichen Industrieländern sind, scheint es wünschenswert, die Gründe für die Ausnahmen in der französischen Bevölkerung aufzudecken. Seit der Entdeckung des „French Paradox“ wurden deshalb immer wieder *in vivo* und *in vitro* Versuche unternommen, die eine positive Wirkung von Rotwein auf das Herz-Kreislaufsystem aufzeigen sollten^{57, 60-66}. Polyphenolische Verbindungen aus Weintrauben sowie aus fertigem Rotwein standen neben Alkohol^{67, 68} im Mittelpunkt des Interesses. Einige Studien deuten auf die Beteiligung einer verbesserten NO Produktion durch das Gefäßendothel hin^{61, 63-66}. In unserem Labor konnte letztens in einem Zellmodell gezeigt werden, daß Rotweinpolyphenolextrakte (RWPE) die Expression und Funktion der eNOS erhöhen können⁶⁹. Die Gruppe um Förstermann in Mainz beobachtete vergleichbare Effekte⁷⁰. In Weiterführung dieser Arbeiten war für uns von Interesse, in welchem Umfang eine Erhöhung der Expression der eNOS durch RWPE von Rebsorte und Anbaugebiet beeinflusst wird. Durch den Vergleich der Inhaltsstoffmuster dabei aufgefundener sehr aktiver Weine mit dem weniger aktiver Weine könnten eventuell in weiteren Arbeiten daraus Rückschlüsse auf die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen in der Rotweinpolyphenolfraction gezogen werden. Die Untersuchung des Einflusses des Vinifikationsprozesses sollte Aufschluß darüber geben, ob eventuell wirksame Inhaltsstoffe erst bei der Gärung durch biochemische Vorgänge, vielleicht auch durch den Stoffwechsel der Hefe, gebildet werden. Die Ergebnisse mit RWPE wurden mit der Wirkung von Resveratrol und weiteren Reinsubstanzen der Polyphenolfraction von Rotwein verglichen. Für Resveratrol konnte in der Vergangenheit ebenfalls ein Einfluß auf die endotheliale NO Produktion nachgewiesen werden⁷¹. Auch einige Extrakte aus Blüten und Fruchtsäften wurden zum Vergleich mit RWPE herangezogen. Bestimmte Blüten und Früchte enthalten vergleichbare Polyphenole wie Rotwein. Der Vorteil ist, daß bei ihnen immer eine Hauptkomponente überwiegt und die Zusammensetzung nicht so kompliziert ist, wie im Rotwein. Die Blütenfarbstoffe bilden aber ebenfalls supermolekulare Komplexe mit einem hohen Molekulargewicht, wie sie im Rotwein gefunden wurden.

III Material und Methoden

1 Zellkultur

1.1 Zelllinien

1.1.1 EA.hy926:

Die menschliche Endothelzelllinie EA.hy926 wurde uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. C. J-S. Edgell (Universität North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde 1983 durch die Verschmelzung von menschlichen Endothelzellen aus Nabelschnur-Venen, Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), mit der menschlichen Lungenkrebs-Zelllinie A549 gewonnen und als Endothelzelllinie charakterisiert^{72, 73}. EA.hy926 Zellen exprimieren Estrogen Rezeptoren^{73, 49-50}.

1.1.2 EA.hy926-heNOS-Luc:

EA.hy926 Zellen sind schwierig zu transfizieren. Für Luziferase-Reporter-gen Untersuchungen des menschlichen eNOS Promotors wurden daher stabil mit dem Plasmid pNOSIII-Hu-3500-Luc-neo⁷⁵ transfizierte EA.hy926 Zellen verwendet, (im weiteren Verlauf kurz als EA.hy926-heNOS-Luc bezeichnet). Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. P. Wohlfahrt (Aventis, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pNOSIII-Hu-3500-Luc-neo⁷⁵ enthält ein 3500 Basenpaare langes Teilstück des menschlichen eNOS Promotors vor einem Luziferase Gen, so daß dieses unter der Kontrolle des menschlichen eNOS Promotors steht. Daneben enthält das Plasmid ein Resistenzgen gegen G418. Zur Selektion der stabil transfizierten Zellen wurde dem Zellkulturmedium das Antibiotikum G418 (400µg/ml) zugesetzt.

1.1.3 RAW 264.7

Die murine Monozyten-Makrophagenzelllinie RAW 264.7 stammt aus der American Type Culture Collection (ATCC, TIB 71).

1.2 Primärzellen

1.2.1 HUVEC:

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) werden an unserem Lehrstuhl standardmäßig in Anlehnung an die von Sohn¹¹⁹ beschriebene Methode isoliert (siehe 1.5.2).

1.3 Nährmedien und Zusätze

1.3.1 Nährmedien

Für die Zellkultur wurden folgende carbonatgepufferte Fertigmedien verwendet:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) ohne Phenolrot und ohne Glutamin (Bio Whittaker, Europa) für EA.hy926 Zellen.
- M199 (Pan Biotech GmbH, Deutschland) und
- ECGM (Endothelial Cell Growth Medium, Promo Cell[®], Europa) für HUVECs.

1.3.2 Besonderheiten und Zusätze:

- 1) DMEM mußte für Versuche mit der humanen eNOS frei von Phenolrot sein, da Phenolrot estrogenartige Wirkung besitzt. Für Estrogene ist ein Einfluß auf die Expression der eNOS beschrieben⁴⁹.

Es erhielt die Zusätze:

- a) L-Glutamin(2 mM),
 - b) die Antibiotika: Benzylpenizillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 U/ml),
 - c) HAT Supplement, eine Mischung aus Hypoxanthin (100 µM), Aminopterin (0,4 µM) und Thymidin (16 µM) (Sigma, Deutschland). HAT dient der Selektionierung von Hybridoma Zellen. Dehybridisierte Zellen werden eliminiert.
 - d) G418 (400 µg/ml): Permanenter Zusatz für die Selektionierung der EA.hy926-heNOS-Luc Zellen.
 - e) Fötale Kälber Serum (FKS): Benötigte Wachstumsfaktoren und Hormone wurden dem Medium direkt vor Gebrauch in Form von 10% FKS (Gibco/BRL, Life Technologies, Deutschland) zugesetzt. Das Kälberserum wurde hitzeinaktiviert und zur Entfernung von Estrogenen 18 h mit 2 g Aktivkohle pro 100 ml Serum bei 4°C gerührt. Das Kohlepulver wurde durch zweimalige Zentrifugation (5 min bei 4000 U/min und anschließend 1 h bei 1000 U/min) wieder entfernt, das Serum sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße), zu je 50 ml aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.
- 2) M199 wurde nur mit 10% hitzeinaktiviertem FKS, welches nicht mit Aktivkohle behandelt war, versetzt.
 - 3) ECGM diente als Standardmedium für die Kultur der HUVEC Zellen und enthielt als Zusatz
 - a) den Supplement Mix C-39215 (Promocell, Deutschland)
 - b) die Antibiotika Benzylpenizillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 U/ml).
 - 4) Einfriermedium:

Zum Einfrieren von EA.hy926 Zellen wurde dem normalen Kulturmedium weitere 10% FKS und 10% DMSO zugesetzt.

1.4 Lösungen und Puffer

1.4.1 Sterilität:

Alle in der Zellkultur benötigten Lösungen wurden sterilisiert. Dies geschah durch Sterilfiltration (0,2 µm Spritzenaufsatzfilter, Peske oder Steritop TM 0,2 µm Flaschenaufsatzfilter, Millipore) oder durch Autoklavieren (gespannter Wasserdampf, 2 bar, 121°C, 15 min).

1.4.2 PBS:

Phosphat gepufferte Salzlösung

Na ₂ HPO ₄	8,0 mM	1,48 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,43 g
NaCl	160 mM	7,20 g
H ₂ O		ad 1000 ml

pH 7,4

sterilisiert durch autoklavieren

1.4.3 PBS⁺:

Phosphat gepufferte Salzlösung mit Ca²⁺ und Mg²⁺

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,1 mM	1,15 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,2 g
NaCl	137 mM	8,0 g
KCl	2,6 mM	0,2 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,5 mM	0,1 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,9 mM	0,1 g
H ₂ O		ad 1000 ml

pH 7,4

sterilisiert durch Sterilfiltration

1.4.4 T/E:

Trypsin/EDTA Lösung

Trypsin	0,05%	0,5 g
EDTA	0,02%	0,02 g
H ₂ O		ad 1000 ml

sterilisiert durch Sterilfiltration

1.5 Zellkultur

1.5.1 EA.hy926:

Auftauen:

Die Zellen wurden durch vorsichtiges Einpipettieren von 37°C warmem Kulturmedium in das Kryoröhrchen aufgetaut, sofort in einen Überschuß (20 ml) Kulturmedium überführt und in eine 75 cm² Zellkulturflasche (TPP AG, Deutschland) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

Kultur:

Die Zellen wurden in 75 bzw. 150 cm² Zellkulturflaschen (TPP AG, Deutschland) mit 20 bzw. 40 ml DMEM bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Passagieren:

Die Zellen wurden einmal in der Woche nach Erreichen der Konfluenz passagiert. Die Zellen wurden dazu mit PBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit 5 ml T/E Lösung / 75cm² Kulturfläche bei 37°C für ca. 5 min abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ca. 20 ml DMEM aufgenommen. Ein Teil der Suspension (1:10 bis 1:15) wurde in neue Kulturflaschen ausgebracht und mit entsprechend Medium aufgefüllt. Am Tag nach dem Umsetzen wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden bis maximal Passage 30 (#30) verwendet, da sich mit der Anzahl der Passagen die Gefahr der Mutation erhöht und die Einheitlichkeit der verwendeten Zellen nicht mehr ausreichend sichergestellt werden kann (siehe auch ²⁴).

Einfrieren:

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in einem Überschuß an DMEM aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer Konzentration von ca. 5×10^6 / ml in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf Eis in ein Kryoröhrchen gefüllt, die Röhrchen einen Tag bei -20°C, einen Tag bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Mycoplasmen:

Die Zellen wurden nach dem Auftauen und bei Auffälligkeiten während der Kultur auf Mycoplasmen getestet.

Verwendet wurde dazu der *VenorGeM*[®] *Mycoplasma Detection Kit* der Firma Minerva Biolabs GmbH, Deutschland. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

1.5.2 HUVEC:

Isolierung und Kultur:

Nabelschnüre wurden uns freundlicherweise von der Frauenklinik Bogenhausen zur Verfügung gestellt. Die Nabelschnüre wurden sofort nach der Entbindung in PBS⁺ eingelegt, kühl aufbewahrt und innerhalb einer Woche präpariert.

Die Nabelschnurvene wurde mit 50 ml PBS⁺ gespült und anschließend mit einer Lösung von Collagenase A (0,1 g/l, Roche) in PBS⁺ gefüllt. Die so vorbereiteten Nabelschnüre wurden für 40 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die abgelösten Endothelzellen mit 50 ml M199 aus der Vene gespült. Das Eluat wurde bei 20°C und 220 x g für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend in 5 ml ECGM (Promocell) aufgenommen und in eine 25 cm² Zellkulturflasche (TPP AG) ausgesät. Bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen in 75 cm² Kulturflaschen umgesetzt und weiterkultiviert. Dazu wurden die Zellen mit PBS vorsichtig gewaschen, mit 1 ml (25 cm²) oder 3 ml (75 cm²) Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und die abgelösten Zellen in M199 aufgenommen. Die Suspension wurde bei 20°C und 220 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in ECGM aufgenommen und ausgesät. Die Zellen wurden ein weiteres Mal 1:3 passagiert und bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Für Experimente wurden diese Zellen (#3) in 6- oder 12-Well Zellkulturplatten (TPP AG) ausgesät.

1.5.3 RAW 264.7:

Kultur:

RAW 264.7 Makrophagen wurden in 20 ml DMEM, jedoch ohne Antibiotikazusatz, in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

Passagieren:

Bei Erreichen der Konfluenz wurde das alte Medium abgegossen und 10 ml frisches Medium in die Zellkulturflaschen gefüllt. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in neue Flaschen ausgesät.

Zu Versuchen wurden die Zellen in Petrischalen auf Deckgläser ausgesät.

Einfrieren:

Die Zellen wurden wie zum Passagieren abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer Konzentration von ca. 3×10^6 / ml in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf Eis in ein Kryoröhrchen gefüllt, die Röhrchen einen Tag bei -20°C, einen Tag bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

1.5.4 *Zellzahlbestimmung*

Die Zellkonzentration in Zellsuspensionen wurde mittels Auszählen in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt.

2 Rotweineextrakte und Naturstoffe

2.1 Herstellung der Rotwein- und Traubenextrakte

Die in dieser Arbeit untersuchten Rotweinpolyphenolextrakte wurden von Herrn Dr. R. Samtleben an unserem Lehrstuhl präpariert. Die Extraktionsmethode entsprach weitgehend der von Caderni et al. angegebenen⁷⁴. Die Weine wurden ohne Entfernung des Ethanol auf eine DIAION-Säule (Polystyrol) aufgetragen und mit 10% (v/v) Ethanol nachgewaschen. Die Polyphenolfraktion wurde anschließend mit 90% (v/v) Ethanol eluiert, eingeengt und lyophilisiert.

Die Ausbeute betrug bei Rotweinen zwischen 350 und 1000 mg aus 325 ml Wein, bei Weißweinen zwischen 80 und 110 mg aus 325 ml Wein.

Zur Gewinnung der Polyphenole aus Weintrauben wurden die frischen Früchte zunächst 2 h mit 500 ml eines Ethanol/Wasser Gemisches (10% V/V) pro 100 g Früchte bei 80°C extrahiert. Der Alkoholgehalt des Auszugsmittels entspricht in etwa dem von Rotwein und wurde gewählt, um ähnliche Extraktionsbedingungen zu schaffen, wie sie bei der Weinherstellung vorliegen. Die so gewonnenen Rohextrakte wurden anschließend wie die Weine weiterbehandelt.

Bei ausgewählten Rotweinen wurde der Polyphenolextrakt vor dem Lyophilisieren weiterfraktioniert, indem mit Diethylether oder Ethylacetat ausgeschüttelt wurde.

2.2 Untersuchte Weine

Alle untersuchten Weine sollten möglichst nur aus einer Rebsorte gekeltert sein.

Da es sich bei dem sogenannten „French Paradox“ eher um ein Phänomen der breiten Masse, als um eine Erscheinung der Oberschicht handelt, konzentrierten sich unsere Untersuchungen auf Weine der unteren bis mittleren Preiskategorie. Die untersuchten Weine stammten überwiegend aus normalen Lebensmittelgeschäften und Supermärkten. Spezielle Weine und frische Weintrauben wurden direkt vom Erzeuger bezogen.

Im Lauf der Arbeit wurden etwa 180 verschiedene Weine getestet. Die folgenden Tabellen zeigen einen repräsentativen Ausschnitt der untersuchten Weine im Überblick. Die Daten, die mit den aufgelisteten Weinen erhoben wurden, haben Eingang in diese Arbeit gefunden.

Tabelle 1: Merlot Weine:

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft
1	Palet d'Or	Merlot	2002	Frankreich
2	Rothschild Merlot	Merlot	2002	Frankreich
3	Domaine de l'Arjolle	Merlot	2001	Frankreich
4	Chateau Julia	Merlot	2001	Griechenland
5	UNDURRAGA	Merlot	2001	Chile
6	Gato Negro	Merlot	2002	Chile
7	WMF Untertürkheim	Merlot	2001	Deutschland
8	Beringer	Merlot	2000	USA
9	Trentino Merlot	Merlot	2001	Italien
10	Merlot del Veneto	Merlot	2002	Italien
11	Golden Kaan	Merlot	2002	Südafrika
50	Jean Demont	Merlot	2002	Frankreich
51	Collection de Chantré	Merlot	2001	Frankreich
52	Nico Lazaridi	Merlot	2001	Griechenland
53	Valle Central	Merlot	2002	Chile
54	Santa Carolina	Merlot	2002	Chile
55	Rappenhof	Merlot	2001	Deutschland
56	E. J. Gallo	Merlot	2000	USA
57	Medanos	Merlot	2000	Uruquay
58	Merlot del Veneto, Landozzi	Merlot	?	Italien
59	Riunite	Merlot	2002	Italien
60	Stierglut	Merlot	2001	Rumänien
61	Meinert	Merlot	2001	Südafrika
62	KWV	Merlot	2001	Südafrika

Tabelle 2: Cabernet Sauvignon Weine:

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft
12	Domaine de l'Arjolle	C. Sauvignon	2001	Frankreich
13	Collection de Chantré	C. Sauvignon	2001	Frankreich
14	Cavino C.S.	C. Sauvignon	1999	Griechenland
15	UNDURRAGA	C.Sauvignon	2001	Chile
16	Valle Central	C. Sauvignon/Tinto	2002	Chile
17	Lergenmüller Select	C. Sauvignon	2001	Deutschland
18	John Carson, California	C. Sauvignon	2001	USA
19	Trentino Cabernet	C. Sauvignon	2000	Italien
20	Zonnebloem	C. Sauvignon	2000	Südafrika
63	Rothschild C. S.	C. Sauvignon	2001	Frankreich
64	Fortant de France	C. Sauvignon	2002	Frankreich
65	Tala Manca	C. Sauvignon	2002	Chile
66	CALAMA	C. Sauvignon	2001	Chile
67	Rappenhof	C. Sauvignon	2001	Deutschland
68	Burlwood	C. Sauvignon	2001	USA
69	E. J. Gallo Turning Leaf	C. Sauvignon	2001	USA
70	Medanos	C. Sauvignon	1999	Uruquay

Tabelle 3: Syrah Weine:

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft
21	Blanchet Syrah	Syrah	?	Frankreich
22	Mommessin Baton de Réglisse	Syrah	2002	Frankreich
23	Thrakis	Syrah	1999	Griechenland
24	Concha y Torro	Syrah	2001	Chile
25	Knipser Syrah	Syrah	2001	Deutschland
26	Gallo Shiraz	Syrah	2001	USA
27	Mandarossa Syrah	Syrah	2002	Italien
28	KWV	Syrah	2001	Südafrika
29	Kangaroo Ridge	Syrah	2001	Australien
49	Domaine de l'Arjolle Paradoxe	Syrah/Grenache	2000	Frankreich
71	Dallmayr Selection Moulin de Gassac	Syrah	2000	Frankreich
72	J. P. Chenet	Syrah	2001	Frankreich
73	Tsantali	Syrah	2000	Griechenland
74	Laranos Cosecha	Syrah	2002	Argentinien
75	Quay Landing	Syrah	2002	Australien
76	Broom Estate	Syrah	2001	Australien
77	Durbanville Hills	Syrah	2000	Südafrika

Tabelle 4: weitere Rebsorten:

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft
33	Kron, Abenheimer Klausenberg	Saint Laurent	2002	Deutschland
34	E. Gallo Siera Valley	Zinfandel	2000	USA
35	Mederano Tinto	Tinto	2000	Spanien
36	Vina Enterizo	Tempranillo	2002	Spanien
37	Abenheimer Klausenberg	Portugieser	2000	Deutschland
38	Terrazas Malbec	Malbec	2002	Argentinien
39	Kirchbichler Südtiroler Edelvernatsch	Trollinger	2001	Italien
40	Grand Sud	Grenache	2003	Frankreich
41	Alto Adige Lagrein	Lagrein	2002	Italien
42	Donne del Sole	Nero d'Avola Merlot	2002	Italien/Sizilien
48	Selzener Rotwein Klostermühlenhof	Dornfelder,	1999/ 2000	Deutschland
82	Piccini	Nero d'Avola	2002	Italien/Sizilien
83	John Carson	Zinfandel	2001	USA
84	Castillo Murviedro	Tempranillo	2000	Spanien
85	Reinares	Tempranillo	2002	Spanien
86	Manincor, Kalterersee	Trollinger	2001	Italien
87	Mundelsheimer Schalkstein	Trollinger	2002	Deutschland
88	Rosenwalzer Kadarka	Kadarka	2002	Jugoslawien

Tabelle 5: Pinot Noir / Spätburgunder Weine:

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft
30	Roux Père & Fils	Pinot Noir	2002	Frankreich
31	Dopff + Irion	Pinot Noir	2000	Frankreich
32	Lorch	Spätburgunder	2001	Deutschland
78	Laroche	Pinot Noir	2001	Frankreich
79	Weinmanufaktur Krems	Pinot Noir	2002	Österreich
80	Kron, Abenheimer Klausenberg	Spätburgunder	2002	Deutschland
81	Kraichtaler Mannaberg	Spätburgunder	2002	Deutschland

Tabelle 6: Weißweine:

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft
43	Fortant	Chardonay	2002	Frankreich
44	Mommessin Nid d'Abeille	Chardonay	2000	Frankreich
45	E+J Gallo	Chardonay	2002	USA
46	KWV	Chardonay	2003	Südafrika
47	Kron	Kerner	2001	Deutschland

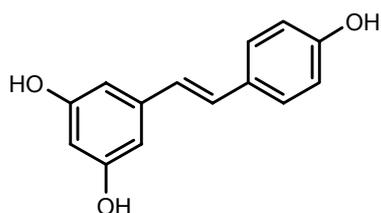
2.3 Fruchtsaft-Polyphenolextrakte

Als Ausgangsmaterial für Fruchtsaftpolyphenolextrakte dienen kommerziell verfügbare Fruchtsäfte. Die Blüten wurden zunächst mit Ameisensäure (5% m/m in Ethanol) oder Salzsäure (3% m/m in Ethanol) extrahiert. Aus diesen Rohextrakten wurden dann die Polyphenolextrakte nach der gleichen Methode präpariert wie die RWPE.

2.4 Naturstoffe

2.4.1 Resveratrol

Das untersuchte Resveratrol stammte von Sigma, Deutschland und wurde in DMSO gelöst. Zur Stimulation wurden die Lösungen der entsprechenden Konzentration im Verhältnis 1:1000 zum Zellkulturmedium gegeben, so daß DMSO in einer Endkonzentration von maximal 1‰ vorlag.

**Abb. 7: Strukturformel von Resveratrol**

2.4.2 Soja-Inhaltsstoffe

Die Sojaisoflavone Formononetin und Biochanin A wurden über die Firma Fluka, Deutschland bezogen.

Deren Metaboliten Daidzein und Genistein stammen von Acros Organics, Belgien.

Alle Substanzen wurden in DMSO gelöst und im Verhältnis 1:1000 zum Zellkulturmedium gegeben, so daß DMSO in einer Endkonzentration von maximal 1‰ vorlag.

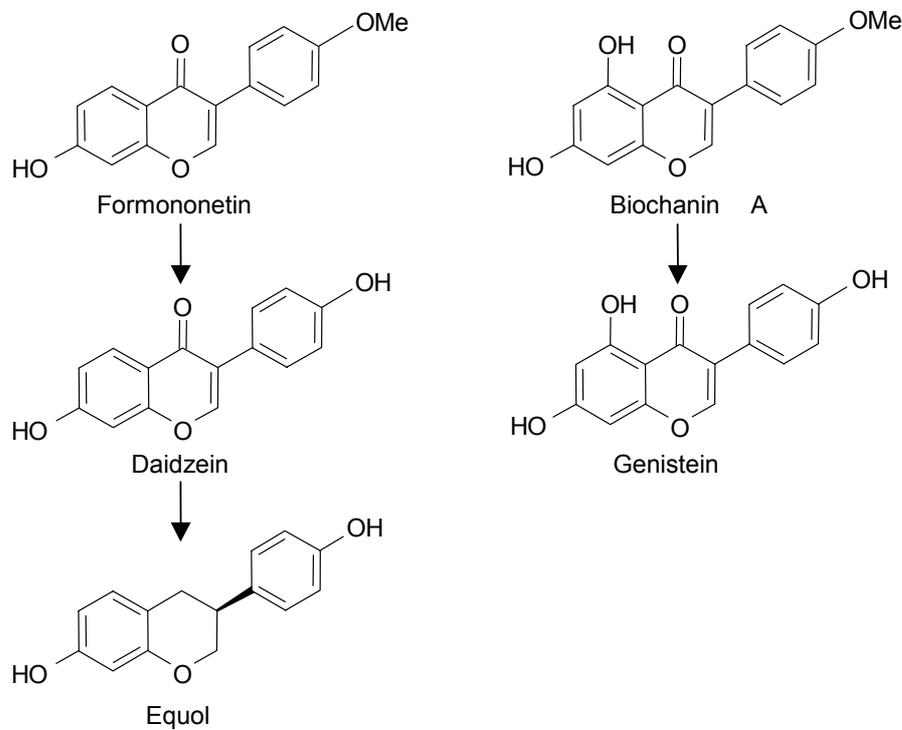


Abb. 8: Strukturformeln und Metabolismus der Sojaisoflavone¹⁰³

2.4.3 Estrogen

17- β -Estradiol stammte von Sigma, Deutschland.

Den Estrogenrezeptor-Antagonist ICI 182,780 bezogen wir von BioTrend, Deutschland.

Beide Substanzen wurden in DMSO gelöst und so zu den Zellen gegeben, daß die Endkonzentration von DMSO 1‰ nie überstieg.

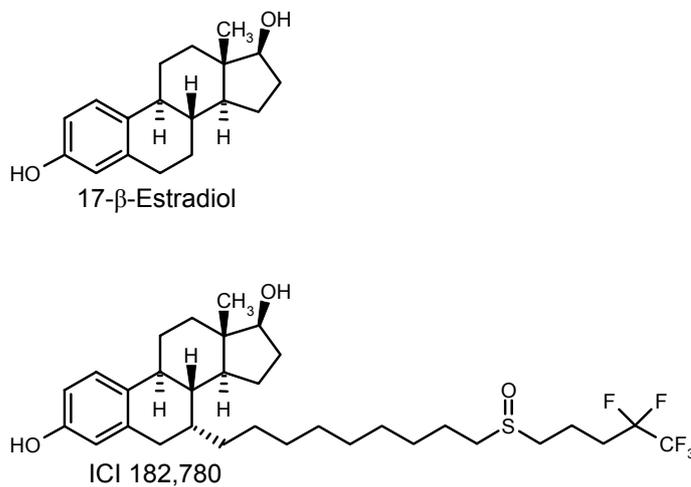


Abb. 9: Strukturformeln von 17- β -Estradiol und dem Estrogen Rezeptor Antagonisten ICI 182,780

2.4.4 Weitere Naturstoffe und Naturstoffderivate

Zum Vergleich mit den Polyphenolextrakten aus Rotwein wurden einige weitere polyphenolische Verbindungen, verschiedene Pflanzensäuren sowie einige mit Resveratrol verwandte Stilbenderivate, als Einzelsubstanzen untersucht. Des weiteren kamen noch das Flavonol Quercetin, die Anthocyanidine Delphinidin- und Malvidinchlorid und das Anthocyan Cyaninchlorid zum Einsatz:

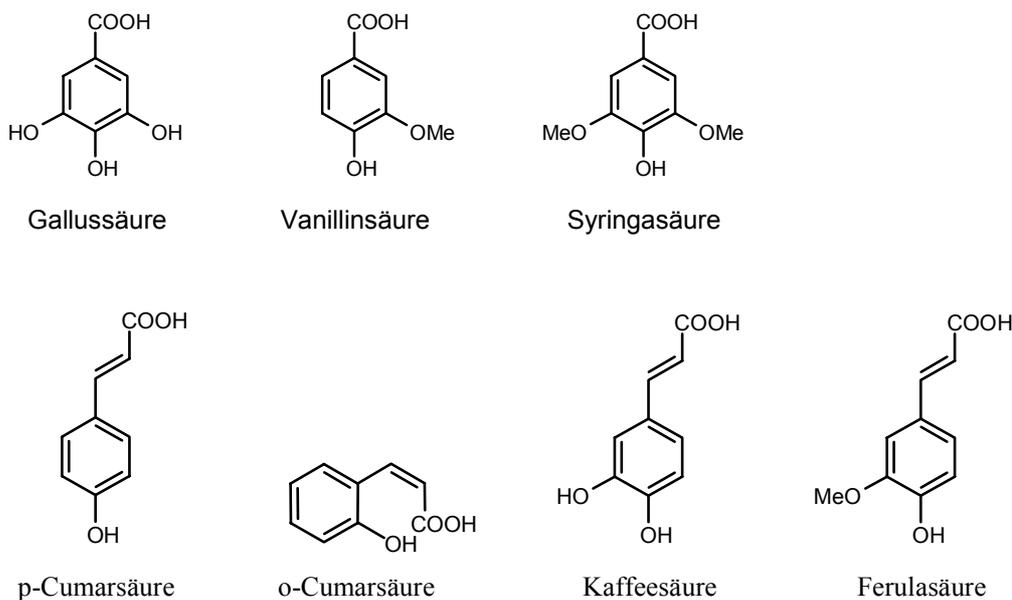
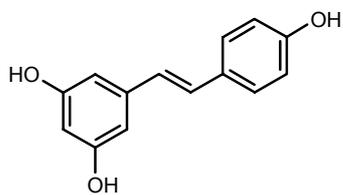
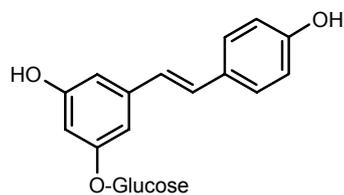


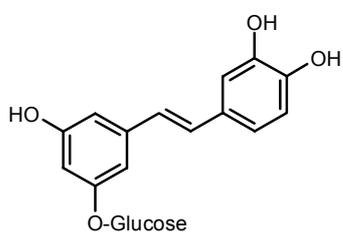
Abb. 10: Strukturformeln untersuchter Pflanzensäuren



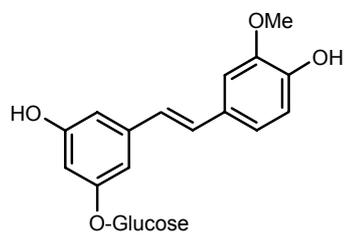
Resveratrol



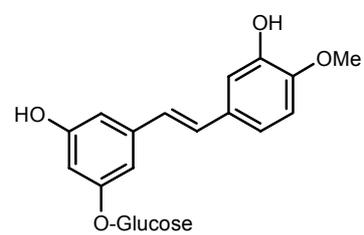
Piceid



Astringin

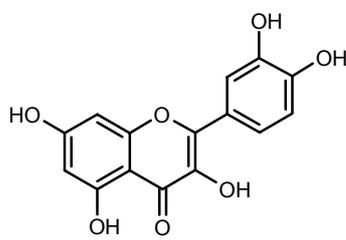


Isorhapontin

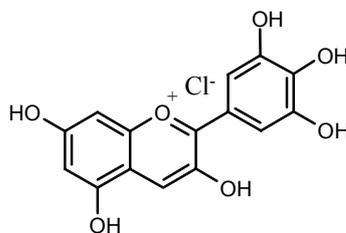


Rhapontin

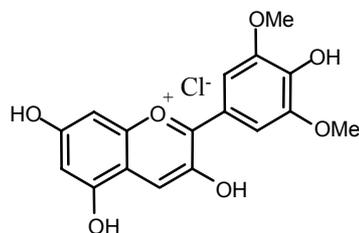
Abb.11: Strukturformeln untersuchter Stilbenderivate



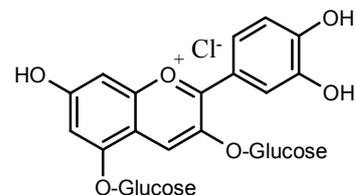
Quercetin



Delphinidinchlorid



Malvidinchlorid



Cyanidinchlorid

Abb. 12: Strukturformeln eingesetzter Flavonoide und Anthocyanidine

3 Bestimmung der Aktivität des humanen eNOS Promotors mittels Luziferase Reportergen Experimenten

3.1 Theorie

Die Aktivität eines bestimmten Promotors kann über Reportergenexperiment quantifiziert werden. Der zu untersuchende Promotor oder ein Teil davon wird in einem Plasmid vor ein Gen eingefügt, dessen Produkt leicht nachzuweisen und zu quantifizieren ist. Je aktiver der Promotor ist, desto mehr des Reportergenproduktes wird in einer Zelle, die dieses Plasmid enthält, gebildet.

In unserem Luziferase-Reportergen Experiment haben wir EA.hy926 Zellen verwendet, in die stabil das Plasmid pNOSIII-Hu-3500-Luc-neo transfiziert war. Dieses Plasmid enthält ein 3500 Basenpaare langes Segment des menschlichen eNOS Promotors, unter dessen Kontrolle das Gen für die Glühwürmchenluziferase (aus *Photinus pyralis*) steht. Luziferase katalysiert die Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin unter Emission von Licht (**Abb. 13**).

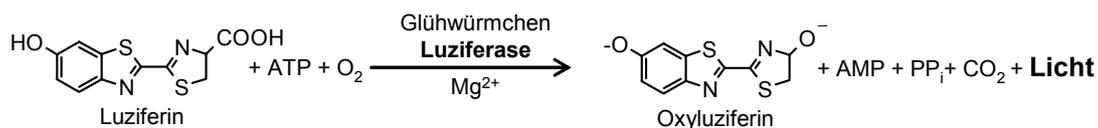


Abb. 13: Durch die Glühwürmchenluziferase katalysierte Lumineszenzreaktion

Durch spezielle phenolische Zusätze im Reaktionsgemisch wird die Lichtemission bis zu 60 s nach Substratzugabe konstant gehalten. Die Stärke der Lichtemission kann gemessen werden und ist direkt proportional zur Menge der exprimierten Luziferase im Reaktionsansatz. Die Luziferaseexpression ist ein Maß für die Aktivität des vorgeschalteten Promotors. Zur Expression des Luziferase-Proteins benötigen die Zellen ca. 18 h.

3.2 Lösungen

Für die Durchführung der Experimente wurden die fertigen Lösungen des „Luziferase Assay System“ von Promega verwendet.

3.3 Versuchsablauf

Für Untersuchungen zur Aktivität des eNOS Promotors wurden EA.hy926-heNOS-Luc Zellen in 24-Well Platten ausgesät. Pro Well wurden 75.000 Zellen in 1,5 ml DMEM ohne G418 ausgesät. Nach 72 h Wachstumsphase wurden die Vertiefungen kontrolliert. Hatten die Zellen das Stadium der Konfluenz erreicht, wurde die entsprechende Testsubstanz zugegeben. Nach 18-20 h Einwirkzeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen des

PBS wurden die Zellen mit 150 µl eiskaltem Lysepuffer (Promega) pro Well für 10 min lysiert. Das Lysat wurde abgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 6000 x g für 5 min zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden abgenommen und in ein Luminometerröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden, nachdem die Lysate Raumtemperatur erreicht hatten, in einem Kettenluminometer (AutoLumat Plus, Berthold, Deutschland) vermessen, Die Versuchsbedingungen waren wie folgt gewählt:

Zugabe von Luziferase Substrat:	70 µl
Verzögerung	02 s
Messung	08 s.

4 mRNA Bestimmung mittels RealTime PCR

4.1 Theorie

Um den Gehalt der mRNA eines bestimmten Proteins in Zellen zu messen wird zunächst die mRNA isoliert und durch Northern Blot quantitativ nachgewiesen. Dieses Verfahren ist jedoch aufwendig, da zuerst eine radioaktiv markierte Sonde zur Detektion der entsprechenden mRNA-Sequenz hergestellt werden muß. Beim blotten der Proben können Fehler auftreten, außerdem ist die Quantifizierung der Autoradiographie problematisch.

Bei der RealTime PCR kann man diese Probleme umgehen. Zunächst wird die mRNA in einer RT Reaktion zu cDNA umgeschrieben. Diese wird anschließend in einer PCR Reaktion vervielfältigt. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wird die Amplifikation der DNA dabei direkt verfolgt. Das geschieht, indem bei jedem Zyklus während der Reaktion die DNA Menge fluorimetrisch gemessen wird. Bei dem von uns verwendeten TaqMan[®] System geschieht dies durch zerschneiden einer RNA Sonde durch die Taq Polymerase während der Amplifikation. Dadurch wird ein am 5'-Ende sitzender Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Das 3'-Ende der Sonde ist mit einem Farbstoff gekoppelt, der bei räumlicher Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende dessen Fluoreszenz löscht. Nach Spaltung der Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase kann der freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff aus der Nähe des Quenchers weg diffundieren und liefert nun ein meßbares Fluoreszenzsignal (**Abb. 14**). Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei direkt der Menge eben abgeschriebener DNA proportional. Sie wird registriert und später ausgewertet.

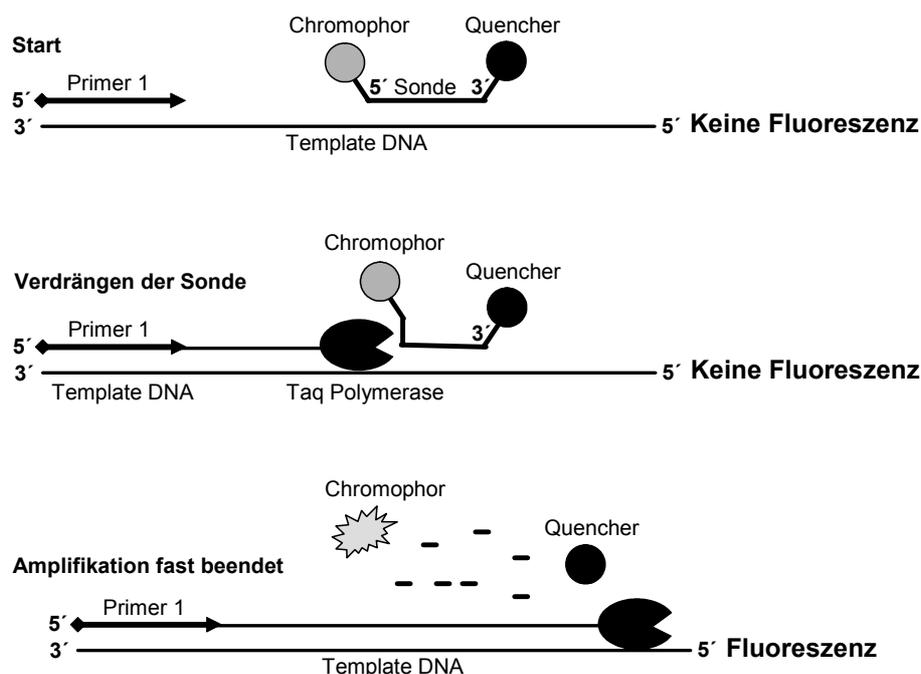


Abb. 14: DNA Amplifikation und Signalgenerierung bei der RealTime PCR nach der TaqMan[®] Methode

4.3.1 RNA Isolierung

Nach entsprechenden Stimulationszeiten wurden die Zellen lysiert und die RNA aus den Zellen mit Hilfe des RNeasy mini Kits von Quiagen nach Vorgaben des Herstellers extrahiert. Der Kit basiert auf einer säulenchromatographischen Methode. Der Gehalt und die Reinheit der extrahierten RNA wurden durch Messung der optischen Dichte bei 280 und 260 nm bestimmt. Die Unversehrtheit der isolierten RNA wurde durch nicht denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid überprüft. Die Bedingungen der Elektrophorese waren:

Agarosegel	1,2%
Spannung	60 V
Laufzeit	3 h

4.3.2 Reverse Transkription

500 ng RNA wurden revers transkribiert. Für den Reaktionsansatz wurden die *TaqMan*[®] *Reverse Transcription Reagents* von Applied Biosystems benutzt. Als Primer wurden Random Hexamere eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren:

Vorinkubation:	25°C, 10 min
Reverse Transkription	48°C, 30 min
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	95°C, 5 min

4.3.3 PCR Reaktion

Die PCR wurde mit jeweils den gleichen Mengen an cDNA in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Die nötigen Primer und die *TaqMan*[®] Sonde wurde mit Hilfe der *Primer-Express*[®] Software entworfen und hatten die folgenden Sequenzen:

Forward Primer:	GGCATCACCAGGAAGAAGACC
Reverse Primer:	GCCATCACCGTGCCCAT
<i>TaqMan</i> [®] Sonde:	CTTCACGGCGTTGGCCACTTCTTTAA

Die Sonde war mit FAM als Reporterfarbstoff und TAMRA als Fluoreszenzlöcher markiert. Ausgangssequenz für den Entwurf der Primer und der Sonde war die eNOS DNA Sequenz mit der Nummer D26607 aus der NCBI Sequenzdatenbank. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus den *TaqMan*[®] PCR Core Reagents der Firma Applied Biosystems. Zum Schutz vor Verunreinigungen mit bereits früher amplifizierter DNA aus dem Gerät wurde der eigentlichen PCR Reaktion eine Inkubation mit Uracil-N-Glykosylase (UNG) vorgeschaltet. Der PCR Reaktionsansatz enthält dUTP anstelle von dTTP und folglich auch die amplifizierte DNA. Nur diese und nicht die eingesetzte cDNA wird von UNG abgebaut.

Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt gewählt:

UNG-Inkubation:	50°C, 2 min
Polymerase Aktivierung:	95°C, 10 min
PCR: 45 Zyklen	95°C, 15 s / 60°C, 1 min
Forward Primer	600 nM
Reverse Primer	600 nM
TaqMan [®] Sonde	200 nM

Die Reaktion wurde in einem Gen-Amp 9600 PCR System durchgeführt und mit dem AbiPrism[®] 5700 Sequenzdetektor verfolgt (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Deutschland) und ausgewertet. Die Versuchsdurchführung und die Auswertung der Daten folgte den Angaben des Herstellers.

5 Protein Detektion mittels Western Blot

5.1 Theorie

Der Western Blot bietet eine gute Möglichkeit sowohl des qualitativen als auch des quantitativen Nachweises einzelner Proteine aus dem Zellysat. Alle Proteine des Zellysates werden zunächst auf einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch entsprechend der Molekülgröße aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend auf eine Membrane übertragen (blotten). Das zu untersuchende Protein wird durch die Reaktion mit einem monoklonalen oder polyklonalen Antikörper selektiv markiert. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird danach durch Zugabe eines Zweitantikörpers, der gegen den F_c-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist und selbst mit einem Enzym markiert wurde, über eine entsprechende enzymatische Reaktion detektiert (siehe **Abb. 15**).

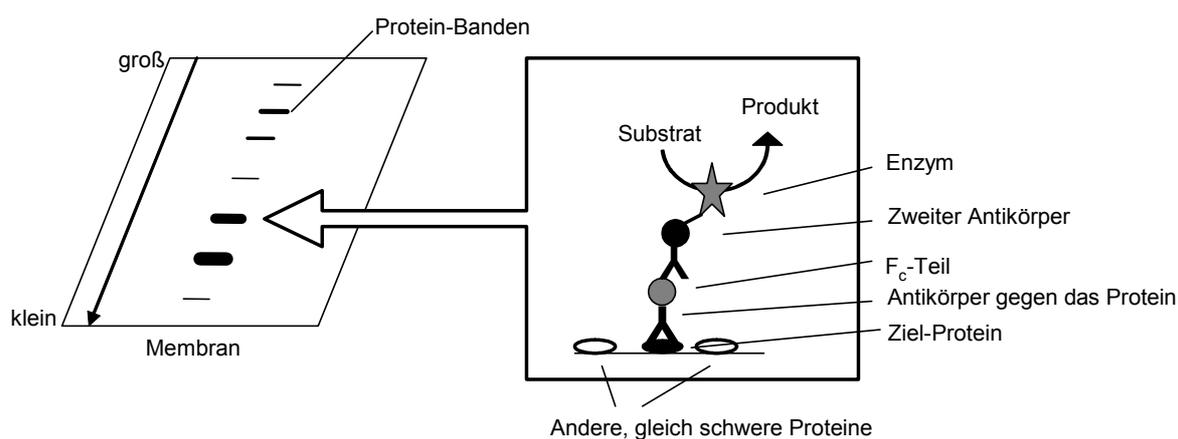


Abb. 15: Schema der Proteindetektion mittels Western Blot

Gibt man auf die so behandelte Membran das Substrat des Enzyms, wird dieses entsprechend der Menge an Zweitantikörper lokal dort umgesetzt, wo sich das nachzuweisende Protein auf der Membran befindet. Bei der enzymatischen Reaktion werden entweder Farbstoffe gebildet oder Energie in Form von Licht freigesetzt. Das Ausmaß des enzymatischen Umsatzes ist proportional der Menge des nachgewiesenen Proteins auf der Membran und kann zu dessen Quantifizierung herangezogen werden.

In diesem Fall wurde ein Zweitantikörper verwendet, an den Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Gibt man eine Mischung aus Wasserstoffperoxid und Luminol auf die Membran, wird Luminol unter der Katalyse der Meerrettichperoxidase oxidiert und emittiert dabei Licht (siehe **Abb. 16**), welches mit einem Röntgenfilm detektiert wurde.

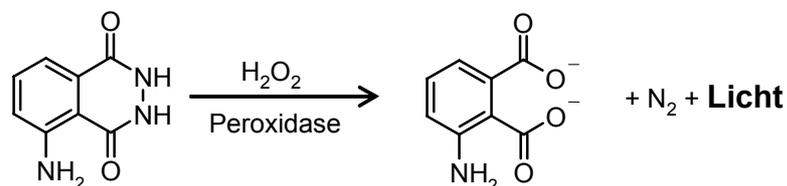


Abb. 16: Enzymatische Oxidation von Luminol

5.2 Lösungen

5.2.1 Lysepuffer:

Die eNOS liegt in der Zelle nicht nur frei im Zytosol, sondern in den Caveolae der Zellmembran an Caveolin-1 gebunden vor. Für die Extraktion des eNOS Proteins aus den Zellmembranen ist daher ein optimierter Lysepuffer nötig (nach Li et al.⁷⁵).

Tris-HCl	50,0 mM	0,1970 g
EDTA	0,5 mM	0,0036 g
EGTA	0,5 mM	0,0047 g
DTT	2,0 mM	0,0077 g
Glutathion	7,0 mM	0,0537 g
CHAPS	20,0 mM	0,3075 g
Glycerol	10%	2,5 ml
H ₂ O		ad 25 ml

pH 7,5

+ Complete Stocklösung (40 µl / ml)

5.2.2 Proteaseinhibitor, Stocklösung:

1 Tablette des Proteaseinhibitors Complete[®] (Roche, Deutschland) in 2 ml PBS muß aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt werden.

5.2.3 5-fach Probenpuffer:

Der Probenpuffer wird aus den folgenden Stocklösungen hergestellt:

3,125 M TrisHCl in H ₂ O pH 6,8	100 µl
Glycerol	500 µl
20 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in H ₂ O	250 µl
16 % DTT in H ₂ O	125 µl
5% Pyronin Y in H ₂ O	5 µl
H ₂ O	20 µl

5.2.4 Sammelgel:

30% Polyacrylamid (PAA)	2,55 ml
1,25 M Tris HCl pH 6,8	1,50 ml
10% SDS	0,15 ml
H ₂ O	10,50 ml
zum Polymerisieren	
TEMED	30 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	150 µl

5.2.5 Trenngel:

30% Polyacrylamid (PAA)	5,625 ml
1,5 M Tris HCl pH 6,8	5,625 ml
10% SDS	0,255 ml
H ₂ O	11,025 ml
zum Polymerisieren	
TEMED	22,5 µl
10% APS	112,5 µl

5.2.6 Elektrophorese-Puffer:

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

pH: muß nicht eingestellt werden

5.2.7 *Transfer-Puffer:*

Tris Base	3,0 g
Glycin	14,4 g
H ₂ O	ad 800 ml
Methanol	200 ml
pH 8,3-8,4	

5.2.8 *TBS-T:*

Tris Base	3,0 g
NaCl	11,1 g
Tween 20	1,0 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,4	

5.2.9 *Antikörper Lösungen*

1. Antikörper Lösung:

Maus Anti-eNOS-Antikörper (Transduction Laboratories Klon 3, IgG1, monoklonal)

1:2500 in TBS-T mit 1% BSA (Rinderserumalbumin)

kann bei -20°C aufbewahrt und maximal 5 x verwendet werden

2. Antikörper Lösung:

Der Antikörper ist zur Detektion mit Meerrettichperoxidase gekoppelt

Ziege Anti-Maus-Antikörper (Biozol, IgG1, monoklonal)

1:1000 in TBS-T mit 1% BSA (Rinderserumalbumin)

kann bei -20°C aufbewahrt und maximal 5 x verwendet werden

5.2.10 *Hausgemachtes Chemolumineszenz Reagenz*

Tris Base	1M in H ₂ O, pH 8,5	1 ml	
Luminol	250 mM in DMSO	50 µl	
p-Cumarsäure	90 mM in DMSO	22 µl	
H ₂ O		9 ml	
H ₂ O ₂ , (30%)		3 µl	erst kurz vor der Detektion zugeben!

5.2.11 Färbelösungen

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie Brilliantblau G		1,5 g
Eisessig	10%	50 ml
Ethanol	45%	225 ml
H ₂ O	45%	225 ml

Entfärbelösung:

Eisessig	10%	100 ml
Ethanol	33%	330 ml
H ₂ O	57%	570 ml

Ponceau-Färbelösung

Ponceau S		0,1 g
Eisessig	5%	5,0 g
H ₂ O	95%	95,0 g

5.3 Versuchsablauf

5.3.1 Zellvorbereitung und Ernte

EA.hy926 Zellen wurden für die Western Blot Experimente in 6-Well Platten ausgesät. Pro Well wurden $0,4 \times 10^6$ Zellen in 5 ml DMEM ausgesät. 96 h später wurden die Zellen kontrolliert. Wenn alle Löcher konfluente Zellrasen aufwiesen, wurden sie für 20 h mit den Testsubstanzen stimuliert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen 2 x mit PBS gespült. In jedes Well wurden 100 µl Lysepuffer gegeben, dem zuvor 40 µl Complete[®] Stocklösung pro ml zugesetzt worden waren. Die Zellen wurden sogleich mit einem Zellschaber abgekratzt und das Zellysate so vollständig wie möglich in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde für 15 min auf Eis inkubiert und dann für 30 s im Ultraschallbad behandelt. Die Gefäße mit dem Lysat wurden anschließend 1 h bei 14.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Gesamtproteinmenge mit der Methode nach Bradford⁷⁶ bestimmt. Die Proteinlösung wurde darauf mit 5-fach Probenpuffer im Verhältnis 1:5 versetzt und bei 95°C 5 min gekocht. Jeweils 20 µg Protein wurden der Gelelektrophorese unterworfen, die restliche Probenmenge bei -20°C eingefroren und aufbewahrt.

5.3.2 SDS Polyacrylamid Disk-Gelelektrophorese

Durch das Kochen mit Probenpuffer werden die Proteine des Zellysates auf die elektrophoretische Trennung vorbereitet: Disulfidbrücken zwischen einzelnen Aminosäuresträngen werden durch DTT

reduktiv gespalten, die Proteine durch das Kochen vollständig denaturiert und durch die Anlagerung von SDS gleichmäßig negativ geladen. Die negativ geladenen Komplexe werden auf einem Polyacrylamidgel (7,5%) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Dem Trenngel wird ein Sammelgel aufpolymerisiert. In diesem werden die Proteine zwischen einem Leit-Ion (Cl^-) und einem Folge-Ion (Glycin^-) zunächst fokussiert, bevor sie in das Trenngel übertreten. Dieses weist einen anderen pH-Wert auf. Das Folge-Ion, nun stärker geladen, überholt die Proteine, deren Wanderungsgeschwindigkeit nun dem Molekulargewicht proportional ist. Die Methode wurde 1970 von Laemmli⁷⁷ beschrieben und zeichnet sich durch gute Auflösung und Trennschärfe aus. Die Bedingungen der Elektrophorese waren wie folgt gewählt:

Sammelgel:

Spannung	100 V
Laufzeit	20 min

Trenngel:

Spannung	200 V
Laufzeit	35 min

5.3.3 *Protein Transfer auf die PVDF Membran (blotten)*

Die Proteine wurden aus dem SDS-Polyacrylamidgel per Tank Blot Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Immobilon®-P, 0,45 μm Porengröße, Millipore, Deutschland) transferiert. Die Bedingungen für den Transfer waren wie folgt gewählt:

Spannung	23 V
Transferzeit	16 h
Temperatur	4°C

5.3.4 *Immunologische Detektion*

Die Membran wurde sofort nach dem Proteintransfer aus der Apparatur genommen und für 2 h bei Raumtemperatur (RT) mit einer Lösung von 3% Rinderserumalbumin (BSA) in TBS-T geschüttelt. Das BSA bindet dabei an noch nicht mit Protein besetzte Stellen auf der PVDF Membran und sättigt so die unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper, die ja ebenfalls Proteine sind, ab. Anschließend wurden die Membranen mit der Lösung des Anti-eNOS-Antikörpers bei 4°C über Nacht geschüttelt. Nachdem die Membran im Anschluß mindestens drei Mal mit TBS-T für 10 min gewaschen worden war, erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 1 h bei RT. Nach nochmaligem Waschen mit TBS-T (3 mal min. 10 min) wurden die Blots in der Dunkelkammer mit einem

Chemolumineszenzreagenz (Hausgemacht oder *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*, Amersham Biosciences, England) benetzt und die resultierende Lumineszenz durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Mit Hilfe eines zusätzlich mitgeblotteten Größenmarkers (Precision Protein Standards[®], Biorad, Deutschland) wurde die eNOS-Proteinbande (133 kDa) identifiziert. Neben der eNOS Bande wurden auf dem Gel weitere unspezifische Banden gefunden, die eNOS Bande war jedoch immer die intensivste (**Abb. 17**).

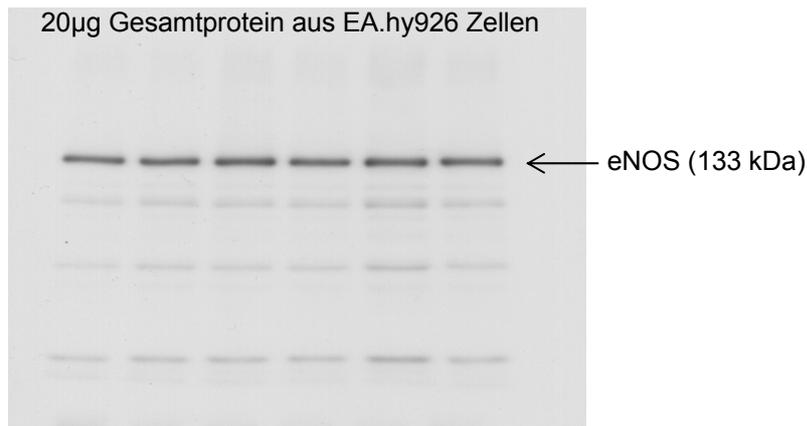


Abb. 17: Repräsentativer eNOS Western Blot.

Das eNOS Protein wurde wie oben beschrieben auf eine PVDF Membran geblottet und immunologisch detektiert. Zur Übersicht ist der ganze Blot gezeigt.

5.3.5 Kontrolle des Proteintransfers und Ladungskontrolle

Um den gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die Membran zu kontrollieren, wurden die Gele nach dem Blotten mit Coomassie-Färbelösung (Coomassie Brilliantblau G, Sigma; Deutschland) für 15 min gefärbt. Der überflüssige Farbstoff wurde anschließend mit Entfärberlösung wieder aus dem Gel gewaschen. Der Farbstoff bindet an im Gel zurückgebliebene Proteine und erzeugt so blaue Banden im Gel. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 1-15 µg Protein. Die Gleichmäßigkeit der Banden wurde visuell beurteilt.

Zur Überprüfung der Gleichmäßigkeit des Proteinauftrags wurden die fertigen Membranen mit Ponceau-Farbstoff (Ponceau S, Sigma) gefärbt. Die Membranen wurden 5 min in Ponceau-Färbelösung geschüttelt und dann der überschüssige Farbstoff durch waschen mit Wasser entfernt. Ponceau ist ein positiv geladener Farbstoff und bindet an die Proteine auf der Membran, die als rosa Banden sichtbar werden. Die Gleichmäßigkeit der Banden wurde visuell beurteilt.

6 Arginin-Citrullin Umwandlungsexperiment zur Bestimmung der eNOS Enzymaktivität in lebenden Zellen

6.1 Theorie

Das Substrat der endothelialen NO-Synthase ist L-Arginin. L-Arginin wird in einer 5-Elektronen-Oxidationsreaktion unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umgesetzt (**Abb. 18**).

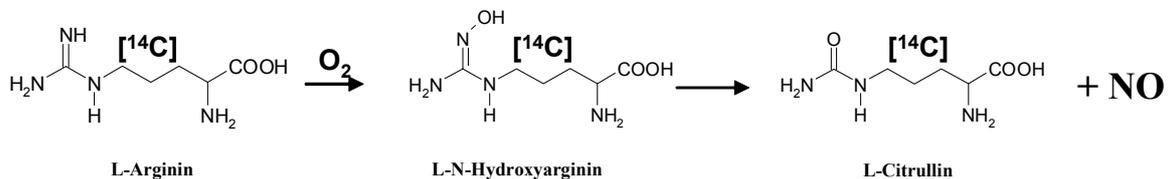


Abb. 18: Reaktionsgleichung der eNOS katalysierten Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO

Die Zellen werden mit $[^{14}\text{C}]$ markiertem L-Arginin gefüttert und setzen dieses analog zu NO und $[^{14}\text{C}]$ markiertem L-Citrullin um. Die Zellen werden nach 25 min Reaktionszeit lysiert und die Aminosäuren aus dem Lysat extrahiert. Diese werden im Anschluß auf Kieselgel Dünnschichtchromatographieplatten aufgetrennt und die radioaktiven Aminosäuren Arginin und Citrullin per Autoradiographie sichtbar gemacht und quantifiziert. Der prozentuale Umsatz von Arginin zu Citrullin ist ein Maß für die Aktivität der eNOS. Der Vorteil dieser an unserem Lehrstuhl ausgearbeiteten Variante liegt darin, daß der Arginin-Umsatz lebender Zellen untersucht werden kann. In bisher beschriebenen Methoden wurde die Aktivität der eNOS im Zellysate bestimmt. Darüber hinaus erfolgt die Trennung nicht wie bei Heller et al.⁷⁸ beschrieben über Kationenaustauschersäulen sondern per Dünnschichtchromatographie (DC). Der Vorteil liegt darin, daß neben dem radioaktiven Citrullin auch das radioaktive Arginin mitbestimmt werden kann. Durch die Anwendung der DC anstelle der Säulenchromatographie wurde der Arbeitsaufwand wesentlich verringert. Somit konnte auch ein großer Probenumfang in angemessener Zeit bearbeitet werden.

Will man in diesem Versuch einen eNOS Hemmer einsetzen, muß man beachten, daß nur ein irreversibler Hemmer verwendet werden kann. Dieser wird vor Zugabe des $[^{14}\text{C}]$ -L-Arginins von den Zellen gewaschen. Ein kompetitiver eNOS Hemmer müßte während der Inkubation mit radioaktivem L-Arginin auf den Zellen verbleiben. Er würde dann mit dem radioaktiven Arginin um den Arginintransporter konkurrieren. Als Folge davon würde zu wenig radioaktives Arginin in die Zellen

aufgenommen werden. Auf der Autoradiographie wären keine radioaktiven Aminosäuren zu detektieren. Wir haben für unsere Versuche N^G-Amino-L-arginin (NAA) verwendet.

6.2 Lösungen

6.2.1 Hepes-Puffer:

Hepes	0,476 g
NaCl	1,700 g
KCl	0,075 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,049 g
Glucose	0,360 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,044 g
H ₂ O	ad 200 ml
pH 7,4	

6.2.2 HBSS:

NaCl	8,180 g
KCl	0,400 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,050 g
KH ₂ PO ₄	0,050 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,180 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,200 g
Glucose	1,000 g
Hepes	4,760 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,4	

6.2.3 Laufmittelgemisch für Dünnschichtchromatographie:

Methanol	45 Teile
Ammoniak 25%	20 Teile
Chloroform	5 Teile
Wasser	10 Teile

6.3 *Versuchsablauf*

EA.hy 926 Zellen wurden für den Versuch in einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Well in 5 ml Medium in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. 96 h nach der Aussaat wurden die Zellen noch einmal auf Konfluenz geprüft und mit den zu untersuchenden Substanzen für 20 h inkubiert. Dann wurde das Medium mit den Testsubstanzen abgesaugt, die Zellen mit HEPES-Puffer gewaschen und mit 1 ml HEPES-Puffer für 45 min bei 37°C equilibriert. Da HUVEC Zellen HEPES-Puffer nicht vertragen und sich von den Kulturplatten lösen, wurde bei Experimenten mit HUVECs analog HBSS verwendet. Nach diesen 45 min wurden in jedes Well 10 µl [^{14}C]-L-Arginin Lösung gegeben (L-[^{14}C (U)]-Arginin, >300mCi / mmol, Perkin Elmer, 1:10 in Wasser verdünnt). Nach weiteren 10 min erfolgt die Zugabe des Ca^{2+} Ionophors A23187 (Alexis) in einer Endkonzentration von 1 µM. Die Stimulation mit dem Ionophor dient der grundlegenden Anhebung der stimulierten und basalen NO Produktion in den Zellen. Das prozentuale Verhältnis zwischen stimulierten Zellen und Kontrollzellen bleibt dabei gleich und kann besser detektiert werden. Von diesem Zeitpunkt an wurden exakt 15 min Reaktionszeit gestoppt (37°C). Durch Transfer der Kulturplatten auf Eis wurde die Reaktion beendet. Die radioaktiven Zellüberstände wurden abgesaugt und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Ethanol (96% V/V) lysiert und 45 min zuerst auf Eis, dann bei RT geschüttelt. 600 µl des Ethanols wurden abgenommen, 900 µl H_2O zugegeben und weitere 30 min bei RT geschüttelt. Die Ethanol- und Ethanol / Wasser-Überstände wurden vereinigt und im Speed-Vac unter Vakuum getrocknet. Aus den getrockneten Pellets wurden die radioaktiv markierten Aminosäuren mit 35 µl Wasser/Methanol Gemisch (1:1) extrahiert und 20 µl dieses Extraktes auf Kieselgel-Fertig-DC-Platten (Polygram® Sil N-HR, Macherey-Nagel, Deutschland) aufgetragen. Die Platten wurden 1 h entwickelt und getrocknet. Das Ergebnis wurde als Autoradiographie im Phosphoimager (Fujix Bioimaging Analyser IPR 1500, Fuji Film, Japan) aufgenommen und ausgewertet. Der prozentuale Umsatz von L-Arginin zu L-Citrullin wurde als Maß für die eNOS Enzymaktivität genommen.

Bei Versuchen mit dem irreversiblen eNOS Hemmer NAA wurde dieser in einer Konzentration von 200 µM 15 min vor Zugabe des [^{14}C]-L-Arginins auf die Zellen gegeben. Vor Zugabe des heißen Arginins wurde der HEPES-Puffer mit NAA abgesaugt und die Zellen sorgfältig zwei Mal mit HEPES-Puffer gewaschen. Dann wurde 1 ml frischer HEPES-Puffer auf die Zellen gegeben und das heiße Arginin wie oben beschrieben zupipettiert.

7 DAF-2 Fluoreszenz Messung zur Bestimmung der NO Freisetzung aus endothelialen Zellen

7.1 Theorie

Entscheidend für die Beurteilung der Relevanz von Ergebnissen, die auf eine vermehrte Bildung von NO durch endotheliale Zellen hinweisen, ist die Klärung der Frage, ob dieses gebildete NO auch außerhalb der Zellen verfügbar ist. Nur dann ist anzunehmen, daß es physiologische Wirkungen vermittelt. Eine zuverlässige und dennoch einfache Methode zur NO Messung im Zellüberstand ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit NO zu stärker fluoreszierenden Produkten reagieren. Wir haben uns für die Verwendung von 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2, Alexis, Deutschland) entschieden. Zu DAF-2 existiert ein Diacetat-Derivat (DAF-2DA), das membrangängig ist und in der Zelle durch Abspaltung der Essigsäurereste gefangen wird. Es dient zur intrazellulären Messung von NO. Diese Methode wurde bereits häufig angewendet⁷⁹⁻⁸¹, weist jedoch wesentliche Mängel auf. Zum einen liefert sie keine Erkenntnisse darüber, wie viel des gebildeten NO wirklich die Zellen verläßt, zum anderen ist die Fluoreszenz dieser Farbstoffe von der Anwesenheit bivalenter Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+})⁸² abhängig. Somit können Veränderungen der Fluoreszenzintensität durch Ioneneinströme in die Zelle verursacht sein und eine erhöhte NO Bildung vortäuschen. Da die Steuerung zellulärer Vorgänge häufig durch Ionenströme erfolgt, ist diese Methode in unseren Augen sehr kritisch zu beurteilen. Die Ionenkonzentrationen im Puffer außerhalb der Zelle werden dagegen nur vernachlässigbar durch physiologische Ionenströme verändert.

DAF-2 reagiert nicht direkt mit NO, sondern mit einem Oxidationsprodukt⁸³, N_2O_3 , einem starken Nitrosierreagenz. Bei der Reaktion von DAF-2 mit 2 Äquivalenten NO in Anwesenheit von Sauerstoff entsteht Triazolofluorescein (DAF-2T) (Abb. 19)⁸⁴.

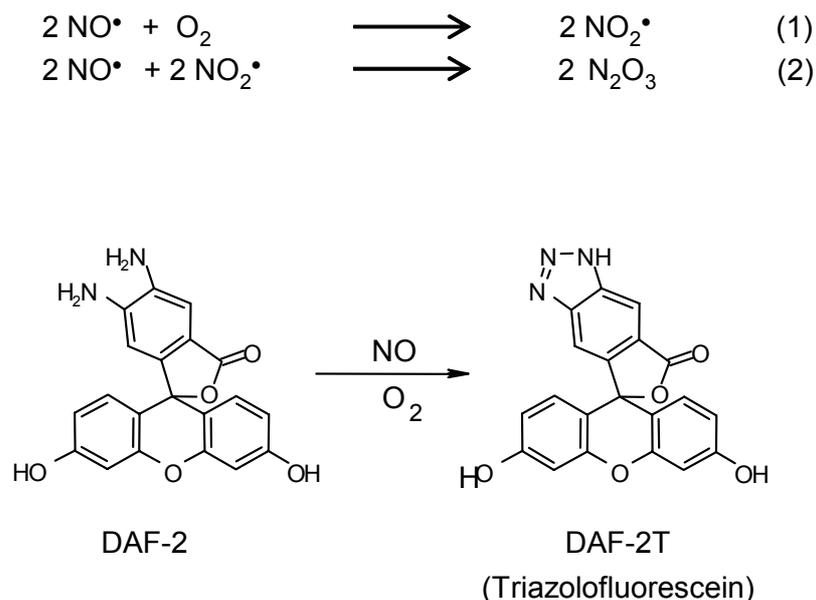


Abb. 19: Reaktion von DAF-2 mit NO in Gegenwart von Luftsauerstoff zu DAF-2T

Absorptions- und Fluoreszenzmaxima beider Verbindungen sind nahezu identisch, DAF-2T fluoresziert jedoch bei 515 nm mit etwa 180-fach stärkerer Intensität als DAF-2 bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm⁸³. Nach Abzug der Eigenfluoreszenz des restlichen DAF-2 ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zu der im Überstand befindlichen Menge an NO. Die Anwendbarkeit dieser Methode für die Messung von NO im Überstand endothelialer Zellkulturen, sowie Besonderheiten und Grenzen wurden von uns ausgiebig untersucht und in zwei Arbeiten publiziert^{85, 86}.

7.2 Lösungen

7.2.1 PBS mit Ca²⁺:

KH ₂ PO ₄	1,47 mM	0,40 g
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	9,57 mM	5,13 g
NaCl	137,00 mM	16,00 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,49 mM	0,24 g
KCl	2,68 mM	0,40 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,90 mM	0,24 g
H ₂ O		ad 2000 ml
pH 7,4		

7.2.2 HBSS:

NaCl		8,180 g
KCl		0,400 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O		0,050 g
KH ₂ PO ₄		0,050 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O		0,180 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O		0,200 g
Glucose		1,000 g
Hepes		4,760 g
H ₂ O		ad 1000 ml
pH 7,4		

7.2.3 Arginin Stocklösung (100mM):

L-Arginin	100mM	0,042 g
H ₂ O		ad 1 ml

7.2.4 Argininhaltiger Puffer (100 μ M):

PBS+Ca ²⁺	50 ml
Arginin-Stocklösung	0,050 ml

7.2.5 A23187 Stocklösung (10mM):

A23187	2 mM	0,001 g
DMSO		ad 191 ml

7.2.6 A23187 Lösung (2mM):

A23187 Stocklösung	1 T
DMSO	4 T

7.2.7 DAF-2-Lösung (20 μ M):

DAF-2 Lösung in DMSO von Alexis 1:250 in PBS mit Ca²⁺ verdünnt

7.3 Versuchsdurchführung

EA.hy 926 Zellen wurden für den Versuch in einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Well in 5 ml Medium in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. 72 h nach der Aussaat wurden die Zellen noch einmal auf Konfluenz geprüft und mit den zu untersuchenden Substanzen für 20 h inkubiert. Dann wurde das Medium mit den Testsubstanzen abgesaugt und die Zellen 2 x mit PBS + Ca²⁺ sorgfältig gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen 5 min mit 2 ml Arginin haltigem Puffer bei 37°C equilibriert. Daraufhin wurde 1 μ l A23187-Lösung (Endkonzentration 1 μ M) und 10 μ l DAF-2 Lösung (Endkonzentration 0,1 μ M) zugegeben und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellüberstände abgenommen und die Fluoreszenz der Proben in einem Fluorimeter (Shimadzu RF-1501 Spectrofluorophotometer) vermessen. Nach Abzug der Fluoreszenz der Blindwerte wurden die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten auf die Intensität der Kontrolle bezogen. Bei Versuchen mit HUVECs wurde PBS + Ca²⁺ gegen HBSS ausgetauscht, da sich HUVECs sonst ablösen.

IV Ergebnisse

1 Einfluß von Sojaisoflavonen im Vergleich zu 17- β -Estradiol auf die eNOS

1.1 Einfluß von Sojaisoflavonen auf die eNOS Promotor Aktivität

1.1.1 Sojaisoflavone steigern die eNOS Promotoraktivität

Um die Effekt von Sojaisoflavonen auf den humanen eNOS Promotor zu untersuchen, wurden stabil transfizierte EA.hy926-heNOS-Luc Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 20 h mit den Sojaisoflavonen Biochanin A und Formononetin und deren Metaboliten Genistein und Daidzein in Konzentrationen von 1 und 10 μ M inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und die Luziferase Aktivität bestimmt. Alle Isoflavone bewirkten eine deutliche Zunahme der Luziferase Aktivität. Diese Zunahme war dosisabhängig. Die Luziferase Aktivität stieg bis zu 2,5-fach im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (siehe **Abb. 20a**). Der Effekt konnte durch 30 minütige Vorinkubation mit dem Estrogen Rezeptor Antagonisten ICI 182,780 nicht gehemmt werden (siehe **Abb. 20b**). Konzentrationen unter 1 μ M waren unwirksam, Konzentrationen über 50 μ M zytotoxisch (Daten nicht gezeigt).

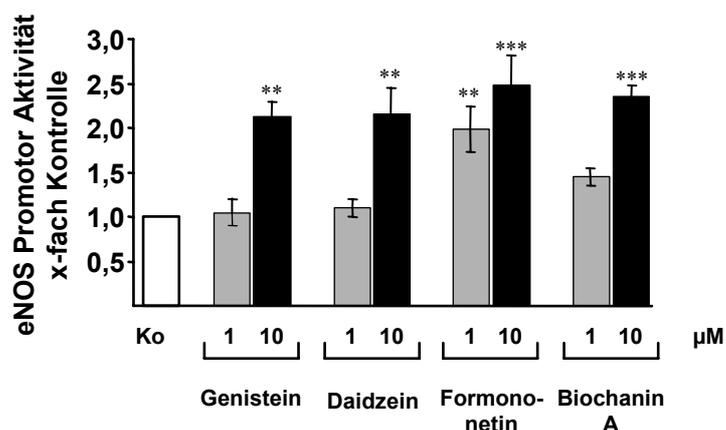


Abb. 20a: Sojaisoflavone erhöhen die eNOS Promotor Aktivität.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden für 20 h mit den Sojaisoflavonen Genistein, Daidzein, Formononetin und Biochanin A in Konzentrationen von 1 und 10 μ M inkubiert. Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und auf die Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen normiert. Sie diente als Maß für die Aktivität des eNOS Promotors.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

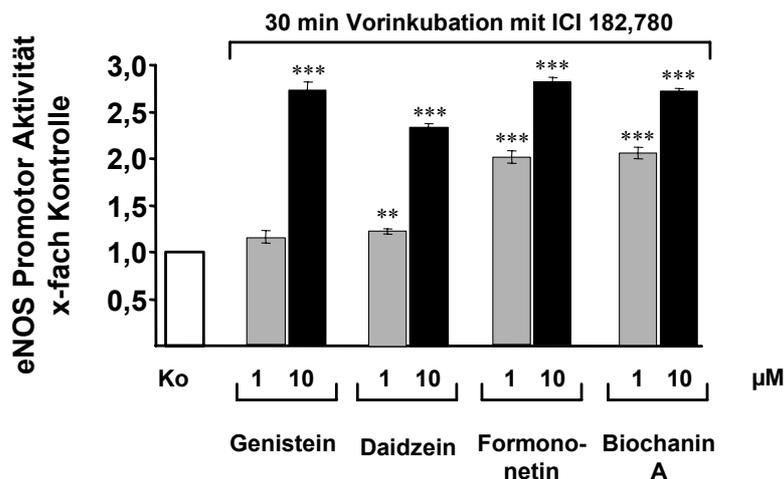


Abb. 20b: Durch Sojaisoflavone erhöhte eNOS Promotor Aktivität ist durch den Estrogen Rezeptor Antagonisten ICI 182,780 nicht hemmbar.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden für 30 min mit dem Estrogen Rezeptor Antagonisten ICI 182,780 (10 µM) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 h mit den Sojaisoflavonen Genistein, Daidzein, Formononetin und Biochanin A in Konzentrationen von 1 und 10 µM behandelt. ICI 182,780 verblieb während dieser Zeit auf den Zellen. Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und auf die Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

1.1.2 17-β-Estradiol hat keinen Einfluß auf die eNOS Promotoraktivität

Da der Effekt der Sojaisoflavone, die als Phytoestrogene beschrieben sind, über den Estrogen Rezeptor wirken könnten, wurde auch der Einfluß von 17-β-Estradiol auf die transfizierten Zellen untersucht. Im Gegensatz zu den Sojaisoflavonen zeigte jedoch die Behandlung mit 17-β-Estradiol in Konzentrationen von 1, 3, 10 und 30 nM (in Anlehnung an⁴⁹) keine Wirkung auf den humanen eNOS Promotor (**Abb. 21**). Auch höhere Konzentrationen ergaben keinen Anhaltspunkt auf eine Beeinflussung des eNOS Promotors (Daten nicht gezeigt).

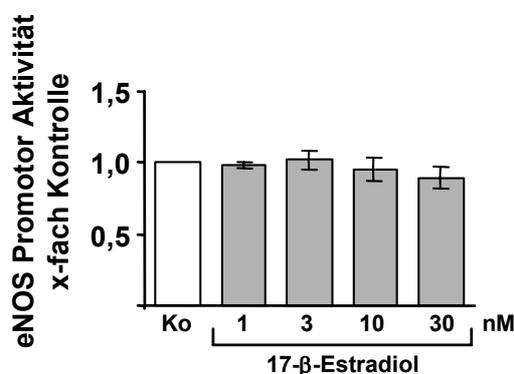


Abb. 21: 17-β-Estradiol hat keinen Einfluß auf die Aktivität des humanen eNOS Promotors.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden für 20 h mit 17-β-Estradiol in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Luziferaseaktivität wurde gemessen und auf die Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Ergebnisse waren nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (ANOVA/Bonferroni)

1.2 Einflüsse auf die eNOS mRNA-Konzentration

1.2.1 Sojaisoflavone zeigen keinen signifikanten Einfluß auf die eNOS mRNA Konzentration

Da alle untersuchten Sojaisoflavone eine aktivitätserhöhende Wirkung auf den eNOS Promotor gezeigt haben, war es von Interesse, ob es in EA.hy926 Zellen auch zu meßbaren Veränderungen der mRNA Konzentration kommt. Aus diesem Grund wurde aus Isoflavon-behandelten Zellen die mRNA isoliert und deren Konzentration mittels RealTime-RT-PCR bestimmt.

EA.hy926 Zellen wurden für 20 h mit den Isoflavonen Formononetin, Biochanin A, Genistein und Daidzein in Konzentrationen von 1 und 10 μM inkubiert. 2 nM Phorbolmyristatacetat (PMA) diente als Positivkontrolle⁷⁴. Im Gegensatz zu PMA vermochte keines der Isoflavone in den angegebenen Konzentrationen die eNOS mRNA Konzentration in den Zellen anzuheben (siehe **Abb. 22**).

Auch nach längeren Untersuchungszeiträumen (48 h und 72 h) war keine Veränderung der mRNA Konzentration nachzuweisen (nicht gezeigt).

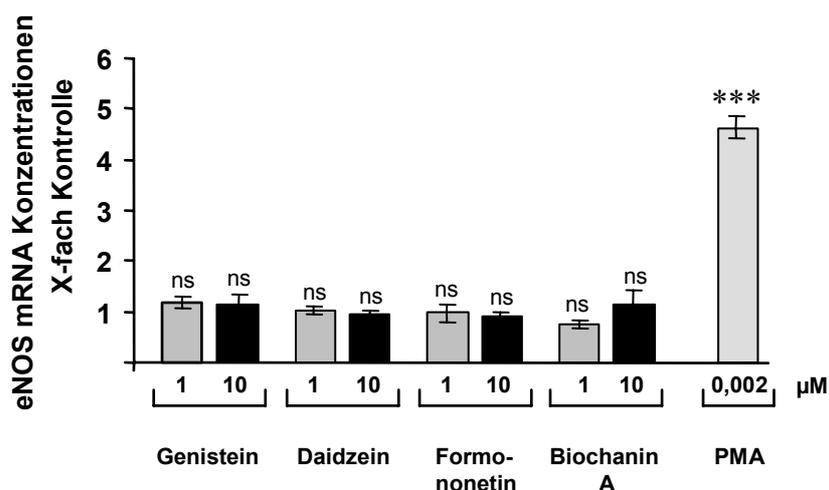


Abb. 22: Die eNOS mRNA Konzentration in EA.hy926 Zellen wird durch Sojaisoflavone nicht beeinflusst.

EA.hy926 Zellen wurden wie angegeben mit Sojaisoflavonen stimuliert. Nach 20 h wurden die Zellen geerntet und die enthaltene mRNA Menge mittels RealTime RT-PCR bestimmt. Keines der untersuchten Isoflavone zeigte einen signifikanten Einfluß auf die eNOS mRNA Konzentration.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. *** $P < 0,001$, ns = nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni)

1.3 Einflüsse auf die eNOS Enzymaktivität

1.3.1 Sojaisoflavone haben einen unterschiedlichen Einfluß auf die eNOS Enzymaktivität

Die eNOS Enzymaktivität wurde durch die Messung des Umsatzes radioaktiv markierten Arginins zu Citrullin bestimmt. Der prozentuale Umsatz von Arginin zu Citrullin kann dabei als ein Maß für die Enzymaktivität angesehen werden. EA.hy926 Zellen wurden 20 bis 96 h lang mit den Isoflavonen behandelt. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen mit [^{14}C]-L-Arginin versetzt, nach 15 min Reaktionszeit lysiert und die Aminosäuren extrahiert. Neu gebildetes [^{14}C]-L-Citrullin wurde von [^{14}C]-L-Arginin über Dünnschichtchromatographie (DC) getrennt und per Autoradiographie detektiert und quantifiziert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Nach 20 h verursachte keines der Isoflavone eine signifikante Änderung im Argininumsatz (nicht gezeigt). Dagegen war im Zeitraum zwischen 48 und 96 h ein signifikanter Anstieg der Citrullinproduktion auf das 1,7-fache Niveau der Kontrollzellen in Genistein stimulierten Zellen zu registrieren (siehe **Abb. 23a, b**). Daidzein verursachte keinen Effekt. Formononetin und Biochanin A waren ebenfalls ohne Wirkung, Biochanin A scheint nach 96-stündiger Stimulation sogar die Citrullin Produktion zu hemmen (**Abb. 23c**).

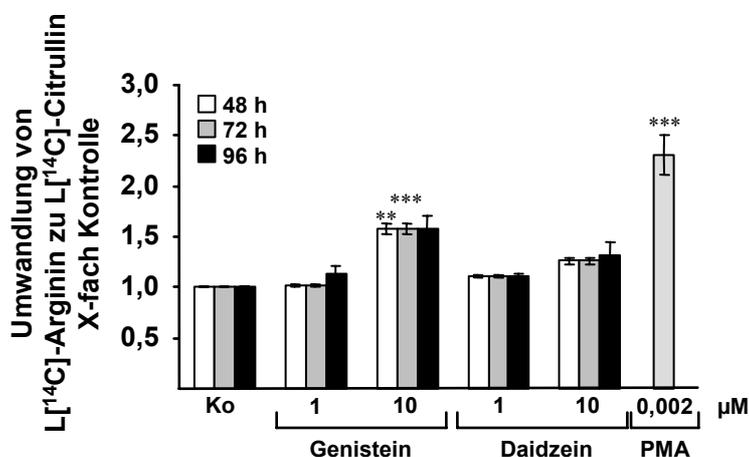


Abb. 23a: Genistein erhöht die L-Citrullinproduktion in EA.hy926 Zellen nach 48-96 h Stimulation.

Der Umsatz von Arginin zu Citrullin ist ein Maß für die Aktivität der eNOS. EA.hy926 Zellen wurden für 48-96 h wie angegeben mit den Sojaisoflavonen Genistein und Daidzein stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Der prozentuale Umsatz von Arginin zu Citrullin wurde bestimmt und auf den Wert unbehandelter Kontrollzellen (Ko) normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni)

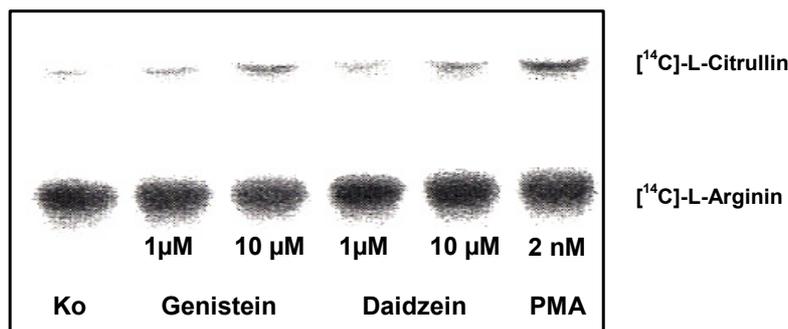


Abb. 23b: Genistein erhöht die Citrullin Produktion in EA.hy926 Zellen nach 72 h Stimulation.

EA.hy926 Zellen wurden für 72 h wie angegeben mit den Sojaisoflavonen Genistein und Daidzein, stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle.

Die Abbildung zeigt eine repräsentative Autoradiographie.

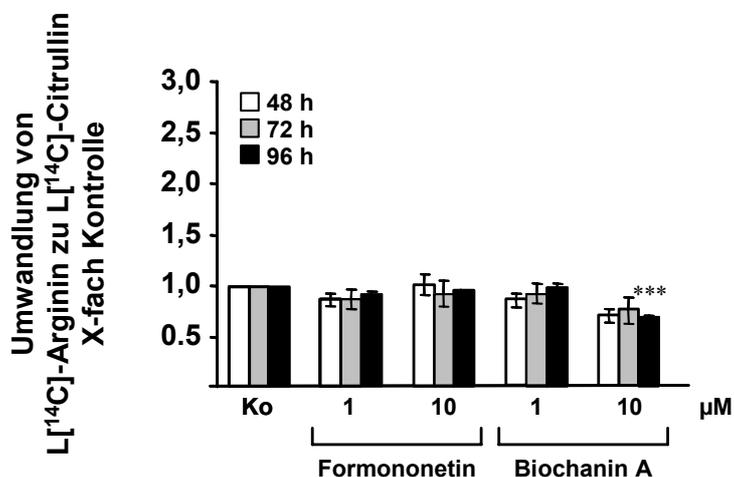


Abb. 23c: Formononetin und Biochanin A bewirken keine erhöhte Citrullin Produktion in EA.hy926 Zellen nach 48-96 h Stimulation.

EA.hy926 Zellen wurden für 48-96 h wie angegeben mit den Sojaisoflavonen Formononetin und Biochanin A stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Der prozentuale Umsatz von Arginin zu Citrullin wurde bestimmt und auf den Wert unbehandelter Kontrollzellen (Ko) bezogen.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni)

1.3.2 17- β -Estradiol hat keinen Einfluß auf die eNOS Enzymaktivität

Die gesteigerte eNOS Enzymaktivität unter dem Einfluß von Genistein könnte unabhängig von der vermehrten Promotoraktivität über den Estrogen Rezeptor vermittelt sein. Deshalb wurde zum Vergleich die Wirkung von Estrogen auf die eNOS Aktivität gemessen. EA.hy926 Zellen wurden für 48-96 h in Anlehnung an⁴⁹ mit 17- β -Estradiol in Konzentrationen von 1, 3, 10 und 30 nM behandelt. PMA in einer Konzentration von 2 nM (24 h) diente als Positivkontrolle. Im Gegensatz zu Genistein war Estrogen in keiner Konzentration in der Lage, eine Steigerung der Citrullin Produktion in den Zellen auszulösen (**Abb. 24**).

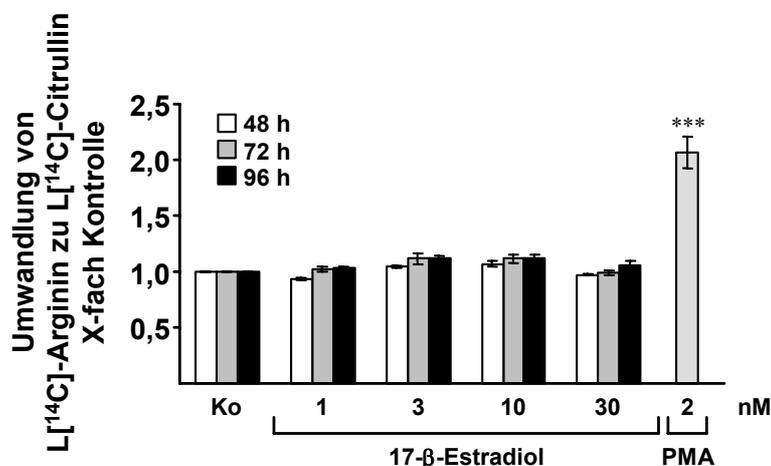


Abb. 24: Estrogen hat keinen Effekt auf die CitruUllinbildung durch EA.hy926 Zellen.

EA.hy926 Zellen wurden für 48-96 h wie angegeben mit 17-β-Estradiol stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Der prozentuale Umsatz von L-Arginin zu L-CitruUllin wurde bestimmt und auf den Wert unbehandelter Kontrollzellen (Ko) normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

1.4 Einflüsse auf die eNOS vermittelte NO Produktion

1.4.1 Genistein erhöht die eNOS vermittelte NO Produktion

Das in den Zellen durch die eNOS gebildete NO muß nicht zwangsläufig bioverfügbar sein, da es sich bei NO um ein reaktionsfreudiges freies Radikal handelt. Es kann vor dem Verlassen der Zelle durch Reaktionen mit Zellbestandteilen (freien -SH oder -NH₂ Gruppen der Proteine) oder Sauerstoffradikalen abgefangen werden. Um die Menge an verfügbarem NO zu messen, wurden EA.hy926 Zellen mit den Isoflavonen Formononetin, Biochanin A, Genistein und Daidzein für 20-96 h stimuliert. Die nach vorausgegangener Stimulation erfolgte Freisetzung von NO in den Zellüberstand wurde fluorimetrisch nach Reaktion mit DAF-2 ermittelt und auf die NO Produktion unbehandelter Kontrollzellen bezogen. Nach 20 h Stimulation war keines der Isoflavone in der Lage, die Menge an freigesetztem NO zu erhöhen (**Abb. 25a**). Nach 48-96 h zeigte sich für Genistein behandelte Zellen eine leichte (1,7-fache), aber signifikante Zunahme (siehe **Abb. 25b**). Für Daidzein war ebenfalls eine Tendenz zu steigender NO Produktion zu erkennen, der Anstieg war jedoch nicht signifikant. Formononetin verstärkte in diesem Experiment ebenfalls signifikant die gemessene Fluoreszenz (ca. 1,5-fach, siehe **Abb. 25c**). Unglücklicherweise fluoresziert Formononetin bei der Emissionswellenlänge von DAF-2T selbst, sodaß trotz ausgiebiger Waschschrirte nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei der gemessenen Fluoreszenzerhöhung um Formononetin-Eigenfluoreszenz handelt, die eine erhöhte NO Freisetzung vortäuscht.

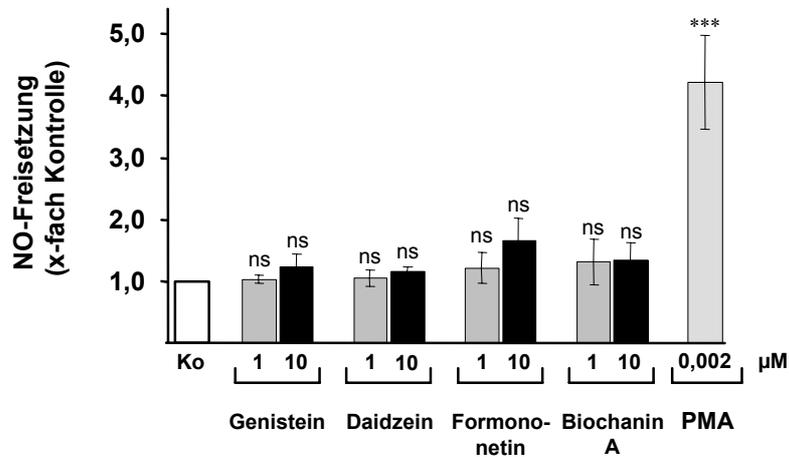


Abb. 25a: Sojaisoflavone haben nach 20 h Stimulationszeit keinen Einfluß auf die eNOS vermittelte NO Produktion in EA.hy926 Zellen.

Die Zellen wurden wie angegeben für 20 h mit den Sojainhaltsstoffen Formononetin, Biochanin A, Genistein und Daidzein stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Die NO Produktion wurde wie unter Material und Methoden angegeben quantifiziert und auf die der Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. ns = nicht signifikant, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

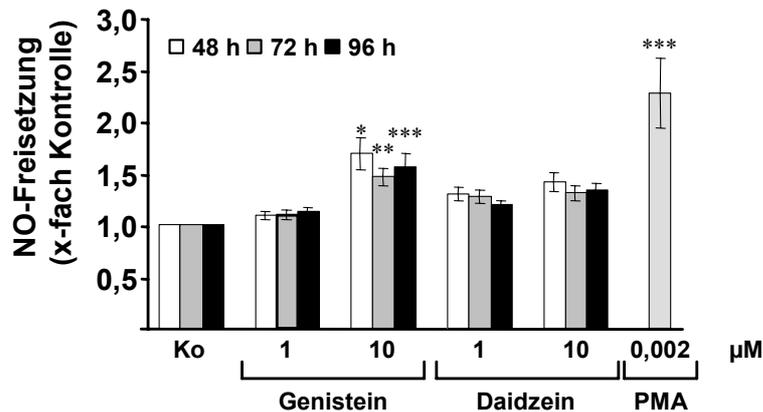


Abb. 25b: Genistein erhöht die eNOS vermittelte NO Produktion in EA.hy926 Zellen nach 48-96 h.

Die Zellen wurden wie angegeben für 48-96 h mit Genistein und Daidzein stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Die NO Produktion wurde wie unter Material und Methoden angegeben quantifiziert und auf die der Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus sechs unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

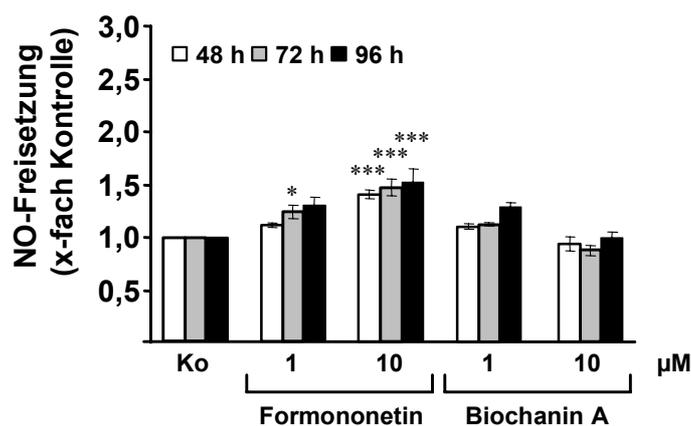


Abb. 25c: Formononetin erhöht nach 48-96 h die eNOS vermittelte NO Produktion in EA.hy926 Zellen.

Die Zellen wurden wie angegeben für 48h h mit Formononetin und Daidzein stimuliert. Die NO Produktion wurde wie unter Material und Methoden angegeben quantifiziert und auf die unbehandelten Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni)

Da die NO Freisetzung den entscheidenden Endpunkt der Isoflavonwirkung darstellt, wurden diese Experimente an HUVEC als einem physiologischeren Zellmodell verifiziert. Der Effekt von Genistein auf die NO Produktion war noch erkennbar, bei diesen Zellen jedoch so gering ausgeprägt und darüber hinaus schwankend, daß keine Signifikanz erreicht werden konnte (**Abb. 25d**). Die erhöhte NO Produktion durch Genistein stimulierte Zellen konnte nicht durch den Estrogen Rezeptor (ER) Antagonisten ICI 182,780 unterdrückt werden (**Abb. 25e**),

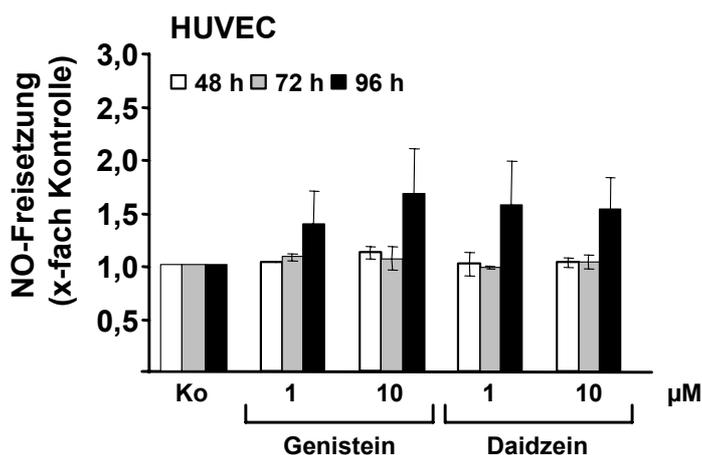


Abb. 25d: Genistein und Daidzein scheinen nach 96 h die eNOS vermittelte NO Produktion in HUVEC, wenn auch nicht signifikant, zu erhöhen.

Die Zellen wurden wie angegeben für 48-96 h mit Genistein und Daidzein stimuliert. Die NO Produktion wurde wie unter Material und Methoden angegeben quantifiziert und auf die der Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus sechs unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Unterschiede zu Kontrolle waren nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni)

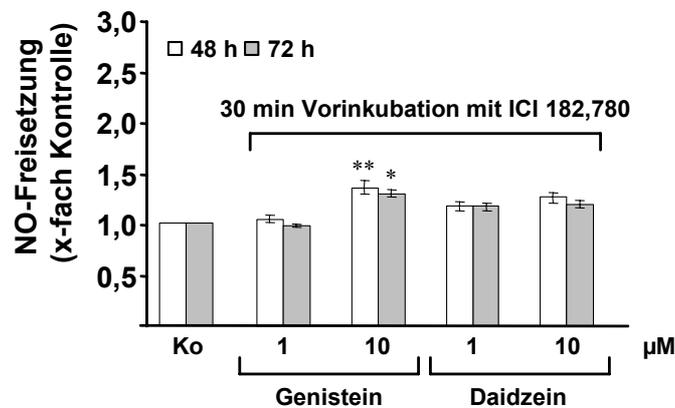


Abb. 25e: Die erhöhte Freisetzung von NO aus EA.hy926 Zellen unter dem Einfluß von Genistein ist durch ICI 182,780 nicht hemmbar.

Die Zellen wurden 30 min vor der Stimulation mit Genistein und Daidzein mit dem ER Antagonisten ICI 182,780 (10 µM) vorinkubiert. Danach wurde wie angegeben für 48-96 h mit Genistein und Daidzein stimuliert. Die NO Produktion wurde wie unter Material und Methoden angegeben quantifiziert und auf die der Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus acht unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, (ANOVA/Bonferroni)

1.4.2 17- β -Estradiol führt zu einer schwachen Steigerung der eNOS vermittelten NO-Produktion

Auch bei diesem wichtigen Experiment interessierten wir uns dafür, ob Estrogen in der Lage ist, den Sojaisoflavonen vergleichbare Effekte zu vermitteln. 17- β -Estradiol bewirkte im Vergleich zu den Isoflavonen jedoch nur in einer Konzentration von 10 nM und nur nach 72 h eine signifikant gesteigerte (1,3-fach) NO Produktion in EA.hy926 Zellen (**Abb. 26a**). In HUVEC war auch mit 17- β -Estradiol keine gesteigerte NO Freisetzung aus den Zellen zu detektieren (**Abb. 26b**).

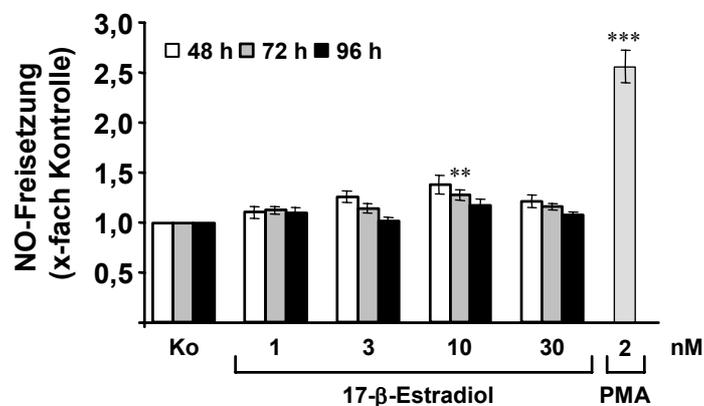


Abb. 26a: 17-β-Estradiol bewirkt nur eine marginale Erhöhung der eNOS vermittelten NO Produktion in EA.hy926 Zellen nach 48-96 h.

Die Zellen wurden wie angegeben für 48-96 h mit 17-β-Estradiol (1, 3, 10 und 30 nM) stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Die NO Produktion wurde wie unter Material und Methoden angegeben quantifiziert und auf die der Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus sechs unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

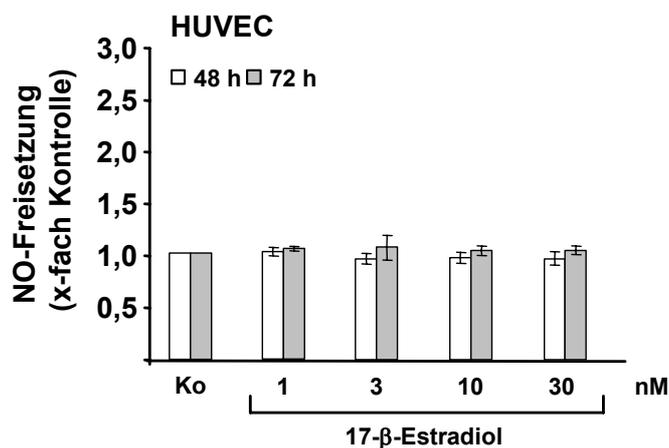


Abb. 26b: 17-β-Estradiol bewirkt keine Erhöhung der eNOS vermittelten NO Produktion in HUVEC Zellen nach 48 und 72 h.

Die Zellen wurden wie angegeben für 48 oder 72 h mit 17-β-Estradiol (1, 3, 10 und 30 nM) stimuliert. Die NO Produktion wurde wie unter Material und Methoden angegeben quantifiziert und auf die der Kontrollzellen normiert.

Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus sechs unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Unterschiede zur Kontrolle waren nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni)

1.5 Einflüsse auf die eNOS Proteinmenge

1.5.1 Sojaisoflavone haben keinen Einfluß auf die eNOS Proteinmenge.

Zur Untersuchung des Effektes der Sojaisoflavone auf die eNOS Proteinmenge in EA.hy926 Zellen wurde diese für 20 h mit den entsprechenden Isoflavonen stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Menge an eNOS Protein im Lysat mittels Western Blot bestimmt. Nach 20 h Inkubation der Zellen mit den Isoflavonen war keine Veränderung der eNOS Proteinmenge zu beobachten. Auch nach 48 und 72 h war kein signifikanter Anstieg zu detektieren. **Abb. 27** zeigt stellvertretend die 20 h Ergebnisse von Formononetin und Biochanin A.

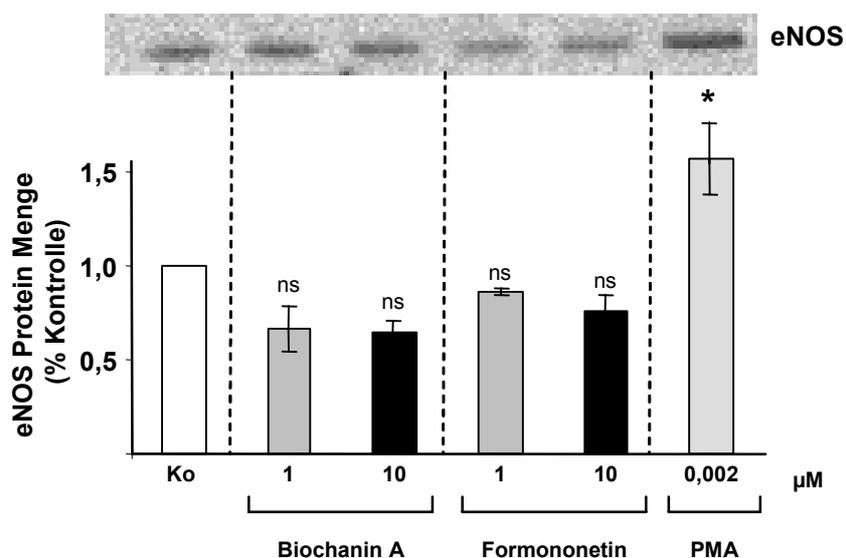


Abb. 27: Sojaisoflavone erhöhen die Expression des eNOS Proteins nicht.

EA.hy926 Zellen wurden wie angegeben mit Biochanin A und Formononetin für 20 h stimuliert. Das eNOS Protein wurde nach Zellyse mittels Western Blot nachgewiesen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot.

Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. * $P < 0,05$, ns = nicht signifikant (ANOVA/Bonferroni)

2 Einfluß von RWPE auf die eNOS

2.1 Einflüsse auf die eNOS Promotor Aktivität

Aus vorangegangenen Studien in unserem Labor war bekannt, daß Rotweinpolyphenolextrakte (RWPE) die Aktivität des humanen eNOS Promotors nach 12-24 h Inkubation in einem Luziferase-Reporter-Experiment signifikant erhöhen können⁶⁹. Da dieses Experiment eine schnelle Bearbeitung großer Probenmengen erlaubt, wurde es in der vorliegenden Studie als hauptsächliches Werkzeug verwendet, um einen Überblick über die Aktivität einer großen Anzahl verschiedener Weinextrakte zu gewinnen.

2.1.1 Einfluß von RWPE auf die eNOS Promotor Aktivität in Abhängigkeit von Anbaugebiet und Rebsorte

Um einen Überblick über den Einfluß von Anbaugebiet und Rebsorte auf die Fähigkeit der Rotweinpolyphenolextrakte, die eNOS Promotor Aktivität zu verstärken, zu erlangen, wurden von Herrn Dr. R. Samtleben in unserer Arbeitsgruppe Rotweinpolyphenolextrakte (RWPE) aus einer großen Anzahl (ca. 180) verschiedenster Rotweine gewonnen. EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden für 20 h mit diesen Extrakten behandelt und die Luziferaseaktivität in diesen Zellen bestimmt.

Alle an diesen Zellen getesteten RWPE waren in der Lage, die eNOS Promotor Aktivität deutlich und signifikant zu erhöhen. Das Ausmaß der Erhöhung war jedoch, in Abhängigkeit von der Rebsorte, unterschiedlich. Die stärksten Anstiege waren nach der Behandlung mit RWPE aus Merlot Weinen zu verzeichnen (bis auf das 6,1-fache im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen). Darauf folgten Cabernet Sauvignon (bis zu 4,9-fache Erhöhung), Syrah (4-fach) und Pinot Noir (4-fach). Mit anderen Rebsorten konnte ebenfalls eine Erhöhung, jedoch um maximal 2- bis 3,5-fach im Vergleich zu Kontrollzellen erreicht werden (siehe **Abb. 28** und **Tabelle 1-6**). Interessanterweise gab es auch Unterschiede von Anbaugebiet zu Anbaugebiet: Weine aus Frankreich waren bei allen Rebsorten im Vergleich zu anderen Anbaugebieten aktiver. Weine aus Deutschland, USA, Spanien, Australien und Südafrika dagegen verursachten überwiegend geringere Effekte. Getestete Weißweinxtrakte (WWPE) aus Chardonnay Trauben verursachten, in der gleichen Konzentration wie Rotweinxtrakte verabreicht, ebenfalls deutliche Anstiege in der eNOS Promotor Aktivität (um das 3-fache). Ein Extrakt aus einem deutschen Kerner blieb hingegen wirkungslos.

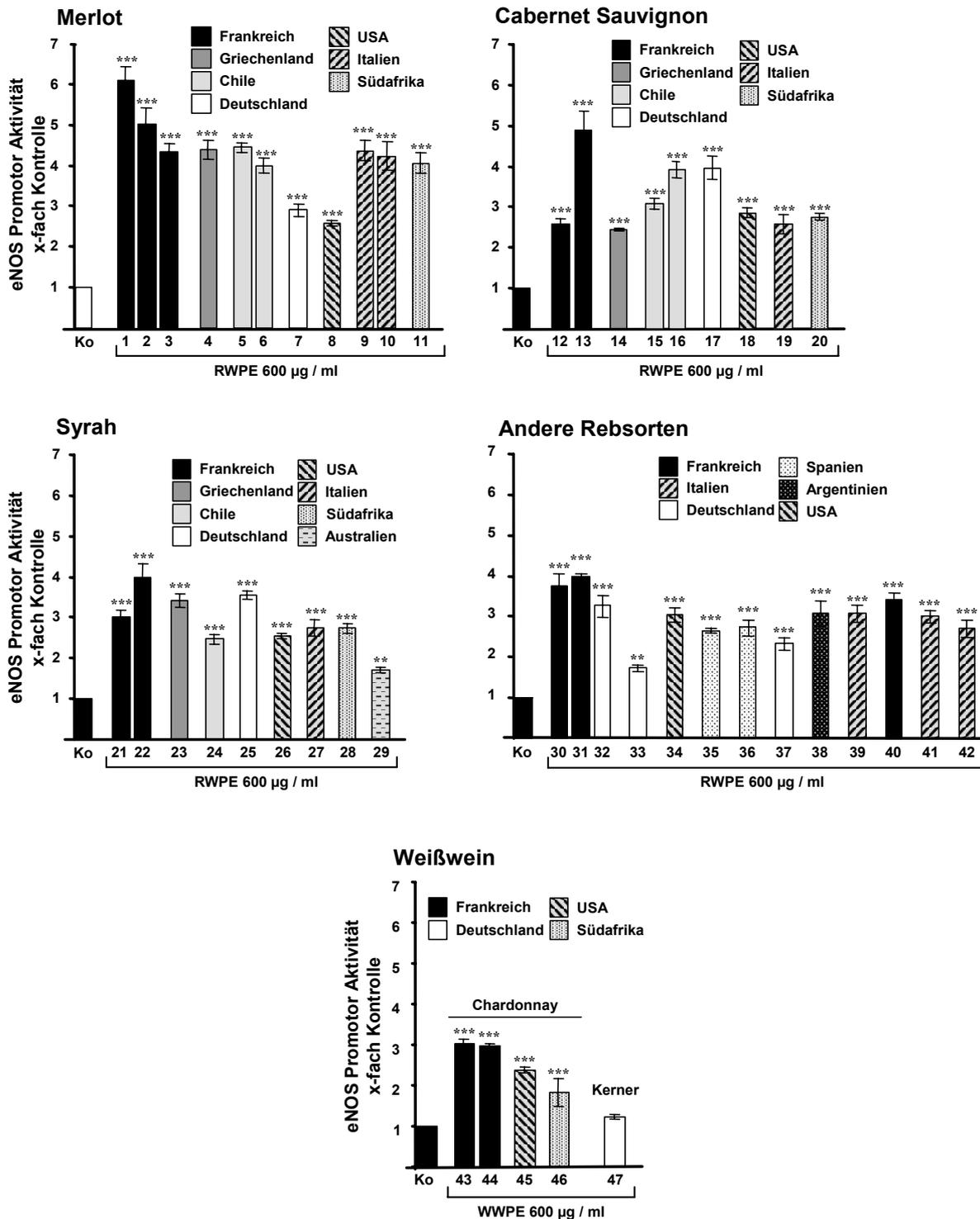


Abb. 28: Rotweinpolyphenolextrakte (RWPE) erhöhen die Aktivität des humanen eNOS Promotors abhängig von Anbaugbiet und Rebsorte.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden für 20 h einer Stimulation mit RWPE (600 µg/ml) aus verschiedenen Weinen unterzogen. Die resultierende Luziferase Aktivität wurde bestimmt und auf die in unbehandelten Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Abb. zeigt eine Auswahl der getesteten Weine im Überblick. Die Nummern geben die Weinnummern aus den Tabellen in „Material und Methoden“ wieder. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

Tabelle 1: RWPE aus Merlot Weinen erhöhen die eNOS Promotor Aktivität.

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft	x-fach Kontrolle	P
1	Palet d'Or	Merlot	2002	Frankreich	6,10 ± 0,31	***
2	Rothschild Merlot	Merlot	2002	Frankreich	5,03 ± 0,40	***
3	Domaine de l'Arjolle	Merlot	2001	Frankreich	4,36 ± 0,21	***
50	Jean Demont	Merlot	2002	Frankreich	4,21 ± 0,10	***
51	Collection de Chantré	Merlot	2001	Frankreich	3,63 ± 0,26	***
4	Chateau Julia	Merlot	2001	Griechenland	4,40 ± 0,23	***
52	Nico Lazaridi	Merlot	2001	Griechenland	3,39 ± 0,20	***
5	UNDURRAGA	Merlot	2001	Chile	4,45 ± 0,12	***
6	Gato Negro	Merlot	2002	Chile	4,00 ± 0,19	***
53	Valle Central	Merlot	2002	Chile	3,60 ± 0,08	***
54	Santa Carolina	Merlot	2002	Chile	3,14 ± 0,10	***
7	WMF Untertürkheim	Merlot	2001	Deutschland	2,90 ± 0,16	***
55	Rappenhof	Merlot	2001	Deutschland	3,22 ± 0,33	***
8	Beringer	Merlot	2000	USA	2,58 ± 0,06	***
56	E. J. Gallo	Merlot	2000	USA	2,68 ± 0,02	***
9	Trentino Merlot	Merlot	2001	Italien	4,36 ± 0,25	***
10	Merlot del Veneto	Merlot	2002	Italien	4,23 ± 0,35	***
58	Merlot del Veneto, Landozzi	Merlot	?	Italien	3,70 ± 0,15	***
59	Riunite	Merlot	2002	Italien	2,96 ± 0,26	***
11	Golden Kaan	Merlot	2002	Südafrika	4,10 ± 0,24	***
61	Meinert	Merlot	2001	Südafrika	4,18 ± 0,20	***
62	KWV	Merlot	2001	Südafrika	2,88 ± 0,21	***
57	Medanos	Merlot	2000	Uruguay	2,98 ± 0,08	***
60	Stierglut	Merlot	2001	Rumänien	4,51 ± 0,49	***

Tabelle 2: RWPE aus Cabernet Sauvignon Weinen erhöhen die eNOS Promotor Aktivität.

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft	x-fach Kontrolle	P
12	Domaine de l'Arjolle	C. Sauvignon	2001	Frankreich	2,57 ± 0,15	***
13	Collection de Chantré	C. Sauvignon	2001	Frankreich	4,90 ± 0,47	***
63	Rothschild C. S.	C. Sauvignon	2001	Frankreich	4,14 ± 0,23	***
64	Fortant de France	C. Sauvignon	2002	Frankreich	3,46 ± 0,11	***
14	Cavino C.S.	C. Sauvignon	1999	Griechenland	2,44 ± 0,04	***
15	UNDURRAGA	C. Sauvignon	2001	Chile	3,09 ± 0,14	***
16	Valle Central	C. Sauvignon Tinto	2002	Chile	3,91 ± 0,21	***
65	Tala Manca	C. Sauvignon	2002	Chile	3,28 ± 0,32	***
66	CALAMA	C. Sauvignon	2001	Chile	2,47 ± 0,10	***
17	Lergenmüller Select	C. Sauvignon	2001	Deutschland	3,97 ± 0,27	***
67	Rappenhof	C. Sauvignon	2001	Deutschland	3,56 ± 0,42	***
18	John Carson, California	C. Sauvignon	2001	USA	2,86 ± 0,11	***
68	Burlwood	C. Sauvignon	2001	USA	2,77 ± 0,07	***
69	E. J. Gallo Turning Leaf	C. Sauvignon	2001	USA	2,30 ± 0,25	***
19	Trentino Cabernet	C. Sauvignon	2000	Italien	2,58 ± 0,24	***
20	Zonnebloem	C. Sauvignon	2000	Südafrika	2,76 ± 0,08	***
70	Medanos	C. Sauvignon	1999	Uruguay	3,30 ± 0,16	***

Tabelle 3: RWPE aus Syrah Weinen erhöhen die eNOS Promotor Aktivität.

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft	x-fach Kontrolle	P
21	Blanchet Syrah	Syrah	?	Frankreich	3,03 ± 0,14	***
22	Mommessin Baton de Réglisse	Syrah	2002	Frankreich	3,98 ± 0,34	***
49	Domaine de l'Arjolle Paradoxe	Syrah/ Grenache	2000	Frankreich	2,80 ± 0,34	***
71	Dallmayr Selection Moulin de Gassac	Syrah	2000	Frankreich	4,19 ± 0,22	***
72	J. P. Chenet	Syrah	2001	Frankreich	3,82 ± 0,32	***
23	Thrakis	Syrah	1999	Griechenland	3,43 ± 0,17	***
73	Tsantali	Syrah	2000	Griechenland	2,45 ± 0,14	***
24	Concha y Torro	Syrah	2001	Chile	2,46 ± 0,11	***
25	Knipser Syrah	Syrah	2001	Deutschland	3,55 ± 0,11	***
26	Gallo Shiraz	Syrah	2001	USA	2,54 ± 0,07	***
27	Mandrarossa Syrah	Syrah	2002	Italien	2,75 ± 0,21	***
28	KWV	Syrah	2001	Südafrika	2,73 ± 0,11	***
77	Durbanville Hills	Syrah	2000	Südafrika	3,26 ± 0,23	***
29	Kangaroo Ridge	Syrah	2001	Australien	1,72 ± 0,07	**
75	Quay Landing	Syrah	2002	Australien	2,88 ± 0,20	***
76	Broom Estate	Syrah	2001	Australien	1,95 ± 0,18	*
74	Laranos Cosecha	Syrah	2002	Argentinien	2,99 ± 0,22	***

Tabelle 4: RWPE aus verschiedenen Rotweinen erhöhen die eNOS Promotor Aktivität.

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft	x-fach Kontrolle	P
33	Kron, Abenheimer Klausenberg	Saint Laurent	2002	Deutschland	1,74 ± 0,07	**
34	E. Gallo Siera Valley	Zinfandel	2000	USA	3,05 ± 0,16	***
83	John Carson	Zinfandel	2001	USA	2,68 ± 0,32	***
35	Mederano Tinto	Tinto	2000	Spanien	2,66 ± 0,05	***
36	Vina Enterizo	Tempranillo	2002	Spanien	2,74 ± 0,19	***
84	Castillo Murviedro	Tempranillo	2000	Spanien	3,32 ± 0,23	***
85	Reinares	Tempranillo	2002	Spanien	2,10 ± 0,14	***
37	Abenheimer Klausenberg	Portugieser	2000	Deutschland	2,33 ± 0,16	***
38	Terrazas Malbec	Malbec	2002	Argentinien	3,09 ± 0,31	***
39	Kirchbichler Südtiroler Edelvernatsch	Trollinger	2001	Italien	3,07 ± 0,20	***
86	Manincor, Kalterersee	Trollinger	2001	Italien	3,21 ± 0,24	***
87	Mundelsheimer Schalkstein	Trollinger	2002	Deutschland	2,11 ± 0,08	***
40	Grand Sud	Grenache	2003	Frankreich	3,43 ± 0,17	***
41	Alto Adige Lagrein	Lagrein	2002	Italien	3,01 ± 0,15	***
42	Donne del Sole	Nero d'Avola Merlot	2002	Italien/Sizilien	2,71 ± 0,20	***
82	Piccini	Nero d'Avola	2002	Italien/Sizilien	3,14 ± 0,31	***
48	Selzener Rotwein Klostermühlenhof	Dornfelder,	1999/ 2000	Deutschland	2,92 ± 0,06	***
88	Rosenwalzer Kadarka	Kadarka	2002	Jugoslawien	3,46 ± 0,17	***

Tabelle 5: RWPE aus Pinot Noir/Spätburgunder Weinen erhöhen die eNOS Promotor Aktivität.

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft	x-fach Kontrolle	P
30	Roux Père & Fils	Pinot Noir	2002	Frankreich	3,75 ± 0,30	***
31	Dopff + Irion	Pinot Noir	2000	Frankreich	3,98 ± 0,07	***
78	Laroche	Pinot Noir	2001	Frankreich	3,75 ± 0,30	***
79	Weinmanufaktur Krems	Pinot Noir	2002	Österreich	3,34 ± 0,38	***
32	Lorch	Spätburgunder	2001	Deutschland	3,28 ± 0,26	***
80	Kron, Abenheimer Klausenberg	Spätburgunder	2002	Deutschland	2,59 ± 0,13	***
81	Kraichtaler Mannaberg	Spätburgunder	2002	Deutschland	3,52 ± 0,25	***

Tabelle 6: WWPE aus verschiedenen Weißweinen erhöhen die eNOS Promotor Aktivität.

#	Wein	Rebsorte	Jahrg.	Herkunft	x-fach Kontrolle	P
43	Fortant	Chardonay	2002	Frankreich	3,04 ± 0,11	***
44	Mommessin Nid d`Abeille	Chardonay	2000	Frankreich	2,98 ± 0,05	***
45	E+J Gallo	Chardonay	2002	USA	2,38 ± 0,07	***
46	KWV	Chardonay	2003	Südafrika	1,83 ± 0,35	***
47	Kron	Kerner	2001	Deutschland	1,24 ± 0,05	

Die Tabellen zeigen eine Auswahl der Ergebnisse mit verschiedenen RWPE / WWPE.

Die Zellen wurde mit 600 µg/ml RWPE 20 h stimuliert. Die Zahlenwerte geben die Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten wieder. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni)

2.1.2 Faßmaterialien bei der Lagerung zeigen einen Einfluß auf die Aktivierung des eNOS Promotors durch RWPE

Bei der Reifung der Weine, speziell in neuen Eichenfässern, werden vielfältige Substanzen aus dem Faßmaterial herausgelöst. Dieser Vorgang, der teurem Rotwein die typische „Barrique“-Note verleiht, könnte zusätzliche Aktivität in den so ausgebauten Wein bringen. Wir haben deshalb drei Extrakte aus Dornfelder Weinen gewonnen, die vom selben Winzer stammen. Dabei wurde der gleiche Ausgangswein einmal im Stahltank, einmal in Holzfässern und einmal „en Barrique“ ausgebaut. Die Reifung im Eichenholzfaß verursachte entgegen den Erwartungen jedoch keine Zunahme, sondern eine Abnahme (von 2,9-fach auf 1,8-fach) in der Fähigkeit des RWPE den humanen eNOS Promotor zu aktivieren (**Abb. 29**). Diese Daten bestätigen ältere Beobachtungen an ECV Zellen⁸⁷.

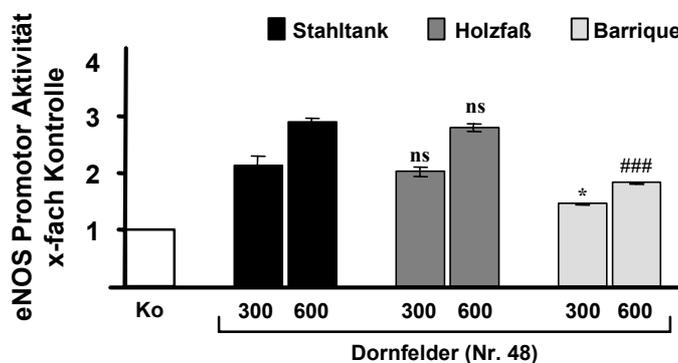


Abb. 29: Lagerung in Eichenholzfassern verstärkt den Einfluß von RWPE auf die Aktivität des humanen eNOS Promotors nicht.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden für 20 h einer Stimulation mit RWPE (300 und 600 µg / ml) unterzogen. Die Ausgangsweine waren im Stahltank, in Holzfassern oder „en Barrique“ ausgebaut. Die resultierende Luziferase Aktivität wurde bestimmt, auf die in unbehandelten Kontrollzellen (Ko) bezogen und als Maß für die Aktivität des eNOS Promotors betrachtet. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zu Stahltank Wein 300µg / ml. * P<0,05 (t-Test). Rauten markieren signifikante Unterschiede im Vergleich zu Stahltank Wein 600µg / ml. ### P<0,001 (t-Test).

2.1.3 Die Aktivität von Rotweinpolyphenolextrakten kann durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln vermindert werden

Die von Herrn Dr. Samtleben gewonnenen RWPE lassen sich durch Ausschütteln mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Diethylether oder Ethylacetat) weiter fraktionieren. Die organischen Fraktionen waren hochgradig hygroskopisch. Darüber hinaus waren sie in allen zellverträglichen Lösungsmitteln nicht klar löslich. Aus diesen Gründen standen diese Fraktionen leider zu direkten Untersuchungen nicht zur Verfügung. Wenn allerdings die aktiven Substanzen in der Ether- bzw. Ethylacetat-Phase vorliegen, sollte der Rückstand entsprechend inaktiv sein. Tatsächlich ließ sich durch die entsprechende Behandlung die Aktivität der Extrakte wesentlich, wenn auch nicht ganz auf das Kontrollniveau reduzieren (von einer 5,8-fachen auf eine ca. 2-fache Erhöhung). Durch Rekombination des Rückstandes mit dem entsprechenden Extrakt konnte die Aktivität, wenn auch nicht vollständig, wiedererhalten werden (ca. 4-fache Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle) (**Abb. 30**).

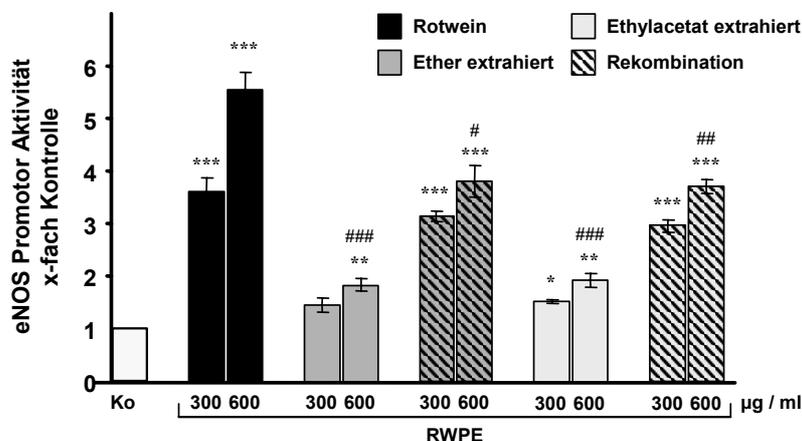


Abb. 30: Die Aktivität der RWPE kann durch Ausschütteln mit Diethylether oder Ethylacetat deutlich verringert werden. EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden einer Stimulation mit RWPE (300 und 600 µg/ml) aus Wein Nr. 1 (Merlot, siehe Tabelle) unterzogen. Der gewonnene Polyphenolextrakt war entweder unbehandelt oder wurde vor der Lyophilisation mit Diethylether bzw. Ethylacetat ausgeschüttelt. Zur Rekombination wurden vor der Lyophilisation Rückstand und organische Phase wieder vereinigt. Nach 20 h wurde die resultierende Luziferase Aktivität bestimmt und auf die unbehandelten Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni). Rauten zeigen signifikante Unterschiede zu unbehandeltem RWPE, 600 µg / ml, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ (t-Test).

2.1.4 Traubensaftpolyphenolextrakte haben weniger Einfluß auf die eNOS Promotor Aktivität als RWPE

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob die alkoholische Gärung nötig ist, um die wirksamen Inhaltsstoffe des Rotweines zu erzeugen, wurden aus selbst hergestellten Traubensäften (siehe *Material und Methoden*) ebenfalls Polyphenolextrakte präpariert. Die Trauben wurden von den entsprechenden Winzern bezogen und waren in Rebsorte und Herkunft mit den entsprechenden Weinen identisch. Im Vergleich mit den Weinen konnten die aus den unvergorenen Trauben gewonnenen Polyphenolextrakte (TSPE) die Aktivität des eNOS Promotors deutlich weniger erhöhen (z.B. Merlot: 2,3-fache Erhöhung für den Saft, 4,4-fache für Wein). Allerdings waren die TSPE nicht gänzlich inaktiv (siehe **Abb. 31**).

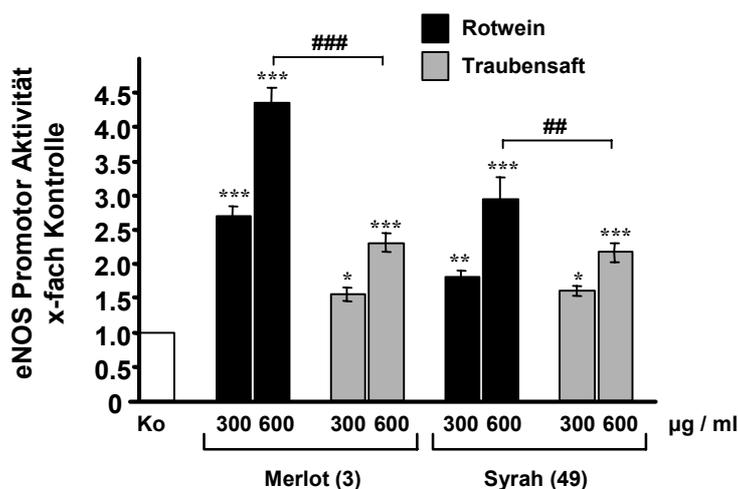


Abb. 31: TSPE erhöhen die eNOS Promotor Aktivität nicht im gleichen Maß wie RWPE.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden einer Stimulation mit Polyphenolextrakten (300 und 600 µg/ml) aus Rotwein oder roten Weintrauben unterzogen. Nach 20 h wurde die resultierende Luziferase Aktivität bestimmt und auf die unbehandelten Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni). Rauten zeigen signifikante Unterschiede zwischen Wein und Saft für 600 µg / ml, ## P<0,01, ### P<0,001 (t-Test).

2.1.5 Blüten- und Fruchtpolyphenolextrakte haben überwiegend keinen Einfluß auf die eNOS Promotor Aktivität

Viele Blüten und Beeren enthalten Polyphenole. Diese sind, wie beim Wein auch, maßgeblich an der Färbung beteiligt. Der Vorteil an Polyphenolextrakten aus Blüten und Beeren besteht aus deren im Vergleich zu Rotweinextrakten wesentlich einfacheren Zusammensetzung. Eine Untersuchung verschiedener Beerenextrakte an ECV304 Zellen wurde bereits von Herrn Dr. J. Leikert in seiner Arbeit beschrieben⁸⁷. Dieser Ansatz wurde an EA.hy926 Zellen überprüft und durch die Untersuchung mehrerer Blütenfarbstoffe ergänzt. Die Polyphenolextrakte wurden wiederum von Herrn Dr. R. Samtleben vergleichbar den RWPE hergestellt. Es zeigte sich, daß viele dieser Extrakte in höheren Konzentrationen (>300 µg / ml) zytotoxische Eigenschaften haben. Daraus resultierte auch die beobachtete Hemmung der eNOS Promotor Aktivität. Im speziellen waren das Blütenextrakte aus *Malva arborea* und *Paeonia officinalis*, sowie Fruchtextrakte aus Roter Johannisbeere, Schwarzer Johannisbeere und Preiselbeere. Von allen Extrakten zeigten nur Rote Johannisbeere, Preiselbeere und Sauerkirsche einen nennenswerten Einfluß auf die Promotoraktivität des menschlichen eNOS-Genes. Die größte Erhöhung der Promotoraktivität auf das 2,2-fache der Aktivität in Kontrollzellen wurde durch 300 µg / ml Preiselbeerextrakt erreicht. Dieser Effekt reichte jedoch bei weitem nicht an die Potenz der Weineextrakte mit bis zu 6-fachen Erhöhungen heran (siehe **Abb. 32a und b**).

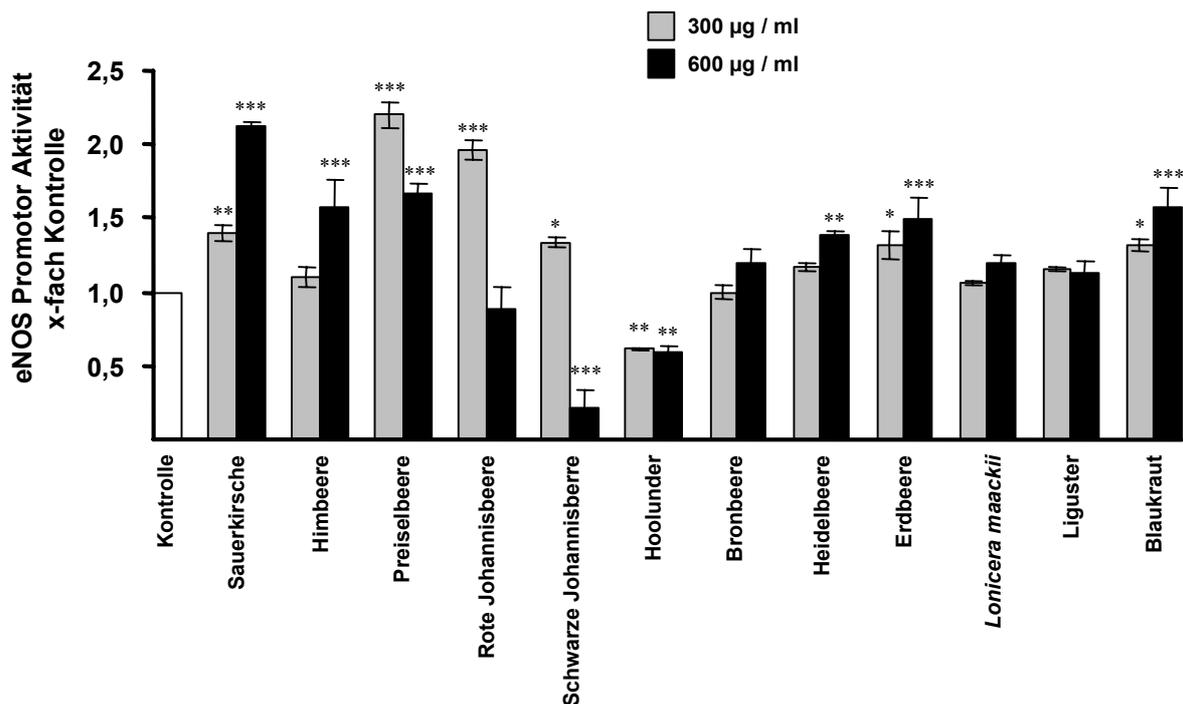


Abb. 32a: Fruchtsaft-Polyphenolextrakte haben nur einen geringen Einfluß auf die eNOS Promotor Aktivität.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden mit Polyphenolextrakten (300 und 600 µg/ml) aus verschiedenen Fruchtsäften 20 h stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Luziferase Aktivität bestimmt und auf die unbehandelte Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni).

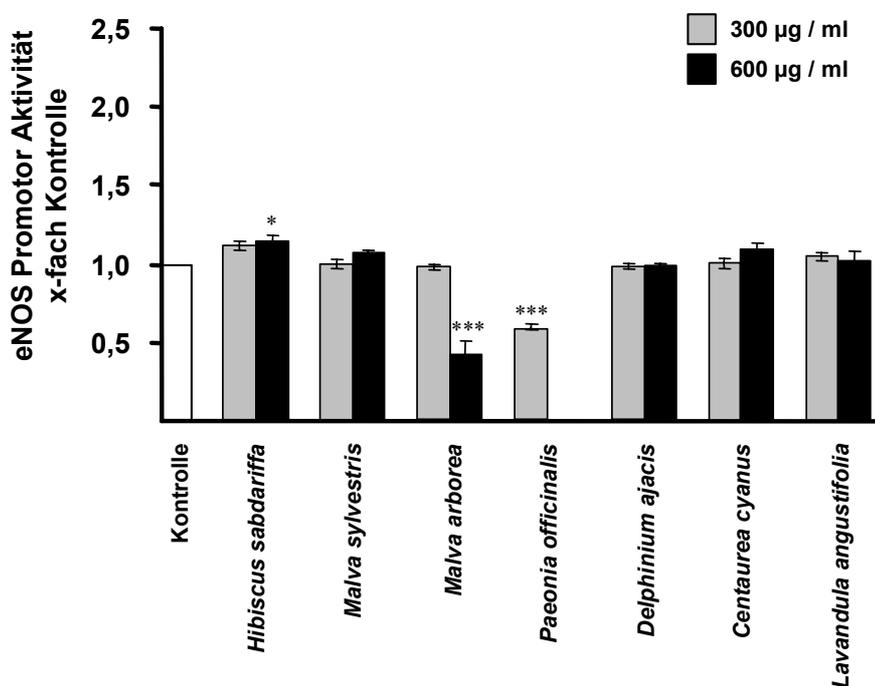


Abb. 32b: Blüten-Polyphenolextrakte haben nur einen geringen Einfluß auf die eNOS Promotor Aktivität.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden mit Polyphenolextrakten (300 und 600 µg/ml) aus verschiedenen Blüten 20 h stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Luziferase Aktivität bestimmt und auf die unbehandelte Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni).

2.1.6 Einfluß von Resveratrol, Resveratrolderivaten und polyphenolischen Reinsubstanzen auf die eNOS Promotor Aktivität

Resveratrol zeigte einen deutlichen Einfluß auf die Aktivität des eNOS Promotors mit einem Maximum bei einer Konzentration von 20 µM. Konzentrationen über 100 µM waren zytotoxisch und wurden nicht weiter untersucht. Unter Resveratrolbehandlung stieg die Promotor Aktivität auf das 3-fache Niveau der Kontrollen an. Allerdings wurde durch keine Konzentration ein gleich starker Effekt wie durch RWPE erzielt (siehe **Abb. 33**).

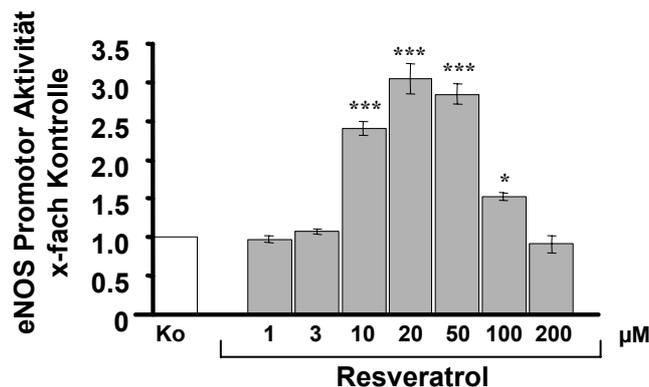


Abb. 33: Resveratrol erhöht die Aktivität des humanen eNOS Promotors.

EA.hy926-heNOS-Luc Zellen wurden mit Resveratrol in Konzentrationen von 1-200 µM, wie angegeben, für 20 h stimuliert. Konzentrationen über 100 µM waren zytotoxisch. Die Luziferase Aktivität wurde gemessen und auf die unbehandelten Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Balken zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle, * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni).

Rhapontin erhöhte die Aktivität des eNOS Promotors leicht (ca. 2-fach, Daten nicht gezeigt). Die Resveratrol-derivate Piceid, Astringin und Isorhapontin zeigten in den untersuchten Konzentrationen (1 und 10 µM) keinen Einfluß auf die Aktivität des eNOS Promotors.

Ebenso inaktiv waren die Pflanzensäuren Gallussäure, Vanillinsäure, Syringasäure, p-Cumarsäure, o-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure (1 und 10 µM).

2.2 Einflüsse auf die eNOS Enzym Aktivität

Wie bei den Sojaisoflavonen sollte auch bei den Rotweinextrakten sichergestellt werden, daß eine erhöhte Promotor Aktivität auch zu einer erhöhten eNOS Enzymaktivität führt. Es war für uns von Interesse, in welchem Verhältnis eine vermehrte Enzymaktivität der eNOS im Vergleich zur Promotoraktivierung steht. Es sollte auch überprüft werden, ob die im Luziferase Experiment gefundenen Unterschiede in der Aktivität verschiedener RWPE bei der Wirkung auf die Enzymaktivität im selben Verhältnis zueinander stehen. Die Aktivität des eNOS Enzyms wurde wieder durch die Messung des Umsatzes von [¹⁴C] markiertem Arginin zu Citrullin bestimmt (siehe auch *Material und Methoden*)

2.2.1 RWPE steigern die eNOS Enzym Aktivität

Der Einfluß von RWPE auf die Aktivität des humanen eNOS Enzyms korrelierte mit der Erhöhung in der Promotor Aktivität. Sechs ausgesuchte Wein Extrakte (vier Merlots und zwei Syrahs, davon ein wenig aktiver australischer Syrah) wurden im Arginin-Citrullin Experiment untersucht. Alle sechs Extrakte erhöhten die Aktivität des eNOS Enzyms signifikant. Die Merlot Extrakte bewirkten eine 3,6-fache Erhöhung wohingegen der schwächer aktive Syrah nur eine 2-fach erhöhte Enzymaktivität vermittelte. Absolut gesehen waren diese Effekte etwas niedriger als die im Luziferase Experiment ermittelten Effekte auf den eNOS Promotor. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Weinen waren zum Teil nicht ganz so stark ausgeprägt (etwa zwischen Nr. 3 und 8, siehe auch **Abb. 28**) wie erwartet (**Abb. 34**). Dennoch korrelieren die relativen Effekte im Überblick gut mit denen auf die Promotor Aktivität.

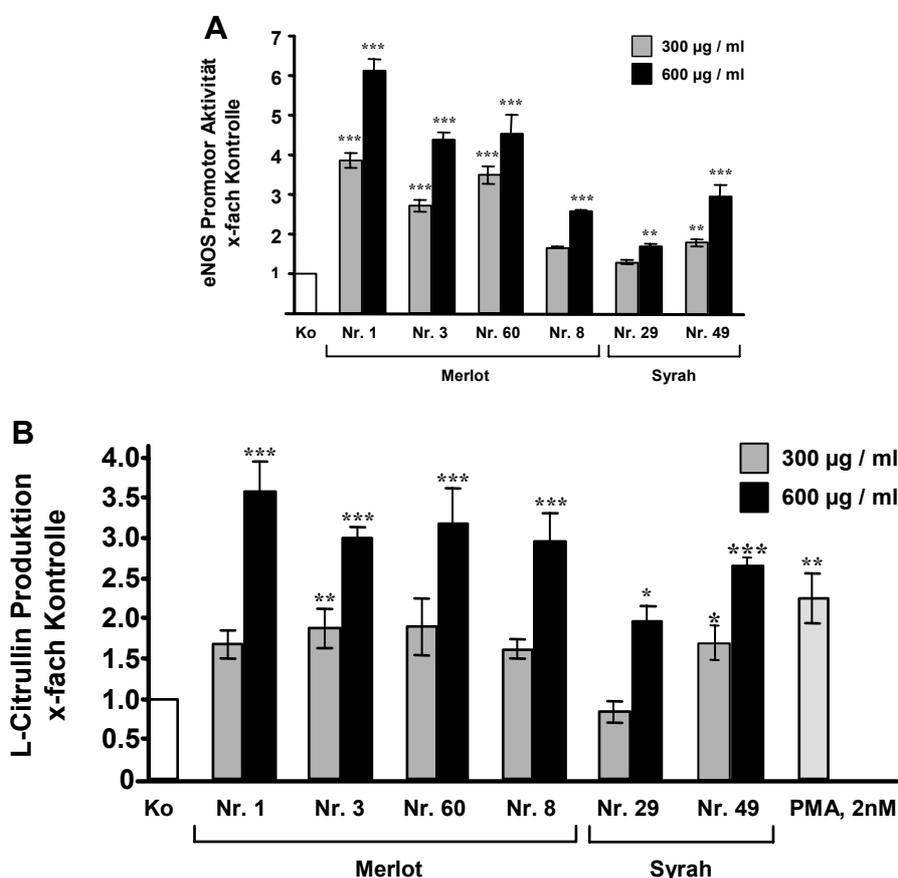


Abb. 34: Rotweinpolyphenolextrakte erhöhen die Umwandlung von [14 C]-L-Arginin zu [14 C]-L-Citrullin in Endothelzellen in Abhängigkeit der applizierten Konzentration.

EA.hy926 Zellen wurden mit RWPE, wie in der Abb. angegeben, für 20 h stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Der Versuch wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. (A) zeigt noch einmal die Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich. Die L-Citrullin Produktion wurde quantifiziert und auf die Citrullin Produktion un behandelter Kontrollzellen (Ko) bezogen (B). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni).

2.2.2 Die aktivitätssteigernde Wirkung der RWPE auf das eNOS Enzym wird durch Ausschütteln mit Diethylether nicht verringert.

Während das Ausschütteln der RWPE mit organischen Lösungsmitteln dazu führte, daß sie die Aktivität des Promotors nicht mehr im selben Maße erhöhen können, zeigte die weitere Fraktionierung keinen Einfluß auf die Aktivierung des eNOS Enzyms. Ausgeetherte RWPE (600µg / ml) erhöhen die eNOS Enzymaktivität im gleichen Maße, wie die Originalextrakte etwa um den Faktor 3,5 (**Abb. 35**).

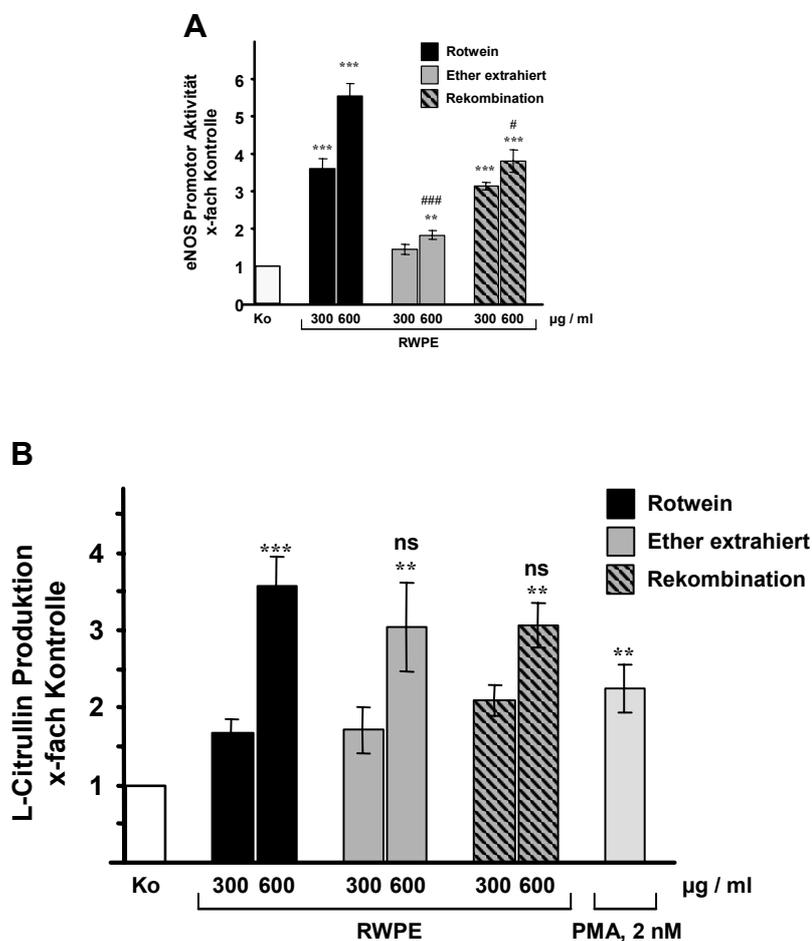


Abb. 35: Die Aktivität der RWPE auf die eNOS Enzymaktivität kann durch Ausschütteln mit Diethylether nicht verringert werden.

EA.hy926 Zellen wurden einer Stimulation mit RWPE (300 und 600 µg/ml) aus Wein Nr. 1 (Merlot, siehe Tabelle) unterzogen. Der gewonnene Polyphenolextrakt war entweder unbehandelt oder wurde vor der Lyophilisation mit Diethylether ausgeschüttelt. Zur Rekombination wurden vor der Lyophilisation Rückstand und organische Phase wieder vereinigt. Nach 20 h wurde die resultierende L-Citrullin Produktion der Zellen bestimmt und auf die unbehandelten Kontrollzellen (Ko) bezogen (**B**). (**A**) zeigt dazu noch einmal die Erhöhung der Promotoraktivität zum Vergleich. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte ± Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, ns = nicht signifikant im Vergleich zu unbehandeltem RWPE 600 µg / ml (t-Test).

2.2.3 TSPE erhöhen die eNOS Enzym Aktivität in geringerem Umfang als RWPE

TSPE zeigten im Luziferase Experiment eine vergleichsweise schwache Wirkung auf den eNOS Promotor. Die aus den Trauben gekelterten Weine dagegen vermittelten einen deutlich stärkeren Effekt. Dieser Unterschied war in Bezug auf die eNOS Enzym Aktivität immer noch signifikant, jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt (**Abb. 36**). Während Merlot Wein die Enzymaktivität etwa 3-fach verstärkte, bewirkte der Saft eine 2,5-fache Verstärkung (2,6-fach für Syrah Wein gegen 2,1-fach für Saft).

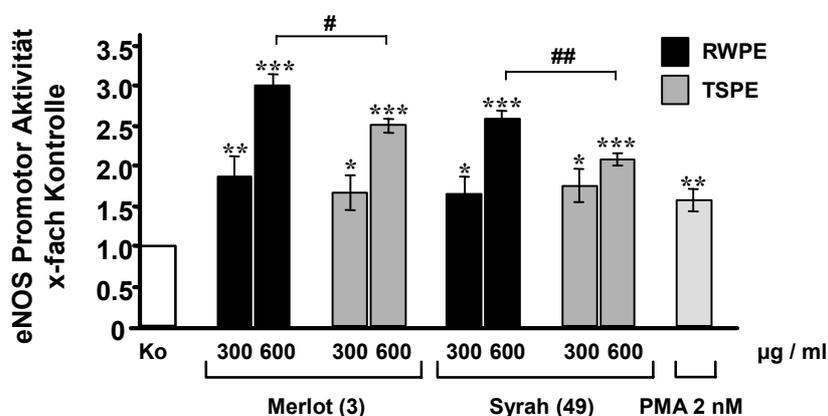


Abb. 36: TSPE erhöhen die Aktivität des eNOS Enzyms in geringerem Maße als RWPE.

EA.hy926 Zellen wurden mit TSPE oder RWPE wie in der Abb. angegeben für 20 h stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Der Versuch wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die L-Citrullin Produktion wurde quantifiziert und auf die Produktion un behandelter Kontrollzellen (Ko) bezogen.

Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni). Rauten zeigen signifikante Unterschiede zwischen Wein und Saft für 600 $\mu\text{g} / \text{ml}$, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ (t-Test).

2.2.4 Einfluß von Resveratrol und anderen Reinsubstanzen auf die eNOS Enzym Aktivität

Resveratrol zeigte einen konzentrationsabhängigen Einfluß auf die Aktivität des eNOS Enzyms. Ab 20 μM verursachte es einen signifikanten Anstieg mit einem Maximum bei 50 μM (3,4-fache Erhöhung). Die Tendenz zu einer ansteigenden Enzymaktivität zeigte sich bereits ab 10 μM , war jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 37**).

Die stellvertretend für die anderen im Rotwein enthaltenen Substanzgruppen getesteten Verbindungen, das Flavonol Quercetin und das Anthocyanidin Delphinidin, zeigten keinen Effekt in den verwendeten Konzentrationen. In Anlehnung an ihre Konzentration im Rotwein⁹⁰⁻⁹³ wurden sie jeweils 1 und 10 μM eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

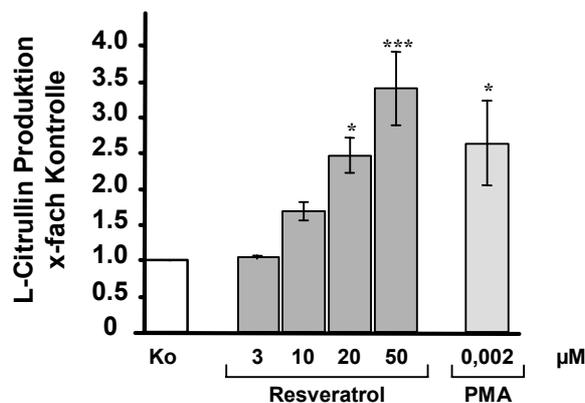


Abb. 37: Resveratrol erhöht die eNOS Enzym Aktivität.

EA.hy926 Zellen wurden mit steigenden Resveratrolkonzentrationen (3-50 μM) für 20 h stimuliert. PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Der Versuch wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die L-Citrullin Produktion wurde quantifiziert und auf die Produktion unbehandelter Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA/Bonferroni).

2.2.5 Zeitabhängigkeit der Enzymaktivierung

Ursache für eine erhöhte Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin können

- erhöhte eNOS Enzymmengen oder
- erhöhte enzymatische Aktivität der vorhandenen Enzymmenge sein.

Beide Effekte können sich überlagern. Um abschätzen zu können, ob bei der Wirkung der RWPE akute Enzym aktivierende Effekte beteiligt sind, wurde ein Zeitverlauf der Enzymaktivität vermessen. Effekte, die allein auf eine höhere Aktivität vorhandener Enzymmengen zurückzuführen sind, treten meist sehr schnell ein⁸⁸. Transkriptionelle Vorgänge dagegen benötigen mehrere Stunden. Nach Stimulation mit RWPE stieg die eNOS Protein Aktivität zeitabhängig an und erreichte ihr Maximum nach 12 h Stimulation.

Um noch zu prüfen, ob die beobachteten Effekte eNOS bedingt sind, wurde der irreversible eNOS Hemmer N^G-amino-L-arginin (NAA) eingesetzt. Die erhöhte Aktivität der eNOS wurde durch eine

viertelstündige NAA-Vorbehandlung (200 μ M) vor Zugabe des radioaktiven L-Arginins vollständig, sogar leicht unter das Niveau un behandelter Kontrollzellen gehemmt (**Abb. 38**).

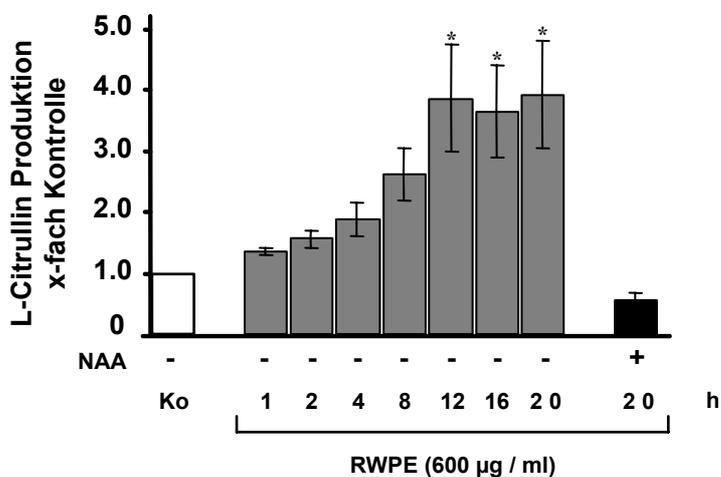


Abb. 38: Der erhöhte Umsatz von L-Arginin zu L-Citrullin ist zeit- und eNOS-abhängig.

EA.hy926 Zellen wurden mit 600 μ g / ml RWPE (Merlot Nr. 3) 1 bis 20 h behandelt. Der irreversible eNOS-Hemmer N^G-amino-L-arginin (NAA) wurde in einer Konzentration von 200 μ M 15 min vor Zugabe des radioaktiven Arginins appliziert. Der Versuch wurde wie in *Material und Methoden* beschrieben durchgeführt. Die L-Citrullin Produktion wurde quantifiziert und auf die Produktion un behandelter Kontrollzellen (Ko) bezogen. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Sterne markieren signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle, * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 (ANOVA/Bonferroni).

2.3 Einflüsse auf die eNOS Proteinexpression

2.3.1 RWPE und TSPE steigern die eNOS Enzymexpression

Um zu zeigen, daß unter dem Einfluß der Rotweinpolyphenole eine vermehrte Expression des eNOS Proteins die Folge erhöhter Promotor Aktivität und Hauptursache des vermehrten Umsatzes von Arginin zu Citrullin ist, wurde der Einfluß zweier untersuchter RWPE auf die Menge des eNOS Proteins in behandelten Zellen mittels Western Blot bestimmt. Der Effekt von TPE sollte wiederum mit dem der RWPE verglichen werden. Es stellte sich heraus, daß TSPE die eNOS Proteinmenge in vergleichbarem Maß wie RWPE dosisabhängig erhöhen konnten. **Abb. 39** zeigt einen repräsentativen Blot.

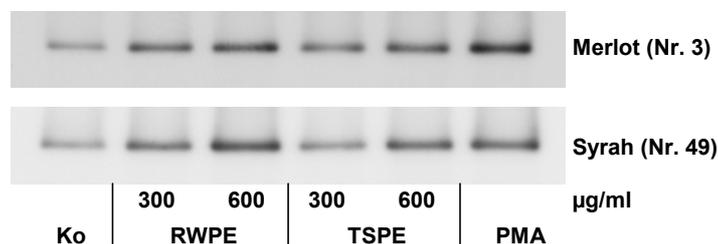


Abb. 39: RWPE und TSPE verursachen einen Anstieg der eNOS Proteinmenge.

EA.hy926 Zellen wurden mit 300 und 600 µg / ml RWPE bzw. TSPE 20 h lang inkubiert oder blieben unbehandelt (Ko). PMA (2 nM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Danach wurden die Zellen lysiert und der Western Blot wie in *Material und Methoden* beschrieben durchgeführt. Die Abb. zeigt einen repräsentativen Blot aus drei unabhängigen Experimenten in Triplikaten.

2.4 Einflüsse auf die eNOS vermittelte NO Produktion

2.4.1 Einfluß von RWPE auf die eNOS vermittelte NO Produktion

Die Messung des unter dem Einfluß von RWPE freigesetzten NO erwies sich als schwierig. Die Meßwerte aus Überständen RWPE stimulierter Zellen schwankten meist stark. Bei manchen Extrakten war überhaupt keine Erhöhung oder gar eine Verminderung der NO Freisetzung in den Zellüberstand zu sehen. Grund dafür sind Eigenfluoreszenzen der RWPE und ihre Radikalfängereigenschaften (siehe auch Diskussion). Diese Eigenschaften variieren von Extrakt zu Extrakt und sind für die uneinheitlichen Ergebnisse verantwortlich.

2.4.2 Einfluß von Resveratrol und anderen polyphenolischen Reinsubstanzen auf die eNOS vermittelte NO Produktion

Bekannte Einzelverbindungen aus Rotwein wurden als Reinsubstanzen gekauft und ihr Einfluß auf die NO Produktion von EA.hy926 Zellen getestet. Entsprechend der Konzentrationen, in denen sie in RWPE anzunehmen sind, wurden sie jeweils 1 und 10 µM eingesetzt. (in Anlehnung an⁸⁹⁻⁹³)

Weder Resveratrol, noch dessen Derivate Piceid, Astringin, Rhapontin und Isorhapontin erhöhten in diesen Konzentrationen die NO Produktion in Endothelzellen. Auch nach der Stimulation mit Quercetin, sowie Delphinidin-, Malvidin- und Cyaninchlorid kam es in diesen Konzentrationen nicht zu einer vermehrten NO-Freisetzung. Um die Möglichkeit eines Synergismus von Substanzen aus unterschiedlichen Substanzgruppen zu untersuchen, wurden Gemische aus Resveratrol, Quercetin und Delphinidinchlorid in unterschiedlichsten Konzentrationen zwischen 1 und 20 µM auf EA.hy926 Zellen gegeben. Auch bei diesen Versuchen war keine erhöhte NO Produktion festzustellen.

V Neue Methoden zur Detektion von NO: Anwendung der CARS Mikroskopie zur Detektion von NO in lebenden Zellen

1 Vorteile der CARS Mikroskopie lebender Zellen

CARS ist die Abkürzung für *C*oherent *A*ntistokes *R*aman *S*pectroscopy.

Im Gegensatz zu gängigen Färbemethoden der Histologie oder der Konfokalmikroskopie, die einzelne Moleküle oder Zellbestandteile sichtbar machen sollen, kommt die CARS Mikroskopie ohne eine vorbereitende Behandlung der Proben aus.

Der Kontrast zwischen dem CARS Signal des Zielmoleküls und dem des Hintergrundes beruht rein auf schwingungsspektroskopischen Eigenschaften des Zielmoleküls. Es ist also nicht nötig, die Zielmoleküle, etwa durch Reaktion mit einem Farbstoff, zu markieren. Der Farbstoff stellt im biologischen System immer einen Fremdkörper dar. Das Einbringen des Farbstoffes in die Zelle kann bereits ausreichen, um physiologische Vorgänge zu beeinflussen. Es ist nicht sicher, ob markierte Moleküle in Zellen weiterhin ihre natürliche Funktion wahrnehmen können. Meist ist es nötig, die Zellen vor der Färbung zu fixieren. Dann ist nur eine Momentaufnahme des Zustandes der Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung möglich.

Bei der CARS Mikroskopie werden gegenüber diesen Methoden die zu untersuchenden Moleküle direkt detektiert. Man kann so Vorgänge in lebenden Zellen räumlich aufgelöst in Echtzeit verfolgen.

Der Nachweis der NO Produktion in lebenden Zellen stellt ein wichtiges biologisches Problem dar. Die bisher dafür zur Verfügung stehenden Methoden⁹⁴ (ESR, Elektrochemische Methoden, Detektion mit Farbstoffen) weisen alle Mängel auf (ESR kann NO nicht in den Zellen detektieren, Reaktionen mit Farbstoffen müssen vor der Detektion ablaufen, Farbstoffe zur intrazellulären NO-Detektion reagieren auch auf Ionenströme usw.). Deshalb ist die Entwicklung einer neuen Methode zur Detektion und Quantifizierung von NO in lebenden Zellen ohne weitere Behandlung wichtig. CARS Mikroskopie stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, der es ermöglichen könnte, bestehende Fragestellungen mit ganz neuen Strategien zu bearbeiten.

2 Theoretischer Hintergrund der CARS Mikroskopie

2.1 Physikalischer Hintergrund

2.1.1 Kurze Übersicht über die Prinzipien der Lichtstreuung

Trifft Energie in Form von Licht auf ein Molekül oder Atom, so wird diese Energie absorbiert. Das Molekül geht in einen angeregten Zustand über. Dieser Vorgang ist von verschiedensten Spektroskopiemethoden her bekannt. **Abb. 40** zeigt diesen Energieübergang in einem Termschema.

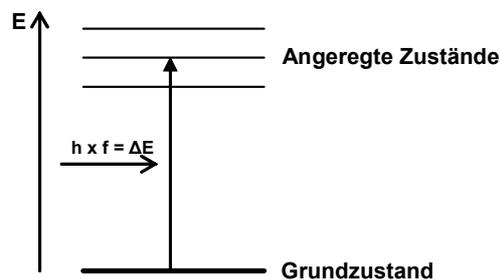


Abb. 40: Energieübergang bei der Anregung eines Moleküls durch Lichtabsorption

Ist die Energie des Photons ungleich einer möglichen Differenz zwischen zwei Energieniveaus des Moleküls oder Atoms, wird das Photon nur „versuchsweise“ absorbiert. Das Molekül oder Atom wird dabei in einen virtuellen Zustand angeregt. Dieser Übergang ist jedoch nicht erlaubt, das Photon wird sofort wieder emittiert und das Molekül kehrt in den Grundzustand zurück. Dabei ändert sich die Flugrichtung des Photons, das Licht wird elastisch, d.h. ohne Änderung der Energie, gestreut. Diese Streuung wird als Rayleighstreuung bezeichnet (**Abb. 41**).

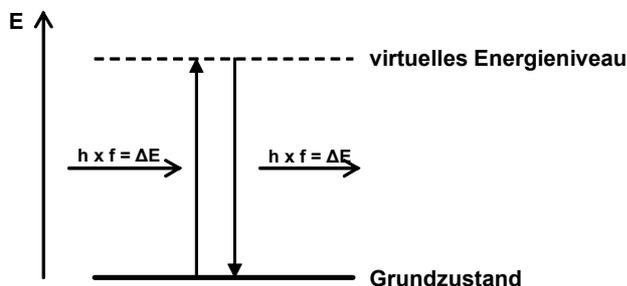


Abb. 41: Termschema der Rayleighstreuung

Manchmal kann man bei der Aufnahme eines Spektrums des gestreuten Lichtes zusätzlich zur Wellenlänge des Anregungslichtes weitere Spektrallinien beobachten. Diese kommen durch

inelastische Streuung zustande. Eine Art der inelastischen Streuung ist die Raman Streuung. Dabei kehrt das Molekül nach der Anregung in ein virtuelles Niveau nicht in den Grundzustand zurück, sondern in einen angeregten Energiezustand. Das so gestreute Licht ist nun um den Betrag energieärmer, der dem energetischen Abstand zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand entspricht. Die Wellenlänge λ wird größer. Man spricht von einer Rotverschiebung. Befand sich das Molekül zu Beginn des Vorganges bereits in einem angeregten Zustand, kann es nach Anregung in ein virtuelles Niveau in den Grundzustand zurückfallen, die Energie des emittierten Lichtes ist nun größer als die des Anregungslichtes, seine Wellenlänge λ kleiner. Nun liegt eine Blauverschiebung vor. Diese Übergänge nennt man im ersten Fall Stokes-Übergang, im zweiten Antistokes-Übergang (**Abb. 42**).

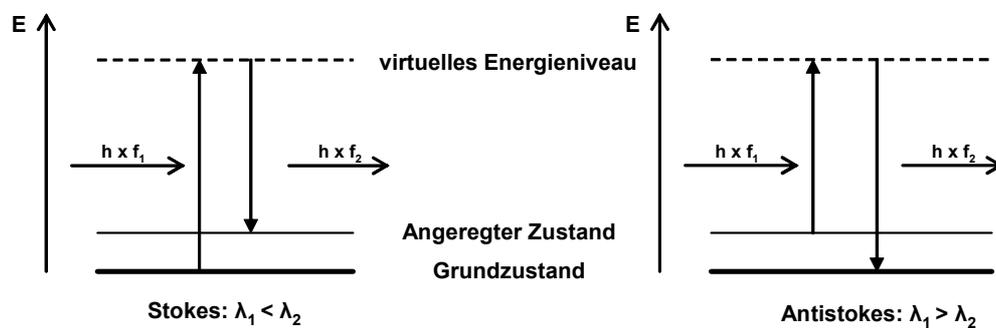


Abb. 42: Termschema der Raman Streuung

Für das Verständnis des CARS Prozesses ist es wichtig zu wissen, daß nicht nur Molekülübergänge von niedriger energetischen Zuständen in höher energetische Zustände durch die Einstrahlung von Licht der entsprechenden Wellenlänge (=Energie) ausgelöst werden können, sondern auch umgekehrte.

2.1.2 Theorie des CARS Prozesses

Beim CARS Prozeß wird zunächst durch einen Laserpuls der Wellenlänge λ_1 das zu untersuchende Molekül in ein virtuelles Energieniveau angeregt. Ein zweiter Laserpuls der Wellenlänge λ_2 stößt zeitgleich das Zurückfallen aus diesem virtuellen Energieniveau in ein existentes, angeregtes Energieniveau an. Dieser Vorgang ist der gleiche, den wir bei der Stokes Ramanstreuung kennengelernt haben. Aus diesem angeregten Energiezustand wird das Molekül jetzt noch einmal durch den Laser der Wellenlänge λ_1 in ein höheres virtuelles Energieniveau angehoben. Aus diesem kehrt es dann in den Grundzustand zurück und emittiert, wie bei der Antistokes Ramanstreuung Licht der Wellenlänge λ_3 . Die Anregung dieser Prozesse durch die entsprechend aufeinander abgestimmten Laserpulse führt zu einer wesentlichen Erhöhung der Signalintensität im Vergleich zu einer spontanen Ramanstreuung. Detektiert wird das emittierte Licht der Wellenlänge λ_3 . (siehe **Abb. 43**)

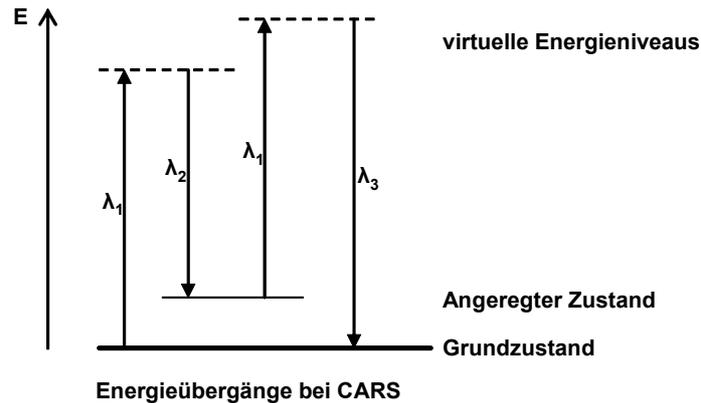


Abb. 43: Termschema des CARS Prozesses

Die Energie des emittierten Lichtes ist nach **Abb. 43** gleich: $E_3 = 2 \times E_1 - E_2$.

Die Wellenlängen λ_1 und λ_2 müssen bei der CARS Mikroskopie so gewählt werden, daß die Differenz der Energie der beiden Laserstrahlen der Energiedifferenz zwischen angeregtem Zustand und Grundzustand des Moleküls entspricht: $E_1 - E_2 = \Delta E_A$.

Energie und Wellenlänge des Lichtes stehen nach Gleichung 1 untereinander in Beziehung:

$$E = h \frac{c}{\lambda} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Aus **Abb. 43** ist leicht ersichtlich, daß die Energie des detektierten Lichtes der Wellenlänge λ_3 höher sein muß als die der beiden Laserstrahlen der Wellenlänge λ_1 und λ_2 . Nach Gleichung 1 muß λ_3 folglich kleiner sein als λ_1 und λ_2 . Deshalb kommt es zu keinen Überlagerungen des CARS Signals mit etwa gleichzeitig ablaufenden Fluoreszenzprozessen. Bei der Fluoreszenz ist die Emissionswellenlänge immer größer als die Anregungswellenlänge (hier λ_1 oder λ_2).

Wie oben bereits beschrieben, muß die Auswahl der Wellenlängen λ_1 und λ_2 so getroffen werden, daß die daraus resultierende Energiedifferenz der Energiedifferenz des angeregten Zustandes und des Grundzustandes des detektierten Moleküls entspricht. Diese Energiedifferenz kann z. B. ein charakteristischer Schwingungszustand des Moleküls sein und erlaubt somit die Einstellung des Systems auf die selektive Detektion bestimmter Verbindungen.

Macht man die Laserpulse sehr kurz, etwa im Femtosekundenbereich, kann die Leistung der Pulse und damit auch die Signalausbeute recht hoch sein, ohne daß die Zellen Schaden nehmen. Für die Beschädigung der Zellen ist die aufgenommene Energie während der Messung ausschlaggebend. Diese ist bei der Verwendung kurzer Laserpulse sehr gering, da die meiste Zeit der Messung kein Impuls auf die Zellen trifft. Der von uns verwendete Laserpuls 1 hatte eine Dauer von 200×10^{-15} s. Die Repetitionsrate lag bei 250kHz, das heißt pro Sekunde erfolgten 250.000 Pulse. Die Zellen waren also während einer Sekunde der Messung nur insgesamt 5×10^{-8} s einer Bestrahlung ausgesetzt.

Ein weiterer Vorteil extrem kurzer Laserpulse ist die verbesserte räumliche Auflösung und die Möglichkeit der Detektion in Vorwärtsrichtung⁹⁵.

In biologischem Zusammenhang wurde bisher nur die Abbildung ganzer Zellen durch CARS Mikroskopie gezeigt⁹⁶.

2.2 Aufbau des CARS Experimentes

Die nötigen Einzelteile der Versuchsanordnung (**Abb. 44**) sind im wesentlichen

1. ein optisches System zur Erzeugung sehr kurzer Laserpulse, die die Energieübergänge im Molekül anregen
2. ein umgebautes Mikroskop mit zwei Objektiven: durch eines unterhalb der Probe werden die beiden Laserpulse zeitgleich in die Probe fokussiert, durch ein zweites darüber wird das emittierte CARS Signal aufgefangen. Der Objektträger mit der Probe kann zum Abtasten der Probe dreidimensional apparativ verfahren werden
3. ein Photomultiplier zur Quantifizierung des CARS Signals
4. ein Computer mit entsprechender Software zur Auswertung des Signals und Umsatz in eine Zeitkurve oder ein Falschfarbenbild.

Die von uns verwendeten Laserpulse hatten eine Leistung von ca. 200 μW und eine Repetitionsrate von 250 kHz. Laserpuls 1 dauerte 200 fs, Laserpuls 2 100 fs. Die Detektion des CARS Signals war mit den Laserpulsen so gekoppelt, daß nur dann Signal detektiert wurde, wenn auch ein Laserpuls auf die Probe traf.

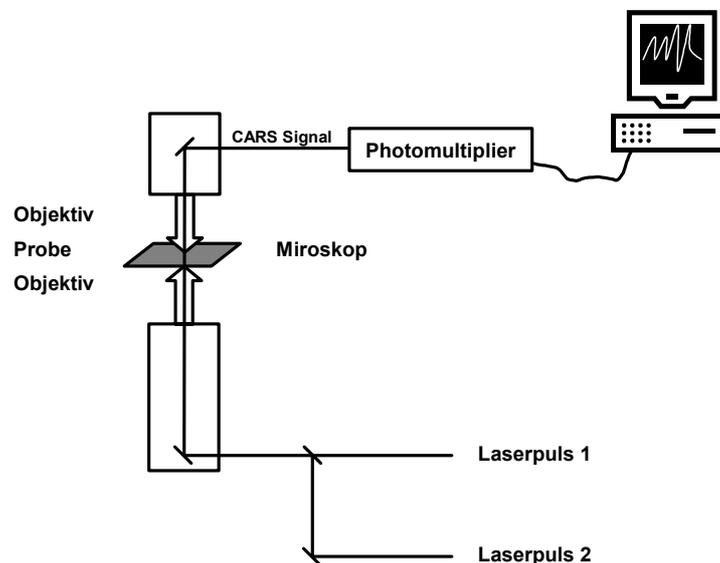


Abb. 44: Schematischer Aufbau des CRAS Experimentes

Der Abstand zwischen den beiden Objektiven mußte sehr gering sein. Der verbleibende Platz für eine Probe betrug nur noch ca. 0,9 mm. Wir brachten die untersuchten Lösungen oder Zellen deshalb in einer selbst aus einfachen Mitteln entworfenen Probenkammer in den Strahlengang. Die Kammer bestand oben und unten jeweils aus einem 24 x 60 mm großen Deckglas. Dazwischen befand sich als Abstandhalter ein Streifen Doppelklebeband. In diesen wurde mit einem Locher ein Loch gestanzt, um

die Probe aufzunehmen. Sollten Lösungen zugegeben werden, so wurde ein Kanal aus dem Doppelklebeband ausgeschnitten. Tropft man auf der einen Seite Lösung zu und saugt auf der anderen mit einem Papiertuch ab, so kann zerstörungsfrei während der Messung die Flüssigkeit zwischen den Deckgläsern ausgetauscht werden (**Abb. 45**).

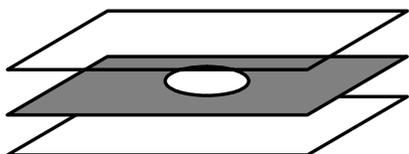


Abb. 45: Aufbau der Probenkammer

Das Detektionsvolumen und damit die räumliche Auflösung betrug $0,5 \mu\text{m}^3$.

Die Nachweisgrenze hängt vom Ramanquerschnitt des Zielmoleküls ab und liegt bei ca. 10.000 Molekülen des untersuchten Stoffes in diesem Volumen, das entspricht einer lokalen Konzentration von etwa $35 \mu\text{M}$.

3 Experimente zur Anwendung der CARS Mikroskopie zur Detektion von NO

Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Andreas Zumbusch, Frau Dr. Annika Enejder, Herrn Dr. Thomas Hellerer und Herrn Dipl. Chem. Ondrej Brukacky am Lehrstuhl für Physikalische Chemie der LMU München bei Herrn Professor Dr. C. Bräuchle durchgeführt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden auch im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Dipl. Chem. Ondrej Brukacky veröffentlicht¹¹⁸.

3.1 Nachweis der Spektralen Selektivität: Darstellung von Zellen

Der Nachweis von NO durch CARS ist sehr schwierig, da NO einen sehr kleinen Ramanquerschnitt hat. Das heißt, das CARS Signal von NO ist sehr schwach.

Um zunächst einmal zu sehen, ob das CARS Signal auch spektral selektiv von den Zielmolekülen stammt, unternahmen wir den Versuch, Zellen abzubilden. Zellen lassen sich gut anhand der Wellenlänge der C-H Streckschwingung bei 2900 cm^{-1} abbilden. C-H Bindungen kommen in Zellen sehr häufig vor, vor allem in Zellmembranen.

EA.hy926 Zellen wurden für den Versuch auf Deckgläschen gezüchtet. Diese mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden als Boden unserer Probenkammer verwendet und in das Loch im Klebeband ein Tropfen Zellkulturmedium gefüllt. Die Wellenlängen der Laserpulse wurden auf die C-H Streckschwingung eingestellt und die Probenkammer in den Strahlengang gebracht. Wie erwartet sieht man deutlich, daß das Signal dort, wo sich Membranen in den Zellen befinden, am stärksten ist (von rot nach gelb ansteigend, **Abb. 46**).

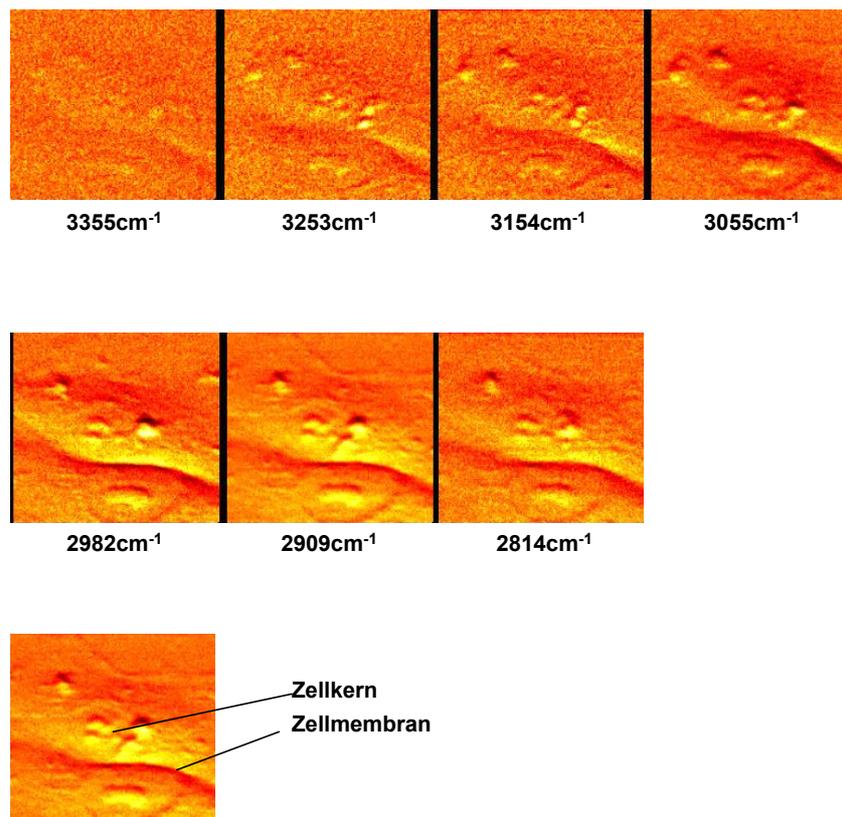


Abb. 46: Darstellung von EA.hy926 durch CARS Mikroskopie:

Aufgenommen wurden die Zellen bei der Wellenlänge der C-H Streckschwingung (2900 cm^{-1}). Je stärker das CARS Signal ist, desto heller erscheint die Falschfarbenaufnahme. Verschiebt man die Wellenlänge eines Lasers, so daß der Abstand der Wellenlängen nicht mehr zur C-H Streckschwingung paßt, wird das CARS Signal und der Kontrast zum Hintergrundsignal schwächer.

Sehr schön ist an dieser Meßreihe zu sehen, daß das CARS Signal schwächer wird, je mehr man die Wellenlängendifferenz der beiden Laserpulse von 2900 cm^{-1} wegjustiert. Je weiter man sich von der Wellenlänge der C-H Streckschwingung nach unten oder oben entfernt, desto schlechter wird auch der Kontrast zum Hintergrund, bis er völlig verschwindet (3355 cm^{-1}). Diese Beobachtung zeigt, daß das gemessene CARS Signal auch wirklich von C-H Bindungen in Molekülen in den Zellen stammt. Es wurden selektiv diese C-H Bindungen gemessen.

3.2 Darstellung der räumlichen Auflösung: Mikroskopie eines Presslings aus Kaliumbromid mit Nitroprussid-Na Kristallen

Nachdem der Vorversuch zur Darstellung von ganzen Zellen die Selektivität der Methode gut gezeigt hatte, näherten wir uns unserem Zielmolekül NO. Zunächst sollte gezeigt werden, daß auch NO spektral selektiv vom Hintergrundsignal getrennt meßbar ist. Zu diesem Zweck wurde ein KBr Pressling wie zur IR Spektroskopie angefertigt, in den einzelne Kristalle von Natriumnitroprussid eingepreßt waren. Nitroprussid, $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ enthält NO Komplex gebunden. Wir nahmen einen solchen Pressling bei der typischen Wellenlänge der N-O Schwingung von 1880 cm^{-1} auf. Was jedoch wegen zu großer spektraler Nähe detektiert wurde, war vermutlich die Fe-NO Bande. Diese erscheint

im Raman Spektrum bei 1943 cm^{-1} und konnte zum damaligen Zeitpunkt aus physikalischen Gründen noch nicht eindeutig von der NO Schwingung getrennt werden. Der KBr Hintergrund blieb völlig unsichtbar. Die Stellen, an denen sich Nitroprussidkristalle im Pressling befanden, lieferten ein deutliches, räumlich abgegrenztes Signal (**Abb. 47**).

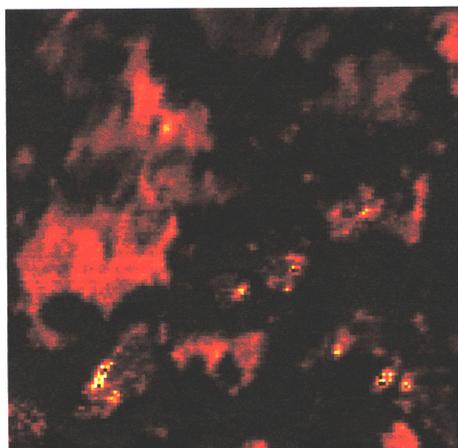


Abb. 47: Nitroprussid-Na in KBr verpreßt.

Das Bild zeigt einen Ausschnitt einer CARS Aufnahme bei 1880 cm^{-1} . Je stärker das CARS Signal ist, desto heller erscheint die Falschfarbenaufnahme. Deutlich sind die Nitroprussid Kristalle zu sehen.

3.3 Messung der zeitabhängigen NO Freisetzung aus Nitroprussid-Na in Lösung

Nach der Messung einer NO Schwingung im festen Pressling sollte versucht werden, NO in Lösung zu detektieren. Ein erster Ansatz war, den Zeitverlauf der NO Freisetzung aus Nitroprussid-Na zu verfolgen. Nitroprussid zerfällt unter Einwirkung von UV Licht zu $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{3-}$ und $\text{NO}^{97, 98}$.

Um zunächst eine Vorstellung von der Kinetik der Reaktion zu erhalten, wurde die NO Menge, die nach UV Bestrahlung zeitabhängig aus Nitroprussid-Na freigesetzt wurde, photometrisch bestimmt. Grundlage der photometrischen Bestimmung war die Reaktion von NO mit Sulfanilsäure und N-(1-Naphthyl)-ethyldiamin (NEDD) unter Gegenwart von Luftsauerstoff zu einem orangefarbenen Azofarbstoff. Dessen Absorptionsmaximum liegt bei 496 nm . Diese Reaktion ist unter dem Namen Griess-Reaktion allgemein bekannt⁹⁹ (siehe **Abb. 48**).

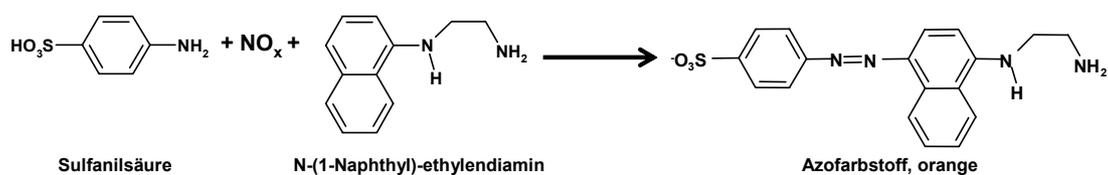


Abb.48: Reaktionsgleichung der Griess-Reaktion

Zur Bestimmung der Kinetik der NO Freisetzung aus Nitroprussid wurde ein Reaktionsansatz der folgenden Zusammensetzung hergestellt:

Na ₂ [Fe(CN) ₅ NO]	1% (m/m) in H ₂ O	100 µl
Sulfanilsäure	1% (m/m) in 5% H ₃ PO ₄	90 µl
NEDD	0,1% (m/m) in H ₂ O	90 µl
H ₂ O		ad 600 µl

Der Ansatz wurde in eine Küvette gefüllt und mit UV Licht der Wellenlänge 396,5 nm bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die Absorption der Lösung bei 496 nm über die Zeit verfolgt. Die Freisetzung von NO aus Nitroprussid folgte einer Kinetik erster Ordnung mit der Reaktionsgeschwindigkeit $t_1 = 37,9$ s (**Abb. 49**).

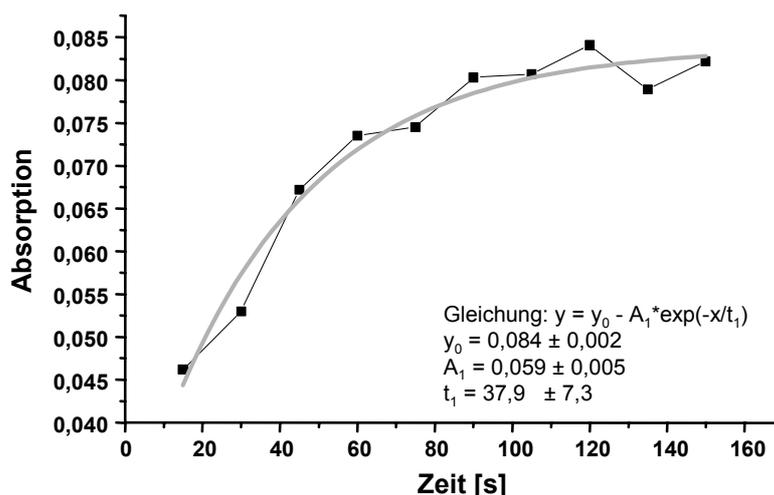


Abb. 49: Kinetik der NO Freisetzung aus Nitroprussid.

Eine Nitroprussid-Lösung wurde mit UV Licht bestrahlt und die Freisetzung von NO aus Nitroprussid-Na mit der Griess Reaktion photometrisch bestimmt

Der gleiche Ansatz wurde nun in die Probenkammer eingebracht und die Freisetzung von NO im CARS Mikroskop bei einer Einstellung auf 1881 cm^{-1} bestimmt. Erstaunlicherweise ergab sich keine Zunahme des Signals. Statt dessen wurde eine Abnahme beobachtet. Die Erklärung liegt darin, daß wieder, wie im Pressling auch, statt der N-O Schwingung bei 1880 cm^{-1} die Fe-NO Schwingung bei 1943 cm^{-1} detektiert wurde. Es wurde also nicht die Freisetzung von NO über die Zeit aufgezeichnet, sondern der Zerfall des Nitroprussid Komplexes. Die ermittelte Reaktionszeit von $38,8$ s paßt jedoch gut zu der in der Griess Reaktion ermittelten (**Abb. 50**).

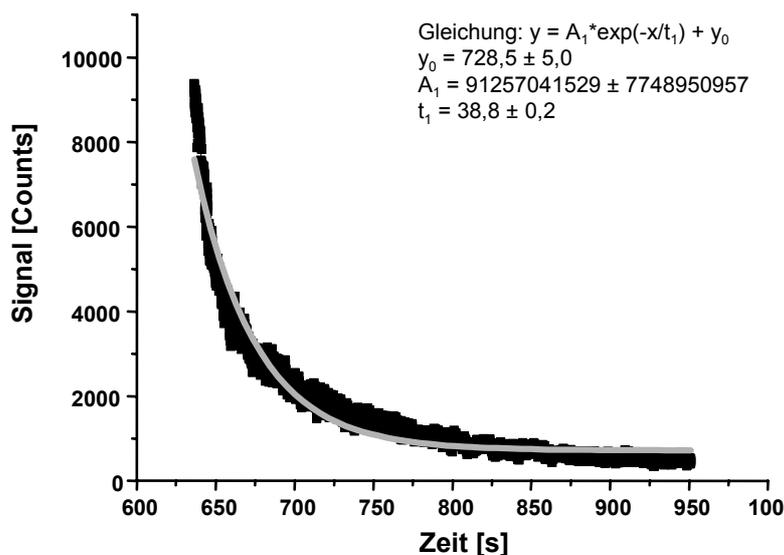


Abb. 50: Kinetik des CARS Signals der NO Freisetzung aus Nitroprussid.

Eine Nitroprussid-Lösung wurde mit UV Licht bestrahlt und die Freisetzung von NO aus Nitroprussid als CARS Signal über die Zeit verfolgt.

3.4 Messung der zeitabhängigen NO Freisetzung aus NOC-9 in Lösung

Nitroprussid erwies sich nach den oben gezeigten Beobachtungen als NO Donor auf Grund der spektralen Nähe der Fe-NO Schwingung für uns als unpraktikabel.

Für die weiteren Versuche entschieden wir uns daher für die Verwendung des NO Donors NOC-9 aus der Gruppe der sogenannten NONOate. Die Freigabe von NO aus diesen Verbindungen erfolgt abhängig vom pH Wert der Lösung mit definierter Halbwertszeit nach der allgemeinen Gleichung $R-[N(O)NO]^- + H^+ \rightarrow R-H + 2NO^{100}$.

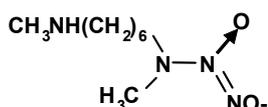


Abb. 51: Strukturformel von NOC-9

Die Halbwertszeit von NOC-9 beträgt 2,7 min.

NOC-9 wurde in einer Konzentration von 250 mM bei einem pH Wert von 14 in 10 mM NaOH gelöst. Bei diesem pH Wert ist es stabil. Zu Beginn der Messung wurde die NOC-9 Lösung 1:10 mit PBS gemischt, um den pH Wert auf 7,4 zu erniedrigen. Dann wurde wieder die Freisetzung von NO bei der Einstellung der Laser auf 1880 cm^{-1} verfolgt. Vom gemessenen Signal (**Abb. 52**, kleines Insert) wurde der Hintergrund von 3114 Counts abgezogen. Wie erwartet ergab sich zunächst ein Anstieg in der Intensität des CARS Signals, der dann in einen Abfall überging. Dieser war durch die Reaktion von NO mit Sauerstoff in der Lösung bedingt (**Abb. 52**).

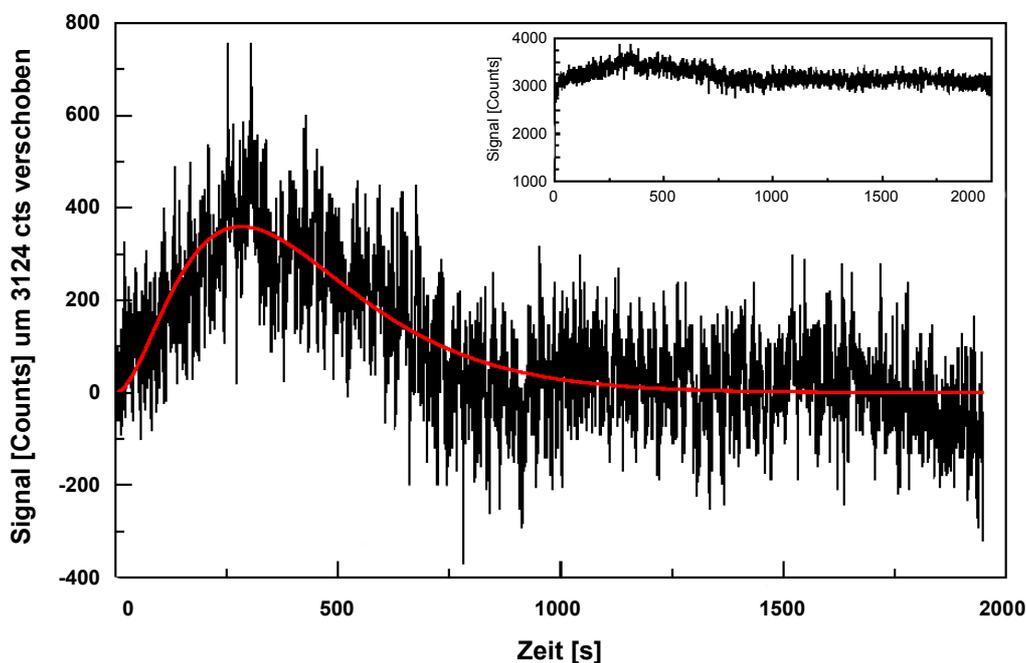


Abb.52: Freisetzung von NO aus NOC-9.

Durch mathematische Behandlung der Überlagerung von NO Freisetzung und Zerfall ergaben sich für die Freisetzung eine Halbwertszeit von 3,2 min und für den Zerfall 3,4 min. Die Halbwertszeit der NO Freisetzung entspricht annähernd der erwarteten von 2,7 min. Der Zerfall erscheint im Vergleich zur Literatur¹⁰¹ sehr langsam.

Leider ließ sich diese äußerst vielversprechende Messung nicht reproduzieren.

3.5 Darstellung der NO Bildung in Zellen

Nachdem Vorversuche zur Messung von NO ermutigend verlaufen waren, sollten nun erste Erfahrungen in lebenden Zellen gesammelt werden. Um die Aufgabe leichter zu machen, wurden zunächst Zellen verwendet, die über die induzierbare NO-Synthase (iNOS) größere Mengen (im μM Bereich) an NO produzieren können als endotheliale Zellen (im nM Bereich)¹⁷.

Zum Versuch wurden RAW 264.7 Mausemakrophagen auf Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen wurden wieder wie bei den Versuchen mit EA.hy926 beschrieben zu einer Probenkammer zusammengesetzt. In das Loch im Klebeband wurde Medium gegeben. Als Stimulus der NO Produktion wurde Lipopolysaccharid (LPS, aus E. coli, Sigma, Deutschland) verwendet¹⁰². LPS wurde in einer Konzentration von $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ in H_2O gelöst und als Stocklösung bei -20°C aufbewahrt. Zur Stimulation der Zellen wurde es 1:100 zum Medium pipettiert, so daß die Endkonzentration $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ betrug. Es wurden nicht, wie in der Biologie üblich, LPS vorstimulierte Zellen verwendet, sondern die Zellen wurden erst zu Versuchsbeginn mit LPS stimuliert. In diesem Stadium der Versuche war es

leichter, Veränderungen im Signal zu beobachten, als ein gleichbleibendes Signal als NO zu identifizieren. Die Probenkammer mit den Zellen wurde dann in das Mikroskop eingebracht und das NO Signal bei 1880 cm^{-1} aufgenommen. Zeitabhängig konnte eine Signalverstärkung in einzelnen Zellen beobachtet werden (**Abb. 53**). Diese begann nach etwa 2 h. Nach etwa 4 h mußte das Experiment abgebrochen werden, weil die Zellen starben. Grund dafür war die fehlende Möglichkeit, die Zellen während der Messung auf 37°C zu halten und das äußerst geringe Medienvolumen in der Probenkammer.

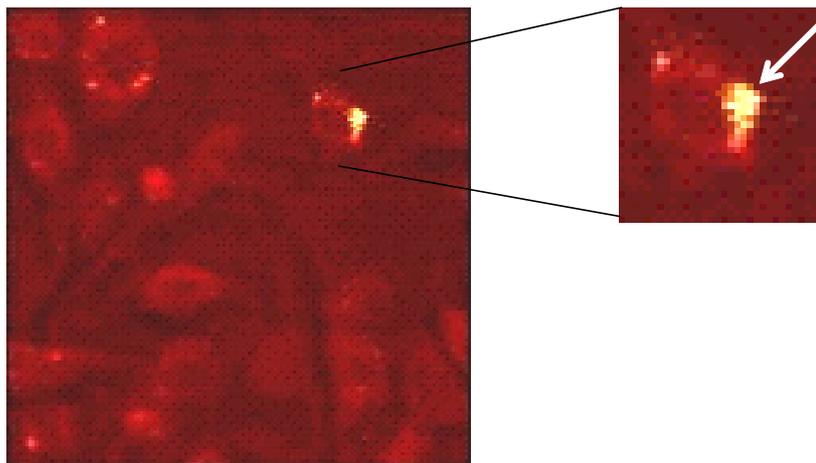


Abb. 53. CARS Signal in RAW 264.7 Mausmakrophagen.

Die Zellen waren etwa 3 h mit $1\mu\text{g} / \text{ml}$ LPS stimuliert. Das NO Signal wurde bei 1880 cm^{-1} aufgezeichnet. Die Zelle oben rechts (siehe auch Ausschnitt) schien bereits ab 2 h Stimulationszeit NO zu produzieren. Das Signal stieg kontinuierlich an, bis die Zellen nach etwa 4 h starben. Die Falschfarbenaufnahme erscheint um so heller, je stärker das CARS Signal ist.

Bis zur Anwendung der Methode zur NO Detektion an Endothelzellen müssen noch einige technische Verbesserungen vorgenommen werden. Die ersten Versuche in dieser Richtung wurden bereits unternommen.

VI Diskussion

1 Einfluß von Sojaisoflavonen auf die eNOS

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Sojaisoflavone Formononetin und Biochanin A, sowie deren Metabolite¹⁰³ Daidzein und Genistein in Konzentrationen von 1 und 10 µM die Aktivität des menschlichen eNOS Promotors in der EA.hy926 Endothelzelllinie nach 20 h Inkubation signifikant (> 2-fach) erhöhen.

Die natürlich in der Pflanze vorliegenden Isoflavone Formononetin und Biochanin A hatten jedoch keinen Einfluß auf die Aktivität des eNOS Proteins. Genistein, das im Körper aus Biochanin A gebildet wird¹⁰³, erhöhte sowohl die eNOS Enzymaktivität als auch die NO Freisetzung nach längerer Inkubation (48 bis 96 h) (etwa 1,7-fach). Bei Inkubation bis 20 h hatte es keinen Effekt. Ein tendenziell ähnliches Verhalten zeigte der Formononetin-Metabolit Daidzein. Die Veränderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Formononetin bewirkte zwar eine erhöhte NO Freisetzung in den Zellüberstand, aus den folgenden Gründen ist diese Beobachtung jedoch anzweifelbar: Das gebildete NO wird durch die Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff, DAF-2 (siehe *Material und Methoden*) quantifiziert. Die Emissionsmaxima des gebildeten DAF-2T überschneiden sich mit der Eigenfluoreszenz von Formononetin. Deshalb kann trotz intensiver Waschschriffe nicht sicher davon ausgegangen werden, daß nicht minimale Reste von Formononetin auf den Zellen fälschlicherweise mitbestimmt wurden. Für keines der untersuchten Isoflavone konnte nach 20–96 h Stimulation ein Einfluß auf eNOS-mRNA- und Proteingehalt nachgewiesen werden.

Die vermehrte NO Produktion sollte zur Bestätigung an humanen Primärzellen des Endothels der Nabelschnurvene (HUVECs) reproduziert werden. Dies gelang jedoch nicht. HUVECs produzieren generell weniger NO als EA.hy926 Zellen. Wegen individuellen Unterschieden der Primärkulturen schwanken die Ergebnisse bei HUVECs von Charge zu Charge sehr stark. Der zu erwartende Anstieg der NO Produktion nach Genisteinbehandlung ist nur sehr gering und kann in HUVECs nicht von natürlichen Schwankungen unterschieden werden.

Die beobachteten Effekte waren durch den Estrogen Rezeptor (ER) Antagonisten ICI 182,780 nicht hemmbar. Als Vergleich eingesetztes 17-β-Estradiol hatte in den verwendeten Konzentrationen (1–30 nM) weder auf EA.hy926 Zellen noch auf HUVECs einen signifikanten Einfluß. Lediglich nach 72 h Inkubation mit 10 nM 17-β-Estradiol zeigte sich eine leichte signifikante Steigerung der eNOS vermittelten NO Produktion in EA.hy926.

In der Literatur finden sich mehrere *in vivo* Studien, die einen positiven Einfluß von Sojaisoflavonen auf das Herz-Kreislauf-System nahelegen^{41, 45-47}. In dieser Studie wurde jedoch zum ersten Mal eine direkte Wirkung von Genistein auf die menschliche eNOS nachgewiesen. Die erhobenen Daten führen zu der Annahme, daß es hauptsächlich die im Körper gebildeten Metabolite sind, die die Effekte am menschlichen Endothel vermitteln.

Sojaisoflavone sind bereits seit längerem als sogenannte Phytoestrogene bekannt¹⁰³. Sie können an den Estrogen Rezeptor (ER) binden und auch ER vermittelte Signalwege aktivieren^{48, 104-106}. Sie

unterscheiden sich aber wesentlich in ihrer Affinität zu den verschiedenen Subtypen des ER. Genistein bindet stark an den ER β , etwa mit 87% der Affinität von Estrogen. An den ER α bindet es dagegen nur mit 4% der Affinität von Estrogen. Daidzein bindet im Vergleich an beide Rezeptor Subtypen nur recht schwach. (ER α 0,1% und ER β 05% der Bindungsaffinität von Estrogen)⁴⁸. Obwohl im eNOS Promotor kein klassisches Estrogen Response Element zu finden ist, wurde für Estrogen gezeigt, daß es über den ER die Expression der eNOS steigern kann⁴⁷. Darüber hinaus wurde über vielfältige Einflüsse von Estrogen auf das eNOS System in Kurz- und Langzeitstudien berichtet¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. Bei der Untersuchung der L-Citrullin Produktion und der NO Freisetzung aus Isoflavon-stimulierten Zellen war Daidzein im Gegensatz zu Genistein nicht signifikant wirksam. Estrogen hatte dagegen in einer Konzentration von 10 nM einen geringen Einfluß auf die NO Produktion stimulierter EA.hy926 Zellen nach 72 h. Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung des ER an der Wirkung der Isoflavone hin. Gegen die Beteiligung des ER und der estrogenartigen Eigenschaften der Isoflavone spricht, daß in unseren Untersuchungen alle Isoflavone einen vergleichbaren Effekt auf den eNOS Promotor zeigten. Ferner war weder die Erhöhung der eNOS Promotor Aktivität noch der vermehrte Umsatz von L-Arginin zu L-Citrullin und die vermehrte Freisetzung von NO in den Zellüberstand durch einen ER Antagonisten hemmbar. 17- β -Estradiol selbst hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität von eNOS Promotor und Enzym. Es gibt darüber hinaus Berichte, die zeigen, daß EA.hy926 Zellen unter estrogenfreien Kulturbedingungen, wie sie bei uns vorlagen, eine 46 kDa Spleißvariante des ER α exprimieren. Dieser verkürzte ER ist membranständig und vermittelt nur begrenzt genomische Effekte. Seine eigentliche Aufgabe ist die Vermittlung schneller, nicht genomischer Effekte^{50, 108-110}. Das könnte eine Erklärung für die bei uns nur sehr schwach ausgeprägten Effekte von Estradiol auf die eNOS Expression und Funktion sein. Zusammengefasst sprechen die von uns erhobenen Daten eher gegen einen ER vermittelten Mechanismus der erhöhten eNOS Expression unter dem Einfluß der Sojaisoiflavone.

Sumi und Ignarro konnten 2003 zeigen, daß der menschliche Estrogenrezeptorähnliche-Rezeptor $\alpha 1$ (ERR $\alpha 1$) eine vermehrte Expression der eNOS bewirken kann¹¹¹. Bei ihren Experimenten mit Rinder-Aorten-Endothelzellen wurde der ERR $\alpha 1$ vermittelte Effekt ebenfalls nicht durch ICI 182,780 gehemmt. Darüber hinaus sahen sie auch erst sehr späte Effekte auf die Proteinmenge (48-72 h). Diese Beobachtungen legen ERR $\alpha 1$ als vielversprechenden Kandidaten für die Signalübertragung der Isoflavone nahe. Erste Experimente (Dr. Trish Willy, X-Cepto Therapeutics, San Diego, USA; unveröffentlichte Daten) lieferten jedoch keinen Anhaltspunkt, daß Genistein am ERR $\alpha 1$ angreifen kann.

Eine weitere Eigenschaft, die Genistein von Daidzein unterscheidet, ist seine potente Wirkung als Tyrosinkinase Hemmer¹¹². Die Phosphorylierung der eNOS an Tyrosinresten ist für deren Aktivität von Bedeutung. Man nimmt an, daß dadurch die Bindung regulatorischer Proteine an die eNOS beeinflusst wird. Zusätzlich scheint Hsp90 an einem Tyrosinrest phosphoryliert zu werden. Hsp90 spielt eine Rolle als Gerüstprotein beim Zusammenfinden von eNOS und Akt. Die eNOS wird durch Akt an Serin¹¹⁷⁷ phosphoryliert und damit aktiviert²⁷. Für die Tyrosinkinase cSrc wurde gezeigt, daß sie in bestimmten Fällen an der Aktivierung der eNOS maßgeblich beteiligt ist^{51, 113}. Eine Hemmung der

Tyrosin Phosphorylierung könnte also durchaus einen Einfluß auf die Aktivität der eNOS haben. Allerdings sollte Genistein als Tyrosinkinase Hemmer die eNOS Aktivität vermindern. Statt dessen zeigte es als einziges Isoflavon einen aktivierenden Effekt.

Einen Beitrag zur besseren Bioverfügbarkeit von NO leisten sicher auch die antioxidativen Eigenschaften der Sojaisoflavone^{39, 40}. Ob diese jedoch mit ihrer transkriptionellen Aktivität in Verbindung gebracht werden können, ist bis zur Durchführung weiterer Untersuchungen spekulativ.

Trotz der starken Erhöhung der eNOS Promotor Aktivität durch alle vier untersuchten Verbindungen konnte für keine ein Einfluß auf den eNOS mRNA Gehalt oder die eNOS Protein Menge in stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Die Methoden sind jedoch zu ungenau, um Veränderungen unterhalb von Faktor 2 sicher nachzuweisen. Aus Beobachtungen in Experimenten mit Rotweinxtrakten ist zudem bekannt, daß die Änderung der Promotoraktivität meist wesentlich stärker ausgeprägt ist, als die nachfolgende Proteinexpression. Es wären also Veränderungen der mRNA- und Proteinkonzentration unter dieser Grenze zu erwarten. Deshalb kann trotz negativer Befunde auf mRNA und Proteinebene nicht ausgeschlossen werden, daß der beobachtete Effekt von Genistein durch vermehrte eNOS Expression bedingt ist. Dafür spricht auch die lange Inkubationszeit, die nötig ist, um den Effekt herbeizuführen, und das lange Anhalten der vermehrten NO Freisetzung. Die Möglichkeit, daß der vermehrten Promotoraktivität keine vermehrte Proteinexpression folgt, muß jedoch offen bleiben. Insbesondere, da durch Formononetin, Biochanin A und Daidzein, die ebenfalls die Promotoraktivität erhöhen, keine signifikanten Änderungen der eNOS Proteinaktivität und der NO Produktion vermittelt werden.

Ein Grund dafür könnte im Aufbau des Experimentes selbst liegen. Zur Untersuchung der eNOS Promotoraktivität wurde ein Reportergenkonstrukt verwendet, das nur einen 3500 Basenpaare langen Teil des menschlichen eNOS Promotors enthält. Auf dem restlichen Abschnitt können weitere regulatorische Sequenzen liegen, die die erhöhte Promotoraktivität wieder relativieren. Eine weitere Erklärung bestünde darin, daß vermehrt transkribierte eNOS mRNA unter dem Einfluß der Isoflavone auch schneller degradiert wird. Das Ergebnis einer gesteigerten Transkription würde damit aufgehoben.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen zusammengefaßt einen deutlichen Anstieg der Aktivität des humanen eNOS Promotors unter dem Einfluß der Soja Isoflavone Formononetin, Biochanin A, Genistein und Daidzein. Genistein erhöht nach langen Stimulationszeiten von 48-96 h deutlich die eNOS Enzymaktivität und die NO Freisetzung durch EA.hy926 Zellen. Eine Beteiligung des ER an der Vermittlung dieser Effekte ist unwahrscheinlich. Der genaue Mechanismus der Wirkung der Sojaisoflavone bleibt Gegenstand zukünftiger Studien.

2 Wein und Weininhaltsstoffe

2.1 *Polyphenolextrakte aus dem Wein verstärken eNOS Expression und Funktion in Abhängigkeit von Rebsorte und Anbaugebiet*

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal systematisch gezeigt werden, daß die Steigerung von eNOS Expression und eNOS Enzymaktivität durch RWPE^{69, 70} von der verwendeten Rebsorte und der geographischen Herkunft des Weines beeinflusst wird. Durch Verwendung definierter Mengen isolierter Polyphenolextrakte anstelle der Ausgangsweine konnte gezeigt werden, daß die Unterschiede durch das Inhaltsstoffmuster und nicht, wie von Wallerath et al.⁷⁰ vermutet, durch den unterschiedlichen Gesamtgehalt an Polyphenolen hervorgerufen werden.

2.1.1 *RWPE verstärken eNOS Expression und Aktivität in Abhängigkeit von Rebsorte und Anbaugebiet*

In der Vergangenheit wurden bereits Versuche unternommen, um die Wirkungen verschiedener Weine auf die eNOS Expression zu vergleichen^{66, 70}. Diese beschränkten sich jedoch auf eine sehr begrenzte Anzahl verschiedener Weine.

Um eine fundierte Aussage machen zu können, untersuchten wir ca. 180 verschiedene Weine. Die Auswahlkriterien waren dabei:

1. die Weine sollten aus einer einzigen Rebsorte gekeltert sein;
2. die Weine sollten möglichst vom selben Jahrgang sein;
3. die Weine sollten nicht zu hochpreisig sein.

Der Grund für das dritte Kriterium war, daß das „French Paradox“ ein Phänomen der breiten Bevölkerung und nicht der gesellschaftlichen Oberschicht ist.

Um die Menge verabreichter Polyphenole zu standardisieren, stellten wir aus diesen Weinen RWPE her. Zur Stimulation von EA.hy926 Zellen wurden definierte Konzentrationen dieser Extrakte eingesetzt.

Bei der Untersuchung der von uns ausgewählten Weine fanden wir deutliche Unterschiede in der Wirkung auf die Expression der eNOS. Merlot Weine waren am aktivsten. Daneben waren Cabernet Sauvignon, Pinot Noir und Syrah stark aktiv.

Im geographischen Vergleich zeigten französische, chilenische und italienische Weine die stärksten Effekte. Weine aus Deutschland, den USA, Südafrika und Australien hatten die geringsten Einflüsse (siehe auch **Abb. 54**). Chilenische Weine zeigten eine breite Streuung.

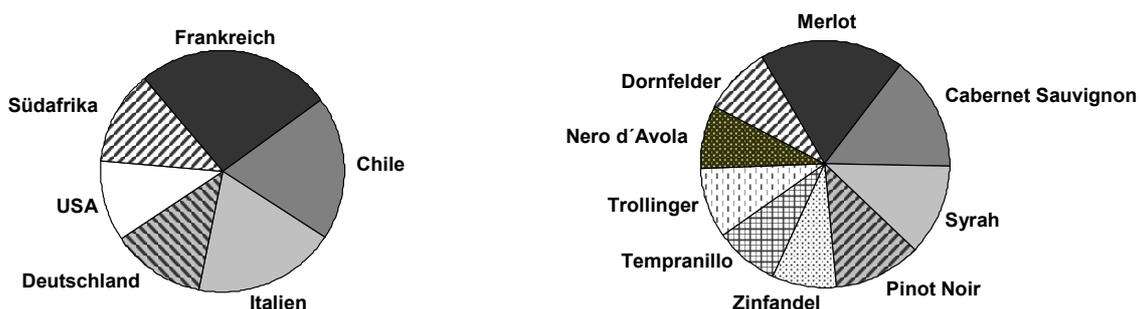


Abb. 54: Darstellung der unterschiedlichen Aktivität der RWPE in Abhängigkeit von geographischer Herkunft (Merlot) und Rebsorte.

Die Flächen korrespondieren mit der Wirkung auf die Aktivität des eNOS Promotors.

Aufgrund der Standardisierung der verabreichten Polyphenolmenge können die beobachteten Unterschiede im Effekt der RWPE auf Promotor- und Enzymaktivität der eNOS sicher unterschiedlichen quantitativen, insbesondere aber auch qualitativen Zusammensetzungen der RWPE zugeordnet werden. Unterschiede in der Menge der verabreichten Polyphenolmenge waren dadurch ausgeschlossen. Unterschiede im Inhaltsstoffmuster kommen zustande durch den unterschiedlichen Sekundärstoffwechsel der verschiedenen Rebsorten⁸⁹⁻⁹², sowie durch Klima und Bodenbeschaffenheit der Anbauggebiete⁹¹. Auch die lokale Technik der Weinbereitung beeinflusst das Inhaltsstoffmuster im fertigen Wein.

Die analytische Untersuchung der entsprechenden Polyphenolmuster aktiverer und weniger aktiver Weine kann Hinweise auf die wirksamkeitsbestimmenden Verbindungen liefern.

2.1.2 WWPE verstärken die eNOS Promotor Aktivität vergleichbar den RWPE

Um die grundsätzliche Frage zu klären, ob auch Weißweine die eNOS Expression beeinflussen können, untersuchten wir einige WWPE in gleichen Konzentrationen wie RWPE. WWPE aus französischem Chardonnay erhöhten die eNOS Promotor Aktivität vergleichbar zu RWPE.

Aufgrund zu geringer Probenmengen konnte eine Untersuchung des Einflusses von WWPE auf die Aktivität der eNOS nicht durchgeführt werden. Diese ist noch nachzuholen, um sicher entscheiden zu können, ob WWPE tatsächlich wie RWPE eine verstärkte eNOS Expression bewirken.

In Weißwein finden sich nur etwa 10-25% der Gesamtmenge an Polyphenolen pro Volumen verglichen mit Rotwein. Die qualitative Zusammensetzung ist ebenfalls unterschiedlich.

Der Kreis der Substanzen, die als wirksamkeitsbestimmend in Frage kommen, wird durch die ähnliche Wirkung von WWPE und RWPE weiter stark eingeschränkt. Auch diese Ergebnisse liefern einen wichtigen Hinweis zur Aufdeckung dieser Inhaltsstoffe in zukünftigen Untersuchungen.

2.2 *Der Vinifikationsprozeß, nicht aber die Lagerung in bestimmten Faßmaterialien verstärkt die RWPE vermittelten Effekte*

Traubensaftpolyphenolextrakte (TSPE) aus frischen Weintrauben verstärkten die eNOS Expression und Enzymaktivität ähnlich wie RWPE, jedoch in geringerem Maß.

Die Lagerung in Holzfässern verstärkte nicht die Aktivität der Extrakte im Vergleich zu einer Lagerung im Stahltank. Die Lagerung in Eichenholzfässern verringerte die Aktivität der Extrakte sogar geringfügig.

2.2.1 *Traubensaftpolyphenole (TSPE) haben einen geringeren Einfluß auf die eNOS Expression*

Das Polyphenolmuster in Rotwein unterscheidet sich deutlich von dem roter Trauben⁹². Einige Verbindungen im Rotwein entstehen erst während des Vinifikationsprozesses. Für uns war von Interesse, ob es sich dabei um potentiell wirksamkeitsbestimmende Substanzen handeln kann.

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Effekte von TSPE mit denen entsprechender RWPE verglichen.

Traubensaft war auch in der Vergangenheit schon Thema einiger Untersuchungen⁵⁷. Bei käuflichen Traubensäften ist oft nicht nachzuvollziehen, wie diese Säfte hergestellt wurden. Ohne Erwärmen gepreßte Säfte aus roten Weintrauben sind farblos und werden im allgemeinen von den Herstellern mit kommerziell erhältlichem Rotweinpulver gefärbt. Die in älteren Studien beobachteten Effekte der Säfte auf die eNOS könnten also auch versteckte RWPE Effekte gewesen sein. Um dieses Problem zu umgehen, stellten wir selbst Traubensäfte her (siehe *Material und Methoden*). Trauben und die entsprechende Weine stammten vom gleichen Winzer. Unterschiede in Anbaugebiet oder Rebsorte von Wein und Saft waren damit ausgeschlossen.

TSPE verursachte eine signifikant geringere Steigerung der eNOS Promotor Aktivität als RWPE.

Der Effekt von TSPE auf die L-Citrullin Produktion durch EA.hy926 Zellen war ebenfalls geringer ausgeprägt, als der von RWPE. Bei diesen Versuchen waren die Unterschiede aber nur gering.

In Western Blot Experimenten war die Expression des eNOS Proteins durch TSPE und RWPE ebenfalls ähnlich stark erhöht.

Zusammengefaßt deuten diese Befunde darauf hin, daß TSPE trotz geringerem Einfluß auf die eNOS Promotor Aktivität die eNOS Expression vergleichbar den RWPE verstärken. Aktive Substanzen liegen also bereits genuin in den Trauben vor. Der Vinifikationsprozeß scheint aber die Aktivität der Extrakte leicht zu verstärken.

2.2.2 *Weinlagerung in Eichenholzfässern vermindert den Effekt von RWPE auf den eNOS Promotor*

Die Lagerung des Weines in verschiedenen Faßmaterialien zeigte einen Einfluß auf die Aktivität der RWPE. Dornfelder Weine, die im Stahltank oder in Holzfässern gelagert wurden steigerten die Aktivität des eNOS Promotors gleich stark. Wein, der „en Barrique“ ausgebaut wurde, aktivierte den eNOS Promotor schwächer.

Bei der Lagerung von Wein in neuen Eichenfässern (Barrique) werden vielfältige Verbindungen, aus dem Holz gelöst. Diese Verbindungen verleihen den Barrique Weinen ihren vollmundigen Geschmack. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Tannine. Unsere Ergebnisse unterstützen Beobachtungen, die zeigten, daß Tannin und Quercetin die eNOS Aktivität hemmen können¹¹⁴.

Teurer Weinausbau in Eichenfässern verstärkt jedenfalls nicht die Aktivität der RWPE.

2.3 *Fraktionierung der RWPE durch Ausschütteln mit Diethylether*

Die Fraktionierung der RWPE durch Verteilungsvorgänge zwischen wäßrigen und organischen Phasen sollte weitere Hinweise auf wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe liefern.

Durch Ausschütteln der RWPE mit Diethylether oder Ethylacetat konnten Verbindungen entfernt werden, die eine Erhöhung der eNOS Promotoraktivität bewirkten. Diese Behandlung hatte jedoch keinen Einfluß auf die Eigenschaft der Extrakte, die eNOS Proteinaktivität zu steigern.

Die Fraktionierung der RWPE durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmittel stellt also keinen weiteren Schritt zur Abtrennung der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe dar.

Die unerwartete Diskrepanz zwischen eNOS Promotor Aktivität und eNOS Enzym Aktivität deutet jedoch auf einen komplexen Wirkmechanismus der RWPE hin. Vermutlich wirken mehrere Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten zusammen.

2.4 *Blüteninhaltsstoffe haben nur einen schwachen Effekt auf die eNOS Promotor Aktivität*

Im Gegensatz zu RWPE ist die Zusammensetzung der Polyphenolextrakte aus Blüten und Früchten weniger komplex. Meist liegt nur eine Verbindung als Hauptkomponente vor. Die Hauptkomponenten der getesteten Blüten und Früchte sind unterschiedliche Anthocyane, die sich von den drei Hauptaglyka Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin ableiten¹¹⁵.

Als einzige Früchte verursachten Sauerkirsche, Preiselbeere und Rote Johannisbeere eine nennenswerte Steigerung der eNOS Promotor Aktivität. Diese blieb jedoch weit hinter der Steigerung durch RWPE zurück.

Stark aktive Blüten- oder Fruchtextakte wären ein Hinweis gewesen, daß es sich bei den wirksamen Verbindungen im Rotwein um Anthocyane bzw. Anthocyanidine handelt.

Diese Theorie ist unwahrscheinlich. Zumindest kann ausgeschlossen werden, daß eine Verbindung vom Anthocyanidin Typ allein für die Effekte des Rotweines verantwortlich ist.

2.5 Rotwein Reinsubstanzen

2.5.1 Resveratrol erhöht in Konzentrationen über 10 μM die Expression der eNOS

Resveratrol ist im Zusammenhang mit kardioprotektiven Wirkungen von Rotwein diskutiert worden. Es ist bekannt, daß Resveratrol die Expression der eNOS steigern kann⁷¹. Wir wollten daher überprüfen, ob Resveratrol für die Wirkung unserer Extrakte verantwortlich ist.

Resveratrol war in der Lage, die Aktivität des eNOS Promotors und des eNOS Proteins signifikant zu steigern. Diese Steigerung konnte allerdings erst bei Konzentrationen über 10 μM (Promotor) bzw. 20 μM (Proteinaktivität) beobachtet werden. Die Konzentrationen, wie sie in unserer Studie nach RWPE Stimulation auf den Zellen erreicht werden, liegen jedoch darunter. In 750 ml Rotwein liegen 1 bis maximal 10 mg Resveratrol vor (als Anhaltspunkt siehe auch^{90, 116}). Unter Berücksichtigung der Ausbeute bei der Extraktgewinnung beträgt die Resveratrolkonzentration im Medium bei Stimulation mit 600 μg / ml RWPE höchstens 1-10 μM . Resveratrol steigerte in keiner Konzentration die Aktivität von eNOS Promotor und Protein im gleichen Ausmaß wie RWPE.

Für Resveratrol kann gefolgert werden, daß es nicht allein für die Wirkung der RWPE auf die eNOS Expression verantwortlich ist. Wie bei den Anthocyanen kann jedoch eine synergistische Wirkung mit anderen Substanzen nicht ausgeschlossen werden.

2.5.2 Weitere Reinsubstanzen

Neben Resveratrol wurden noch weitere Reinsubstanzen in einem Konzentrationsbereich von 1-10 μM getestet. In diesem Konzentrationsbereich liegen die meisten der Substanzen nach Stimulation mit 600 μg / ml RWPE im Medium vor (geschätzt nach⁸⁹⁻⁹³ auf der Grundlage einer durchschnittlichen Ausbeute von 1600 mg RWPE pro Liter Wein).

Von den Stilbenderivaten Piceid, Astringin, Rhapontin und Isorhapontin erhöhte nur Rhapontin die Aktivität des eNOS Promotors leicht (Daten nicht gezeigt). Rhapontin hatte jedoch keinen Einfluß auf die NO Freisetzung. Keines der anderen Stilbenderivate zeigte in den untersuchten Konzentrationen eine Wirkung auf die eNOS Expression und Aktivität.

Die Pflanzensäuren Gallussäure, Vanillinsäure, Syringasäure, p-Cumarsäure, o-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure zeigten ebenfalls keine Wirkung.

Als Reinsubstanzen geprüfte Anthocyanidine (Delphinidin, Malvidin und Cyanidin) zeigten in den getesteten Konzentrationen keine Auswirkung auf die eNOS Expression.

Diese Naturstoffe scheiden in den gewählten Konzentrationen als wirksamkeitsbestimmende Substanzen aus.

2.6 Probleme bei Versuchen mit RWPE

2.6.1 Diskrepanzen zwischen eNOS Promotor Aktivität und eNOS Enzym Aktivität

Manche RWPE erhöhten die eNOS Protein Aktivität in einem starken Maß, obwohl sie nur einen schwachen Effekt auf den Promotor zeigten.

Eine Erklärung dafür wäre die Überlagerung transkriptioneller Effekte mit schnellen, nicht genomischen Effekten auf die Aktivität bereits vorhandener Mengen an eNOS Enzym. Martin und Mitarbeiter konnten z.B. zeigen, daß RWPE die Ca^{2+} Konzentration in Endothelzellen steigern und so eine Gefäßweiterung bewirken⁸⁸. Genomische und nicht genomische Effekte können im L-Arginin / L-Citrullin Umwandlungsexperiment nicht unterschieden werden.

In Untersuchungen des Zeitverlaufs der eNOS Enzymaktivität nach Stimulation mit RWPE konnte ein zeitabhängiger Anstieg beobachtet werden. Dieser begann nach 1 h und wurde nach 12 h signifikant. Für TSPE war ein gleicher Zeitverlauf zu beobachten (nicht gezeigt). Akute, nicht genomische Effekte auf die eNOS Aktivität, wie ein gesteigerter Ca^{2+} Einstrom, laufen jedoch schneller ab und sind somit höchstwahrscheinlich nicht an den beobachteten Effekten auf die eNOS Enzymaktivität beteiligt.

Ein weiterer Grund für diesen Widerspruch könnte im Aufbau des Reporter-gen Konstruktes für die Luciferase Experimente liegen. In dem verwendeten Konstrukt ist nur ein Teil des originalen eNOS Promotors vor das Luciferasegen kloniert. Verschiedene Substanzen im RWPE könnten die Transkription des eNOS Gens über unterschiedliche Regionen im originalen eNOS Promotor verstärken. Einige sind für die beobachtete Steigerung der Luciferaseaktivität verantwortlich. Andere Verbindungen erhöhen die Expression der eNOS über nicht im Konstrukt enthaltene Promotorregionen. Solche Verbindungen erscheinen im Reporter-gen Experiment inaktiv. Ein Zusammenspiel mehrerer Substanzen und Promotorregionen ist denkbar.

Möglich ist auch die Expression weiterer Gene unter dem Einfluß von RWPE. Diese Genprodukte könnten ihrerseits die Expression oder Aktivität der eNOS beeinflussen. So könnten zusätzliche indirekte Effekte von RWPE auf die eNOS Expression oder Aktivität vermittelt werden.

Die beobachteten Widersprüche deuten auf einen komplexen Wirkmechanismus von RWPE hin.

2.6.2 Probleme bei der Bestimmung der NO Freisetzung aus RWPE stimulierten Zellen

Nur für einzelne RWPE war es möglich, die Freisetzung von NO aus stimulierten Zellen mittels DAF-2 Fluoreszenzmessung zu quantifizieren.

Grund dafür sind die antioxidativen Eigenschaften vieler Rotweinhaltstoffe und deren Eigenfluoreszenz.

Die Detektion von NO erfolgt über den Fluoreszenzfarbstoff DAF-2. DAF-2 reagiert mit NO. Gemessen wird die starke Fluoreszenz des Reaktionsproduktes DAF-2T. Die Eigenfluoreszenz vieler Rotweinhaltstoffe weist jedoch Emissionsmaxima bei den gleichen Wellenlängen wie DAF-2T auf. Bleiben minimale Mengen RWPE trotz Waschens auf den Zellen zurück, stören diese die Messung.

NO könnte in diesem Fall durch Elektronen Spin Resonanzspektroskopie (ESR) oder elektrochemisch bestimmt werden.

Da NO nicht direkt, sondern ein Oxidationsprodukt mit DAF-2 reagiert, stören auch alle antioxidativen Substanzen. Entweder binden sie als Radikalfänger NO direkt, oder verhindern die Oxidation von NO. Antioxidantien sind in großer Menge im Rotwein zu finden.

Da diese Substanzen auch die anderen erwähnten Methoden stören, wäre hier nur die Bestimmung der NO Oxidationsprodukte Nitrit und Nitrat sinnvoll. Da jedoch NO von Endothelzellen in äußerst geringen Konzentrationen gebildet wird (im nM Bereich), ist eine Detektion über diese Methode schwierig.

3 Detektion von NO in lebenden Zellen mittels CARS Mikroskopie

Die von uns bisher unternommenen Untersuchungen zur Bestimmung von NO in lebenden Zellen mit der Methode der CARS Mikroskopie verliefen bis jetzt vielversprechend. Es war gelungen, die NO Freisetzung aus dem NO Donor NOC-9 und die Erhöhung der NO Produktion in LPS stimulierten RAW 264.7 Zellen aufzuzeichnen.

Die Methode ist jedoch noch weit davon entfernt, zur Bearbeitung biologischer Fragestellungen eingesetzt zu werden.

Das größte Problem bei allen bisherigen Messungen war die mangelhafte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Dazu war die spektrale Selektivität der Anregung und die Empfindlichkeit der Detektion noch nicht gut genug.

Ansätze zur weiteren Verbesserung der Methode wurden bereits unternommen. Durch einen physikalischen Trick gelang es, die spektrale Selektivität der Anregung weiter zu steigern¹¹⁷. Daneben wird es mit einem neuen optischen Aufbau im Strahlengang der Laser in Zukunft möglich sein, während der Messung ein Spektrum der angeregten Schwingung aufzunehmen. So kann schon bei der Durchführung des Experimentes gezeigt werden, daß wirklich das Zielmolekül detektiert wurde.

Das Überleben der Zellen in der Versuchsanordnung stellt ein weiteres Problem dar. Den Zellen stand während der Versuche nur ein Tropfen Medium zur Verfügung. Vermutlich reicht die Pufferkapazität nicht aus, um längere Zeit zellverträgliche Bedingungen aufrecht zu erhalten. Die Probenkammer ist darüber hinaus nicht beheizbar. Diesen Anforderungen wurde begegnet, indem eine Flußkammer konstruiert wurde, durch die für die Dauer der Experimente angewärmtes Zellkulturmedium gepumpt werden kann. So sind in Zukunft auch Beobachtungen über Stunden möglich.

Ein generelles Problem stellt die Empfindlichkeit der Methode dar. Das Detektionslimit liegt mit etwa 35 μM recht hoch. Es ist jedoch vorstellbar, daß solche NO Konzentrationen direkt an der Stelle des Entstehens durchaus vorliegen. Für manche Fragestellungen kann das sogar von Vorteil sein, z. B. wenn man beobachten will, wo in der Zelle nach Stimulation NO gebildet wird. NO diffundiert sehr schnell vom Ort des Entstehens weg und verteilt sich überall in der Probe. Es wird wegen seiner geringeren Konzentration nicht mehr erfaßt. Ein starkes Signal entsteht nur dort, wo NO entsteht, da es nur dort in ausreichender Konzentration vorliegt. Die aktive eNOS erschiene im Idealfall als punktförmige Signalquelle.

In zukünftigen Experimenten sollen diese Verbesserungen umfangreich und systematisch getestet werden. NO stellt wegen seines geringen Ramanquerschnittes und seiner niedrigen Konzentration in Zellen ein sehr anspruchsvolles Zielmolekül dar. Für den Nachweis der prinzipiellen Anwendbarkeit der Methode zur Detektion einzelner Verbindungen in lebenden Zellen könnten zunächst auch andere Verbindungen modellhaft beobachtet werden. Glutathion kommt in Zellen wesentlich konzentrierter vor. Anhand der S-H Schwingung kann es auch von anderen Proteinen gut unterschieden werden.

In jedem Fall sollte der Ansatz weiter verfolgt werden. CARS Mikroskopie stellt mit der Aussicht, einzelne Verbindungen in lebenden Zellen ohne Vorbehandlung oder Färbung räumlich und zeitlich aufgelöst detektieren zu können, eine große Bereicherung der Methodenpalette der modernen

Biologie dar. Da die Methode noch ganz am Anfang der Entwicklung steht, sind die physikalischen Möglichkeiten sicher bei weitem noch nicht ausgeschöpft.

VII Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses verschiedener Naturstoffe auf die Expression und Aktivität des menschlichen eNOS Proteins in endothelialen Zellen. Dabei wurden gezielt Naturstoffe gewählt, für die bereits positive kardiovaskuläre Eigenschaften postuliert waren, die eine Beteiligung des endothelialen NO Systems vermuten ließen.

Zum einen wurde untersucht, ob die Sojaiso flavone Formononetin, Biochanin A, Genistein und Daidzein die Expression und Enzymaktivität der eNOS erhöhen können.

Zum anderen wurde die Wirkung einer großen Anzahl von Rotweinpolyphenolextrakten auf die eNOS Expression und Enzymaktivität untersucht. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob Anbaugebiet, Rebsorte und Vinifikationsprozeß das Ausmaß der Steigerung von eNOS Expression und Aktivität durch Rotweinpolyphenolextrakte beeinflussen.

Effekte von Rotweininhaltsstoffen wurden mit der Wirkung von Rotweinpolyphenolextrakten verglichen, um einen Hinweis auf wirksamkeitsbestimmende Substanzen zu erhalten.

Alle untersuchten Sojaiso flavone steigerten die eNOS Promotor Aktivität nach 20 h Stimulation.

Genistein erhöht die eNOS Enzym Aktivität und die eNOS vermittelte NO Produktion nach 48-96 h Stimulation.

Diese Effekte sind durch den Estrogen Rezeptor Antagonisten ICI 182,780 nicht hemmbar.

Durch Stimulation mit 17- β -Estradiol konnten keine vergleichbaren Effekte ausgelöst werden.

Eine Beteiligung des Estrogen Rezeptors an der Wirkung der Sojaiso flavone ist daher unwahrscheinlich.

Durch den Vergleich einer großen Anzahl Rotweinpolyphenolextrakte aus verschiedenen Rotweinen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Rebsorte und Anbaugebiet einen Einfluß auf das Ausmaß der Wirkung von Rotwein auf die Expression des eNOS Gens haben.

Weißweinpolyphenolextrakte steigern in vergleichbarem Maß die Aktivität des eNOS Promotors.

Aus der unterschiedlichen Zusammensetzung von wirksamen und weniger wirksamen Rotweinpolyphenolextrakten und Weißweinpolyphenolextrakten könnten künftig Rückschlüsse auf die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe gezogen werden.

Bereits in den Trauben liegen Substanzen vor, die die eNOS Expression verstärken. Der Vinifikationsprozeß scheint die Aktivität jedoch weiter zu steigern.

Eine Fraktionierung der RWPE durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln konnte zwar deren Wirkung auf den eNOS Promotor signifikant reduzieren, jedoch nicht ihren erhöhenden Einfluß auf die eNOS Proteinaktivität.

Diese Ergebnisse deuten auf einen komplexen Mechanismus der Erhöhung der eNOS Enzymaktivität durch Rotweinpolyphenolextrakte hin, der möglicherweise nicht nur auf einer Erhöhung der Proteinexpression beruht.

Von mehreren untersuchten Reinsubstanzen aus Rotwein konnte nur für Resveratrol ein Effekt auf die eNOS Expression nachgewiesen werden.

Resveratrol steigerte die eNOS Expression jedoch erst in höheren Konzentrationen, als bei der Stimulation endothelialer Zellen mit RWPE erreicht werden konnten.

Resveratrol scheidet somit als alleiniger Stimulus der eNOS Expression aus. Zusammen mit anderen Inhaltsstoffen kann es aber möglicherweise essentiell zum Gesamteffekt beitragen.

Die Studie lieferte einige neue Ansatzpunkte zur Aufklärung des wirksamen Prinzips von Rotwein. Ein konkreter Hinweis auf einen bestimmten Inhaltsstoff als wirksamkeitsbestimmende Komponente konnte aber noch nicht erhalten werden. Alles deutet darauf hin, daß mehr als eine einzige polyphenolische Substanz an der Gesamtwirkung der RWPE beteiligt ist.

Die Aufgabe der Erforschung des Mechanismus, der zur vermehrten Expression und Aktivität der eNOS durch RWPE Stimulation führt, birgt sicher noch einige spannende Details und wird hoffentlich Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

Mit dem Beginn der Evaluierung von Einsatzmöglichkeiten der CARS Mikroskopie zur Detektion biologisch interessanter Moleküle, insbesondere von NO, in lebenden Zellen wurde ein grundlegender Beitrag zur Erweiterung der Methodenpalette innerhalb der biomedizinischen Forschung geleistet.

VIII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosin -5'-monophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Protein Kinase
AP-1	Aktivator Protein-1
AP-2	Aktivator Protein-2
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAEC	Rinderaortenendothelzellen
BH ₄	5, 6, 7, 8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
CaMK II	Calcium-Calmodulin-Kinase II
cDNA	kodierende DNA
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CHIP	C-terminal-Hsp70-interacting Protein
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAF-2DA	4,5-Diaminofluoresceindiacetat
DAF-2T	Triazolofluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDRF	Endothelium-derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
FKS	Fötales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDL	High-density-Lipoprotein
Hsp90	Heatshock Protein 90
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül

iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilo Dalton
LDL	Low-density-Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
μM	mykro molar (10^{-6})
mM	milli molar (10^{-3})
mRNA	Messenger RNA
NAA	N^{G} -Amino-L-Arginin
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NANC	Non adrenerg / non cholinerg
NF- κB	Nuclear Factor κB
nM	nano molar (10^{-9})
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOSIP	NOS inhibiting protein
NOSTRIN	NOS traffic inducer
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM-1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMA	Phorbol-12-myrostat-13-acetat
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PVDF	Polivinyliidfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RWPE	Rotweinpolyphenolextrakt
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatcyclase
Sp1	Pregnancy-"specific" beta 1-glycoprotein
TBS-T	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Necrose Faktor α

TSPE	Traubensaftpolyphenolextrakt
VCAM	Vasculäres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WWPE	Weißweinpolyphenolextrakt

2 Alphabetisches Firmenverzeichnis

Acros Organics, Geel, Belgien
Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland
Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland
BioRad Laboratories, München, Deutschland
Bio Whittaker Bioproducts, Heidelberg, Deutschland
Biozol, Eching, Deutschland
Eppendorf, Maintal, Deutschland
Fluka Chemikalien AG, Deisenhofen, Deutschland
Fuji Film, Tokio, Japan
Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Greiner, Würzburg, Deutschland
Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Merck, Darmstadt, Deutschland
Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland
NEN Life Science Products, Boston, USA
Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Perkin Elmer LAS (Germany) GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Peske, Aidlingen-Pichl, Deutschland
Promega, Heidelberg, Deutschland
Promo Cell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Roche, Mannheim, Deutschland
Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Transduction Laboratories, Hamburg, Deutschland

IX Literatur

1 Zitierte Literatur

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
2. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
3. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 190: 244-254, 2000
4. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based signaling Mechanism. *Cell* 106: 675-683
5. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, Hofmann F. Mechanismus of NO / cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ. Res.* 87: 825-830, 2000
6. Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends. Mol. Med.* 10 (4): 143-145, 2004
7. Schwentker A, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair. *Surg. Clin. North Am.* 83 (3): 521-530, 2003
8. Contestabile A, Ciani E. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem. Int.* 45 (6): 903-914, 2004
9. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64: 51-68, 2001
10. Ghalayini IF. Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. *Int. J. Impot. Res.* 16 (6): 459-469, 2004
11. Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis, an overview. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 43: 275-288, 1999
12. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 11 (2):66-75, 2001
13. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 2479-2488, 1997
14. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267: 24173-24176, 1992
15. Shimokawa H, Flavahan NH, Vanhouette PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 83: 652-660, 1991
16. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 20: 11-11-17, 1997
17. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615, 2001

18. Li H, Wallerath T, Förstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7: 132-147, 2002
19. Bachetti T, Comini L, Curello S, Bastianon D, Palmieri M, Bresciani G, Callea F, Ferrari R. Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37 (5): 939-945, 2004
20. Robertson DA, Hughes GA, Lyles GA. Expression of inducible nitric oxide synthase in cultured smooth muscle cells from rat mesenteric lymphatic vessels. *Microcirculation* 11 (6):503-515, 2004
21. Groves JT, Wang CCY. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (6): 687-695
22. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen Reduction by nitric-oxide synthases. *J. Biol. Chem.* 276 (18): 14533-14536, 2001
23. Lai PFH, Mohamed F, Monge JC, Stewart DJ. Downregulation of eNOS mRNA expression bei TNF α : isdentificatin and functional Characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR. *Cardiovasc. Res.* 59: 160-168, 2003
24. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Renal Physiol.* 280: F193-F206, 2001
25. Ortiz PA, Garvin JL. Trafficking and activation of eNOS in epithelial cells. *Acta Physiol. Scand.* 179: 107-114, 2003
26. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285: F178-F190, 2003
27. Flemming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284: R1-R12, 2003
28. Fulton D, Babbitt R, Zoellner S, Fontana J, Acevedo L, McCabe TJ, Iwakiri Y, Sessa WC. Targeting of endothelial nitric-oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt versus calcium-depedent mechanisms for nitric oxide release. *J. Biol. Chem.* 279 (29): 30349-30357, 2004
29. Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RGW, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285: L1179-L1183, 2003
30. Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen ZP, Kemp BE, Venema RC. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen. Pharmacol.* 35: 165-170, 2000
31. Dedio J, König P, Wohlfahrt P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J.* 15: 79-89, 2000
32. Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Müller-Esterl W, Oess S. NOSTRIN: A protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 17167-17172, 2002

33. Jiang J, Cyr D, Roger W, Babbitt RW, Sessa WC, Patterson C. Chaperon-dependent Regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by co-chaperone/ubiquitin ligase CHIP. *J. Biol. Chem.* 278 (49): 49332-49341, 2003
34. Sessa WC. eNOS at a glance. *J. Cell Sci.* 117: 2427-2429, 2004
35. Meeker DR, Kesten HD. Effect of high protein diets on experimental atherosclerosis of rabbits. *Arch. Pathol.* 31:147-162, 1941
36. Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 132: 556S-569S, 2002
37. Wagner JD, Schwenke DC, Greaves KA, Zhang L, Anthony MS, Blair RM, Shadoan MK, Williams JK. Soy protein with isoflavones, but not an isoflavone-rich supplement, improves arterial low-density lipoprotein metabolism in arterogenesis. *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 2241-2246, 2003
38. Yeung J, Yu T. Effects of isoflavones (soy-phytoestrogens) on serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr. J.* 2:15, 2003
39. Hwang J, Wang J, Morazzoni P, Hodis HN, Sevanian A. The phytoestrogen equol increases nitric oxide availability by inhibiting superoxide production: an antioxidant mechanism for cell-mediated LDL modification. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1271-1282, 2003
40. Jiang F, Jones GT, Husband AJ, Dusting GJ. Cardiovascular protective effects of synthetic isoflavone derivatives in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Vasc. Res.* 40: 276-284, 2003
41. Catania MA, Crupi A, Firenzuoli F, Parisi A, Sturiale A, Squadrito F, Caputi AT, Calapai G. Oral administration of soy extract improves endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *Planta. Med.* 68: 1142-1144, 2002
42. Van der Schouw YT, Pijpe A, Lebrun CEI, Bots ML, Peeters PHM, van Staveren WA, Lamberts SWJ, Grobbee DE. Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 1316-1322, 2002
43. Steinberg FM, Guthrie NL, Villablanca AC, Kumar K, Murray MJ. Soy protein with isoflavones has favourable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 123-130, 2003
44. Teede HJ, McGrath BP, Desilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel PJ. Isoflavones reduce arterial stiffness. A placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Artheroscler. Throm. Vasc. Biol.* 23: 1066-1071, 2003
45. Honore EK, Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil. Steril.* 67: 148-154, 1997
46. Squadrito F, Altavilla D, Morabito N, Crisafulli A, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Campo GM, Calapai G, Caputi AP, Squadrito G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 163: 339-347, 2002

47. Cuevas AM, Iribarra VL, Castillo OA, Yanez MD, Germain AM. Isolated soy protein improves endothelial function in postmenopausal hypercholesterolemic women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57: 889-894, 2003
48. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Charlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson J-A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139:4252-4263, 1998
49. Kleinert H, Wallerath T, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Li H, Förstermann U. Estrogens increase transcription of the of the human endothelial NO synthase gene: Analysis of the transcription factors involved. *Hypertension* 31: 582-588, 1998
50. Figtree GA, McDonald D, Watkins H, Channon KM. Truncated estrogen receptor α 46-kDa isoform in human endothelial cells. Relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation* 107: 120-126, 2003
51. Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa W, Bender JR. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase / Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J. Biol. Chem.* 278: 2118-2123, 2003
52. Freedmann JE, Parker C, Li L, Perlamn J, Frei B, Ivanov V, Deak L, lafrati M, Folts J. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 103 (23): 2792-2798, 2001
53. Steinberg FM, Bearden MM, Keen CL. Cacao and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *J. Am. Diet. Assoc.* 103: 215-223, 2003
54. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Düsterhöft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase, cAMP-dependent protein kinase- and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* 279:6190-6195, 2004
55. Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y, Förstermann U. Flavonoids from artichoke (*Cynarus scolymus*) up-regulate endothelial type nitric oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310 (3): 926-932, 2004
56. Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cacao are beneficial for cardiovascular health. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 41-49, 2002
57. Da Lutz PL, Coimbra SR. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (9): 1275-1295, 2004
58. De Lorgeril M, Salen P, Paillard F, Laporte F, Boucher F, de Leiris J. Mediterranean diet and the French paradox: two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc. Res.* 54: 503-515, 2002
59. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of red wine. *Lancet* 1 (8124): 1017-1020, 1979

60. Naissides M, Pal S, James AP, Mamo JC. The effect of red wine polyphenols on cardiovascular disease risk in postmenopausal women. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 13 (Suppl): S71, 2004
61. Pechanova O, Bernatova I, Babal P, Martinez MC, Kysela S, Stvertina S, Andriantsitohaina. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in I-NAME-induced hypertension. *J. Hypertens.* 22 (8): 1551-1559, 2004
62. De Lange DW, van Golden PH, Scholmann WL, Kraaijenhagen RJ, Ackerman JW, van de Weil A. Red wine and red wine polyphenolic compounds but not alcohol inhibit ADP-induced platelet aggregation. *Eur. J. Intern. Med.* 14 (6): 361-366, 2003
63. Zenebe W, Pechanova O, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol. Res.* 52: 425-432, 2003
64. Auger C, Gerain P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, Cros G, Teissedre PL, Rouanet JM. Phenolics from commercial grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *J. Agri. Food Chem.* 52: 5297-5302, 2004
65. Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvertina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282: H942-H948, 2002
66. Flesch M, Schwarz A, Böhm M. Effects of red and white wine on endothelium-dependent vasorelaxation of rat aorta and human coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 275 (4 Pt 2): H1183-H1190, 1998
67. Tawakol A, Omland T, Creager MA. Direct effect of ethanol on human vascular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: H2468-H2473, 2004
68. Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittelman MA, Camargo CA, Stampfer MJ, Willett WC, Rimm EB. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.* 348: 109-118, 2003
69. Leikert JF, Räthel TR, Wohlfahrt P, Chenier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 106: 1614-1617, 2002
70. Wallerath T, Poleo D, Li H, Förstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41 (3): 471-478, 2003
71. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 1652-1658, 2002
72. Edgell C-JS, Mc Donald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3734-3737, 1983
73. Bouis D, Hospers GAP, Meijer C, Molema G, Mulder NH. Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4: 91-102, 2001

-
74. Caderni G, De Filippo C, Luceri C, Salvadori M, Giannini A, Biggeri A, Remi S, Cheynier V, Dolara P. Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* 21 (11): 1965-1969, 2000
 75. Li H, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfahrt P, Ulshöfer T, Jessen T, Herget T, Förstermann U, Kleinert H. Activation of protein kinase C α and/or ϵ enhances transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol. Pharmacol.* 53: 630-637, 1998
 76. Bradford MM. A rapid and sensitive method to for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
 77. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
 78. Heller R, Munscher-Paulig F, Grabner R, Till U. L-Ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274: 8254-8260, 1999
 79. Navarro-Antolin J, Lopez-Munoz MJ, Klatt P, Soria J, Michel T, Lamas S. Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *FASEB J.* 15: 1291-1293, 2001
 80. Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 427: 263-266, 1998
 81. Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2788-2793, 1999
 82. Broillet M, Randin O, Chatton J. Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Lett.* 491: 227-232, 2001
 83. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 70: 2446-2453, 1998
 84. Nagano T, Takizawa H, Hirobe M. Reactions of nitric oxide with amines in the presence of dioxygen. *Tetrahedron Letters* 36: 8239-8242, 1995
 85. Leikert JF, Räthel TR, Müller C, Vollmar AM, Dirsch VM. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett.* 506: 131-134, 2001
 86. Räthel TR, Leikert JF, Vollmar AM, Dirsch VM. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. *Biol. Proced. Online* 5(1): 136-142, 2003
 87. Jürgen Leikert: Einfluss von Drogenextrakten und Naturstoffen auf die endotheliale NO-Synthase. *Dissertation an der LMU München* 2002

88. Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriatsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1579-1587, 2002
89. Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL. Antioxidant capacities and phenolic levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3341-3348, 2001
90. Gambuti A, Strollo D, Ugliano M, Lecce L, Moio L. trans-Resveratrol, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: Relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5747-5751, 2004
91. Faustino RS, Sobrattee S, Edel AL, Pierce GN. Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. *Mol. Cell. Biochem.* 249: 11-19, 2003
92. Arts IC, van de Putte B, Hollmann PCH. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1752-1757, 2000
93. Ribeiro M, Waffo-Teguo P, Teissedre PL, Pujolas A, Vercauteren J, Cabanis JC, Merillon JM. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2666-2670, 1999
94. Nagano T, Yoshimura T. Bioimaging of nitric oxide. *Chem. Rev.* 102 (4): 1235-1270, 2002
95. Zumbusch A, Holtom GR, Xie XS. Three dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering. *Phys. Rev. Letters* 82: 4142-4145, 1999
96. Cheng JX, Jia K, Zheng G, Xie S. Laser-scanning coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and applications to cell biology. *Biophys. J.* 83: 502-509, 2002
97. Frank MJ, Johnson JB, Rubin SH. Spectrophotometric determination of Sodium Nitroprusside and its photodegradation products. *J. Pharm. Sci.* 65(1): 44-48, 1976
98. Wolfe SK, Swinehart JH. Photochemistry of Pentacyanonitrosylferrate(2-), Nitroprusside. *Inorg. Chem.* 14 (5): 1049-1053, 1975
99. L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok and S.R. Tannenbaum. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138
100. Keefer LK, Nims RW, Davies KM, Wink DA. „NONOates“ (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods. Enzymol.* 268: 281-293, 1996
101. Ford PC, Wink DA, Stanbury DM. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett.* 326: 1-3, 1993
102. Jacobs AT, Ignarro LJ. Lipopolysaccharide-induced expression of Interferon-β mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* 276 (51): 47950-47957, 2001

103. Tolleson WH, Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Roberts DW. Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4783-4790, 2002
104. Zava TD, Dollbaum CM, Blen M. Estrogen and Progestin bioactivity of foods, herbs and spices. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217 (3): 369-378, 1998
105. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the „natural“ selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 85 (1): 47-51, 1999
106. Wang TTY, Sathyamoorthy N, Phang JM. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* 17 (2): 271-275, 1996
107. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrine Reviews* 23 (5): 665-686, 2002
108. Stirone C, Borujerdi A, Duckles SP, Krause DN. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, Akt and nitric oxide signalling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Mol. Pharmacol.* 67 (1): 105-113, 2005
109. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5930-5935, 2000
110. Li L, Haynes P, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor α variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4807-4812, 2003
111. Sumi D, Ignarro LJ. Estrogen-related receptor α 1 upregulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 14451-14456, 2003
112. Akiyama T, Ogawara H. Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosin kinases. *Methods Enzymol.* 201: 362-370, 1991
113. Davis ME, Cai H, Mc Cann L, Fukai T, Harrison DG. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *A. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H1449-H1453, 2003
114. Chiesi M, Schwaller R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem. Pharmacol.* 49: 495-501, 1995
115. Schweppe H. Handbuch der Naturfarbstoffe. 1993
116. Careri M, Corradini C, Elviri L, Nicoletti I, Zagnoni I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape and winemaking byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5226-5231, 2003
117. Thomas Hellerer. CARS-Mikroskopie: Entwicklung und Anwendung, *Dissertation an der LMU München*, 2004
118. Ondrej Burckacky. Anwendung der CARS-Mikroskopie zur Detektion von NO in lebenden Zellen. *Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Physikalische Chemie, LMU München*, 2003

119. Sohn HY, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U. Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br. J. Pharmacol* 131: 667-672, 2000

2 Eigene Publikationen

2.1 Abstracts

Thomas R. Räthel, Angelika M. Vollmar, and Verena M. Dirsch (München). Formononetin and Biochanin A enhance eNOS promoter activity but not eNOS protein level and nitric oxide production in EA.hy926 endothelial cells. VIII. NO Forum, Gesellschaft für NO Forschung eV, Frankfurt am Main, Oktober 2002

2.2 Originalarbeiten

Leikert JF, Räthel TR, Wohlfahrt P, Chenier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 106: 1614-1617, 2002

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

Räthel TR, Leikert JF, Vollmar AM, Dirsch VM. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. *Biol. Proced. Online* 5(1): 136-142, 2003

Räthel TR, Leikert JF, Vollmar AM, Dirsch VM. The soy isoflavone genistein induces a late but sustained activation of the endothelial nitric oxide-synthase system in vitro. *Br J Pharmacol.* 2005 Jan 10; [Epub ahead of print]

X Danksagung

Diese Arbeit wurde an der LMU München, Department Pharmazie, Zentrum für Pharmaforschung am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie von Professor Dr. A. M. Vollmar angefertigt.

Ihr möchte ich an allererster Stelle meinen herzlichen Dank sagen für das wunderbare, offene Klima, die interessanten Diskussionen und die Motivation, die sie mir durch ihre fachliche Anleitung, sowie durch die gewährte Freiheit in wissenschaftlichen Dingen immer vermittelte. Die Arbeit unter ihrer Anleitung und in ihren großzügig ausgestatteten Labors war mir stets eine Freude.

Mein weiterer besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Professor Dr. V. M. Dirsch für das immer offene Ohr für alle meine Probleme. Ihre hervorragende fachliche Betreuung und all die spannenden Diskussionen über wissenschaftliche und alltägliche Probleme haben viel zu dem guten Laborklima beigetragen, in dem diese Arbeit entstehen konnte. Ihre hilfreichen Ratschläge waren eine wertvolle Quelle neuer Ideen.

Herrn Dr. Rainer Samtleben danke ich für die Herstellung der unzähligen Rotweinextrakte, und für seine große Begeisterung für unser Thema, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können. In vielen interessanten Gesprächen gab er mir die Möglichkeit von seiner großen Erfahrung zu profitieren und war mir immer ein motivierendes Beispiel.

Ein weiterer Dank gilt meinem Vorgänger, Herrn Dr. Jürgen Leikert. Die geduldige Beantwortung meiner „ersten Fragen“, seine guten Ideen und die lustige Zeit mit ihm gaben mir die besten Startbedingungen, die man sich wünschen kann.

Herzlichen Dank auch Andreas Zumbusch und den Kollegen Thomas Hellerer, Annika Enejder und Ondrej Burkacki am Lehrstuhl für Physikalische Chemie für die freundliche Aufnahme und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Ein besonders herzliches „Danke“ gilt meinem Boxenluder Anita für ihre Hilfe in allen Lebenslagen, fürs Zuhören und die schöne Zeit in unserer Box. Daneben danke ich Thomas Roos für seine Freundschaft und die wertvolle Vervollständigung meiner rudimentären Computerkenntnisse.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich allen Technischen Angestellten, besonders Frau Rita Socher und Frau Ursula Kollmannsberger für ihre Hilfe bei meinen Versuchen. Frau Elfriede Eppinger möchte ich dafür danken, daß sie mich stets an ihrem großen Wissen teilhaben ließ. Für die angenehme Zusammenarbeit und die schönen Stunden auch nach Feierabend danke ich meinen Laborkollegen Lila, Mayo, Kathi, Elke und allen anderen, die hier aus Platzmangel unerwähnt bleiben müssen, sowie Pinky und Brain für die unterhaltsamen Momente zwischendurch.

Zuletzt möchte ich noch einigen ganz besonderen Menschen danken für ihre liebevolle Unterstützung, für ihr Verständnis und dafür, daß sie einfach nur da waren, wenn ich sie gebraucht habe: meinen lieben Eltern, meinem Bruder Sandro und meiner Freundin Hanna.

XI Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thomas Ralph Räthel
 Geburtsdatum: 27.09.1974
 Geburtsort: München
 Eltern: Anna Maria und Dieter Räthel
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

Grundschule:	1982-1986	Grundschule Althegnenberg-Mittelstetten
Gymnasium:	1986-1995	Viscardi-Gymnasium Fürstenfeldbruck
	1995	Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

Hochschulstudium:

Studium der Pharmazie:	1996-2000	Ludwigs-Maximilians- Universität München
	08/1998	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
	09/2000	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Pharmaziepraktikum:	11/2000-04/2001	Amper Apotheke Fürstenfeldbruck
	05/2001-10/2001	LMU München, Department Pharmazie Pharmazeutische Biologie, Arbeitskreis Prof. Dr. A. M. Vollmar
	12/2001	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Approbation zum Apotheker

Praktische Erfahrungen während der Ausbildung	09/1999-10/1999	Tätigkeit als Studentische Hilfskraft am Department Pharmazie, Parmazeutische Biologie, Lehrstuhl Prof. Dr. A. M. Vollmar
---	-----------------	---

Wissenschaftliche Tätigkeit	seit 01/2002	Anfertigung einer Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. A. M. Vollmar und Prof. Dr. V. M. Dirsch am Department Pharmazie, Pharmazeutische Biologie, LMU München
-----------------------------	--------------	--