

Aus dem Institut
für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Direktor: Prof. Dr. P.C. Weber

**Untersuchungen zur Bedeutung von Rotweininhaltsstoffen
bei der Regulation intrazellulärer Signalwege in
humanen Endothelzellen *in vitro***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von:

Roland Hallwachs

aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Essler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. A. Sellmayer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07. April 2005

*'Der Mensch unterscheidet sich vom Tier durch den Wunsch,
Medikamente einzunehmen.'*

England, um 1900

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
1. Einführung	1
2. Der Rotwein	1
3. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems	3
4. Das französische Paradoxon: Was ist die Ursache für die mutmaßlich protektive Wirkung auf die Gesundheit?	10
5. Informationsübertragung in der Zelle	29
6. 'Downstream- Effektoren': MAP-Kinasen (MAPK) und GTPasen	42
7. Gene: Erbinformation und ihre Trägersubstanzen	46
8. Onkogene und Möglichkeiten der malignen Transformation	47
9. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	54
B. MATERIAL UND METHODEN	55
1. Material	55
2. Präparation und Kultur von HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)	57
3. Zellbehandlung zur Durchführung der Versuche/Versuchsansätze	59
4. Die Aktin-Fluoreszenz-Färbung mit Phalloidin-Rhodamin	60
5. Der Western-Blot	61
6. Der Northern-Blot	65
7. Chromatographische-Verfahren	70
8. Im Zellexperiment verwendete Verbindungen und Lösungsmittel	74
C. ERGEBNISSE	78
1. Zellmorphologie: Aktin-Fluoreszenz-Färbung	78
2. Protein-Analyse: Western-Blot	79
3. Identifikationsversuch der auftretenden Proteinbande durch gezielte Hemmung verschiedener Signaltransduktionsproteine der Zelle	87
4. RNA-Analyse: Northern-Blot	90
5. Chemische Auftrennungen und Chromatographie	91
D. DISKUSSION	95
1. Methodendiskussion	95
2. Ergebnisdiskussion	98
3. Effekte von Alkohol und pflanzlichen Flavonoiden auf Herz-Kreislauf-System, Endothelium und kardiovaskuläre Erkrankungen	106
E. ZUSAMMENFASSUNG	112
F. LITERATURVERZEICHNIS	115
G. ANHANG	145
1. Verwendete Abkürzungen	145
2. Internationale Aminosäuren-Codes	146
3. Abbildungsverzeichnis	146

A. EINLEITUNG

1. Einführung:

Die koronare Herzkrankheit (KHK) gehört, neben den malignen Erkrankungen, zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen der westlichen Welt, ausgelöst durch Fehlernährung, Bluthochdruck, Stress und Bewegungsmangel. Etliche Autoren postulieren einen signifikanten Zusammenhang zwischen Lebensführung - besonders in Hinblick auf die Ernährungsweise - und der Inzidenz sogenannter Zivilisationskrankheiten, darunter besonders die Herz-Kreislauf-Erkrankungen [18; 91; 185; 319; 336].

In Frankreich liegt nach Untersuchungen die Inzidenz für Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse im Vergleich zu anderen Industrienationen trotz reichhaltiger Kost mit einem hohen Grad an Risikofaktoren (z. B. gesättigten tierischen Fettsäuren) auf deutlich niedrigerem Niveau. Dieser Umstand wird auch als "French paradox" bezeichnet [239; 344]. Mit anderen Worten: in Frankreich herrscht die niedrigste Sterblichkeitsrate durch koronare Herzkrankheit (KHK) in der gesamten westlichen Welt, obwohl im Bezug auf Risikofaktoren und Ernährungsgewohnheiten kein Unterschied besteht.

Ein gern herangezogener Erklärungsansatz ist, dass dort zum Essen häufig und regelmäßig Rotwein konsumiert wird [403]. Eine etwas abgewandelte Konstellation findet sich bei der in letzter Zeit ebenfalls häufiger zitierten "Kreta-Diät": fisch- und gemüsereiche Kost, wenig, überwiegend helles Fleisch, Olivenöl und Wein [59; 430] und in der japanischen und Okinawa-Küche (Reis, Fisch, Gemüse, fettarm).

Als mögliches Erklärungsmodell der beobachteten Schutzwirkung von Rotwein in Bezug auf kardiovaskuläre und auch andere Erkrankungen werden oftmals Polyphenole oder Flavonoide herangezogen, die vor allem in rotem Wein in hoher Konzentration vorkommen [146; 164; 190]. Zahlreiche epidemiologische Arbeiten zeigen, dass eine Korrelation zwischen beobachteter täglicher Flavonidaufnahme einerseits und verringerter Sterblichkeit an kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen andererseits besteht [189; 191; 219; 227]. Trotz überzeugender epidemiologischer Daten sind aber letztendlich die beteiligten Stoffe und molekularen Mechanismen, die bei Rotweingenuss protektiv wirksam werden könnten, unklar.

2. Der Rotwein:

Definition: "Wein: gesetzlich gesicherte Bezeichnung für das durch alkoholische Gärung aus dem frisch gepressten Beerensaft der Weinrebe hergestellte Getränk." [278]. Analytisch betrachtet ist Wein eine hydro-alkoholische Lösung, genauer eine wässrige Lösung von Ethanol und im Schnitt 15-30 g/l gelöster anderer Substanzen. Diese Stoffe können organischer oder anorganischer Natur sein, überwiegend handelt es sich um Zucker, Säuren, Ester, Mono- und Polyphenole, Aromastoffe, Salze und Spurenelemente [48; 164; 190; 225; 401].

2.1. Biologie und Geschichte

Die etwa 60 Millionen Jahre existierende Weinrebe *Vitis vinifera* gehört zur Ordnung der *Rhamnales*, Familie der Rebengewächse (*Vitaceae*) und ist für den Men-

schen von über fünfzig, vor allem in lichten Auwäldern vorkommenden Rebenarten der einzige bedeutsame Vertreter. Sie kommt nur in den gemäßigten Klimazonen der Erde vor. Botanisch ist die mehrjährige Pflanze eine Sprossranken-tragende Liane mit Lang- (Lotten) und Kurztrieben (Geizen), die Früchte sind wenigsamige Beeren. Die bekannten Rebsorten gehen vermutlich alle auf die wilde Urform *Vitis vinifera sylvestris* zurück. Die Pflanze begann ihre endgültige heutige Erscheinung aber erst seit etwa 5000 Jahren in der Obhut des Menschen anzunehmen [118]. Von den im Lauf der Zeit immer wieder neu herausgezüchteten Sorten (heute etwa 1500), sind immerhin noch etwa 400 für den Weinbau von Bedeutung.

Archäologische Funde von Gärbehältnissen und Traubenkernresten lassen auf eine erstmalige Herstellung weinartiger Getränke in der späten Jungsteinzeit (vor etwa 6500 Jahren) schließen. Von Mesopotamien und der südlichen Kaukasusregion über das ägyptische Reich und die Levante gelangte die Weinkultur schließlich nach Griechenland. Der Wein wurde meist stark geharzt oder mit Gewürzen versetzt und mit Wasser verdünnt getrunken. Mit Dionysos wurden Weinbau und kultischem Rausch ein eigener Gott gewidmet [168]. Griechische Händler und Siedler nahmen Wein und ihr Wissen darüber mit in ihre Kolonien (Schwarzmeerregion, Süditalien, Südfrankreich und Spanien). Den endgültigen Siegeszug trat der Wein dann im römischen Reich an: das beliebte Getränk wurde bis in die Nordprovinzen exportiert. Seit damals haben sich Anbau- und vor allem Produktionsmethoden und somit auch Geschmack und Bekömmlichkeit verändert. Die größten europäischen Weinproduzenten nach Produktionsmenge, Qualität und Bekanntheitsgrad sind heute Italien, Frankreich, Spanien und Deutschland, dicht gefolgt von außer-europäischen Erzeugern wie den USA (Kalifornien), Australien, Chile und Argentinien.

2.2. Produktion

Nach der Weinlese werden die Trauben, um Oxidationsvorgänge beim austretenden Traubensaft zu verhindern, möglichst schnell zum Verarbeitungsbetrieb bzw. Weinkeller gebracht. Dort wird das Erntegut in einer Traubenmühle leicht angequetscht und eventuell entstielt ('entrappt'). Im Gegensatz zu Weißwein (der aus weißen oder roten Trauben entstehen kann), bei dem der Most schnell und schonend abgepresst sowie anschließend von Trübeilchen getrennt, entschleimt und oftmals mit Rübenzucker angereichert wird, um die Kontaktzeit mit gerb- und farbstoffabgebenden Beerenhäuten und Kernen kurz zu halten, wird beim Rotwein die Maische zusammen mit den Häuten, Stielen und Kernen in Tanks zur Gärung gebracht. Der entstehende Alkohol löst die hier erwünschten Farbstoffe und Tannine heraus. Die Gärung, bei der vor allem Alkohol und CO₂ entstehen, kommt durch die außen an den Weinschalen anhaftenden Mikroorganismen und Hefepilze zustande, oft werden die natürlichen Hefen aber auch mittels Filter oder Zentrifuge entfernt und durch industriell vorgefertigte Trockenhefe ersetzt. Der Gärprozess findet unter kontrollierten Bedingungen statt: bei Weißweinen bei Temperaturen von 18-22°C, bei Rotwein in etwas höheren Temperaturbereichen (bei Temperaturen über 35°C entstehen allerdings zu viele flüchtige Säuren wie Essigsäure, die den Gärprozess vorzeitig zum Stehen bringen). Als nächster Schritt (beim Rotwein erfolgt zuvor noch eine Abtrennung des "Rohweines" von der Maische) folgt der Prozess der "zweiten" oder "Äpfelmilchsäure-Gärung". Hierbei handelt es sich allerdings nicht um eine wirkliche Gärung, sondern um die mikrobielle Verstoffwechslung von Malat zu Laktat und CO₂ - dadurch wird dieser noch sehr junge Wein milder und weicher.

Anschließend erfolgt, wenn nicht unbedingt Lage- und Sortenreinheit eingehalten werden soll, das Mischen (Verschnitt) von Weinen unterschiedlicher Lesegebiete und Rebsorten, um ein komplexeres und gefälligeres Endprodukt zu erzeugen. Der so entstandene Wein, insbesondere der Rotwein, durchläuft in der Regel noch eine gewisse Reifungszeit inahltank oder Holzfass. Besonders der qualitative "Ausbau" des Weines durch Zufügen von Eichenholzspänen oder die Lagerung in 250 l Fässern ist in den letzten Jahren bei vielen Weinproduzenten stark in Mode gekommen. Diese "Barriques" oder "Pièces" sind meist aus französischer, amerikanischer oder slovenischer Eiche gefertigt und bewirken neben der Weinoxidation durch Kontakt mit Luftsauerstoff und einem gewissen Alkoholverlust durch Verdunstung auch eine alkoholische Auslösung von Gerbstoffen, Terpenen, Anthocyan-Glykosiden, Chromanen sowie aromatischen Aldehyden und Carbonsäuren (z.B. Gallussäuren, Chromon, Flavonen, Quercetin, Zimtaldehyd, Vanillin, Ethylvanillin und Cumarin) aus dem Holz der Fassdauben, welche die ebenfalls schon in der Traubenmaische enthaltenen organischen Stoffe weiter anreichern können. Viele Weinproduzenten behelfen sich allerdings mit der preiswerteren Variante - einer zeitweiligen Zugabe von Eichenholz-Chips oder -spänen - um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen.

Rotwein ist somit ein Gemisch von vielerlei verschiedenen Verbindungen unterschiedlicher Stoffklassen, von denen nur ein Bruchteil untersucht ist - geschweige denn, dass deren Bioverfügbarkeit und mögliche pharmakologische Wirkung bekannt wäre. Das Ziehen auf Flaschen beendet den Produktionszyklus. In der Flasche kommt es aber bei längerer Lagerung weiterhin zu chemischen Umbau- und Reifeprozessen: der Säuregehalt nimmt allmählich ab und Tannine können sich an Farbstoffe anlagern und sehr große Moleküle bilden, die sich im Laufe der Zeit, ebenso wie vorhandenes Kaliumhydrogentartrat (Weinstein), am Boden absetzen können.

3. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems

3.1. Übersicht

Die häufigste Todesursache in Deutschland - noch vor malignen Erkrankungen - ist die koronare Herzkrankheit (KHK) mit ihren Folgen. Etwa 9% der Männer und 4% aller Frauen leiden daran. Ursache der koronaren Mangelversorgung ist eine durch morphologisch greifbare Gefäßwandveränderung, Atherosklerose, bedingte sukzessive Lumeneinengung und mögliche Infarzierung der Herzkranzgefäße [40]. Die Arteriosklerose - von vielen Autoren mit dem Begriff der Atherosklerose gleichgesetzt - ist ein Sammelbegriff für primär nichtentzündliche bzw. metabolisch verursachte Arterienerkrankungen. Streng *per definitionem* wird mit dem Begriff "Arteriosklerose" eine Gefäßwandverhärtung bezeichnet, deren Ursache eine gesteigerte Bildung von kollagenen Fasern und Proteoglykanen ist. Dieser Prozess findet besonders im Bereich der Intima, vor allem von Aorta und den großen Körperschlagadern, statt. Gerade in dieser Zone treten auch häufig Zellen auf, die Merkmale von glatten Muskelzellen (Myozyten) und Bindegewebsmatrix-produzierenden Fibroblasten in sich vereinen [365]. Sie leiten sich wahrscheinlich von normalerweise ruhenden subendothelialen Mesenchymzellen oder Mediamyozyten her.

Die Zellsysteme der Endothelzellen und diese "Myofibroblasten" sind strukturell metabolisch miteinander gekoppelt, unter anderem produzieren Endothelzellen Faktoren, die die Proliferation von Mediamyozyten hemmen [153]. Die Mediamyozyten/Myofibroblasten selbst liegen in einer gesunden Gefäßwand in kontraktile Form vor, der auch als k-Phänotyp bezeichnet wird. Der Myozytenverband ist

also in der Lage sich zu kontrahieren, aufgrund der endothelialen Hemmstoffe aber nicht, sich mitotisch zu teilen. Durch wiederholte Schädigungen der Endothelschicht kann diese Mitosebremse aber wegfallen. Die Mediamyozyten können sich dann in eine metabolisch aktive Form, den sogenannten m-Phänotyp, umwandeln. Dieser reagiert auf mitogene Reize und kann unter anderem große Mengen an faserhaltig-fibröser Grundsubstanz produzieren [66; 364; 365]. Der Wiedereintritt von Gefäßzellen in den Zellzyklus und dessen Fortschreiten wird als Schlüsselereignis von proliferativen Gefäßerkrankungen wie Atherosklerose sowie postangioplastischer Restenosierung angesehen [44; 45; 207].

Derartige Prozesse sind bis zu einem gewissen Grad auch Bestandteil der natürlichen Alterung eines Organismus und werden dann als "Physiosklerose" bezeichnet. Sowohl bei dieser altersabhängigen Abnutzungserscheinung, als auch bei den pathologisch gesteigerten Formen einer Arteriosklerose ("Pathosklerose") sind zunehmende Calciumsalzeinlagerungen nachweisbar [49]. Als arteriosklerotische Erkrankungen werden im allgemeinen klinisch-pathologischen Sprachgebrauch die Atherosklerose, die Mönckeberg'sche verkalkende Mediasklerose, die Arteriolsklerose sowie andere Manifestationen hypertoner Vaskulopathie bezeichnet [49].

3.2. Die menschlichen Blutgefäße

3.2.1. Histologie und Physiologie

Die Blutgefäßwand im menschlichen Körper besteht von innen nach außen aus drei Schichten: der *Tunica intima* ("Intima"), der *Tunica media* ("Media") und *Tunica externa* ("Adventitia"). Ihre wesentlichen zellulären Bestandteile sind die glatten Muskelzellen (Myozyten) und die Endothelzellen [246; 251]. Die physiologische Aufgabenverteilung der einzelnen Schichten ist im intakten Blutgefäß folgende:

Die innerste Schicht, die *Tunica intima*, dichtet das Gefäßlumen - vergleichbar der Fließenauskleidung eines Schwimmbeckens - lückenlos ab. Sie steuert so den Stoff-, Gas- und Flüssigkeitsaustausch, sowie durch bestimmte Oberflächenstrukturen immunologische Vorgänge (beispielsweise die Transmigration von Monozyten und Makrophagen) und ist endokrin tätig (u. a. NO, Endothelin, EDGF) [259; 261; 262]. Die *Tunica media*, bestehend aus zirkulär verlaufenden Bindegewebsstrukturen und Myozyten/Myofibroblasten, reguliert Lumenweite und die Blutbewegung, und über die *Tunica externa* (längsgerichtetes Bindegewebe und z.T. glatte Muskulatur) sind die Gefäße in ihre Umgebung eingebettet [251]. Entsprechend den abweichenden Anforderungen der verschiedenen Kreislaufabschnitte sind die Wandschichten bei Venen, Arterien und Kapillaren jeweils etwas unterschiedlich aufgebaut [26, 251].

3.2.2. Das Endothelium - Aufbau und Funktionen

Endothelzellen sind nicht nur die Innenbegrenzung der Blutgefäße, sondern haben noch zahlreiche andere Funktionen, die bei Störung oder Veränderung zur Atherogenese beitragen können:

Die Innenfläche der Blutgefäße wird von einer einfachen Zellschicht ('Monolayer') spindelförmiger bis polygonaler, abgeflachter und 50 bis 250 µm langer Endothelzellen lückenlos abgedichtet. Diese Zellen sind, wie das im Schichtverlauf folgende subendotheliale Bindegewebe, in Richtung des Gefäßverlaufs ausgerichtet. Diese Endothelzellen trennen das Kompartiment des Blutlumens durch dicht abschließende sogenannte *tight-junctions* ab und kontrollieren so Stofftransport und Zellmigration. An ihrer Unterseite sind sie fest über bestimmte Moleküle an die unter der Basalmembran liegende Bindegewebsmatrix gebunden [199; 201; 259].

Das Endothel sorgt durch Modulation des Gerinnungssystems für reibungslosen Blutdurchfluß, kann über Rezeptoren der Zelloberfläche Blutzellen andocken las-

sen oder Botenstoffe binden und durch Sezernieren unterschiedlicher Stoffe den Gefäßtonus beeinflussen [259; 261; 262].

Bei Verletzung der Integrität dieser innersten Schicht werden sowohl vasoaktive Stoffe frei, als auch die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt. Thrombozyten können an Kollagenfasern, die mit dem Blutlumen Kontakt bekommen, zu einem Thrombus aggregieren. Die wichtigsten Aufgaben des Endothels, sind im Folgenden nochmals zusammengefasst [nach 364]:

- Ausbildung einer möglichst nicht-adhärenenten Oberfläche für Thrombozyten und Leukozyten
- Bildung einer dichten Permeabilitätsbarriere, die den Austausch von Nährstoffen und Flüssigkeit zwischen Blutplasma und Arterienwand kontrolliert
- Aufrechterhaltung des Gefäßtonus durch die Abgabe kleiner vasodilatatorischer Moleküle wie NO und Prostazyklin (PGI₂) sowie vasokonstriktiv wirksamer Moleküle wie Endothelin (ET) und den Angiotensin-Regelkreis.
- Bildung und Sekretion einer Reihe von Wachstumsfaktoren und Cytokinen
- Bildung und Erhalt von Bindegewebsgrundsubstanz, inklusive der Basalmembran auf der sie verankert ist, von Collagenen, elastischen Fasern und Proteoglykanen
- Fähigkeit, Plasmasubstanzen chemisch oder strukturell zu verändern, wenn sie durch die Arterienwand transportiert werden (wie beispielsweise Lipoproteine, die durch Endothelzellen oxidiert werden können)
- Aufrechterhaltung einer nicht-thrombogenen Oberfläche durch die Bildung von Molekülen wie Heparinsulfat, PGI₂ und einer EctoADPase
- Gewährleistung der antikoagulanten und prokoagulant Funktionen (bei Gefäßverletzungen) im Kreislaufsystem.

3.3. Atherosklerose

3.3.1. Definition

Die WHO definierte die Atherosklerose als “variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [462].

3.3.2. Risikofaktoren und Ätiologie

Kausalpathogenetisch wichtige Einflüsse bei der Entstehung der Atherosklerose werden als Risikofaktoren bezeichnet. Mit diesem klinisch bedeutsamen Begriff werden exo- und endogene Faktoren bezeichnet, deren Vorhandensein als statistisch signifikant für die Pathogenese atherosklerotischer Erkrankungen erkannt wurde. Sie werden in der Regel, der beigemessenen Wichtigkeit entsprechend, in Klasse I-, Klasse II-, sowie unbeeinflussbare Risikofaktoren eingeteilt [49; 142; 188]:

► Klasse I:

- Zigarettenkonsum:

hemmt die NO-Freisetzung aus Endothelzellen, beeinträchtigt den Blutcholesterinspiegel, der CO-Gehalt kann an ischämischen Gewebsschädigungen beteiligt sein, außerdem können mutagene Substanzen wie Superoxide auf den Proliferationsstoffwechsel des Endothels Einfluß nehmen [5; 184]. Bei gleichzeitiger Einnahme oraler Kontrazeptiva besteht ein erhöhtes Atheroskleroserisiko.

- Hyperlipidämie und Fettstoffwechselstörungen:

Den wichtigsten Faktor scheint hierbei die Hypercholesterinämie [406; 408] darzustellen, aber auch erhöhte LDL- und VLDL-, sowie erniedrigte HDL-Werte zeigen ein erhöhtes Risiko an.

VLDL nimmt in Leber und Darm synthetisierte Lipide (Triglyceride und Cholesterin) auf, um sie in die Peripherie zu transportieren (von den Gefäßendothelien werden z.T. Lipoproteinlipasen sezerniert, die den Abbau des Fettanteils von Chy-

lomikronen und VLDL in die Wege leiten). HDL nimmt in der Peripherie Cholesterin und Phospholipide auf und transportiert sie Richtung Leber (obwohl es u. U. auch umgekehrt Cholesterinester an VLDL und LDL abgeben kann). In der Regel wird also durch HDL eine vermehrte LDL-Aufnahme in die Körperzellen unterdrückt und somit eine Cholesterinanhäufung verhindert. Es wird deshalb zu den Protektivfaktoren gerechnet [111; 244].

Unter den genetisch bedingten Faktoren sind besonders die Apolipoprotein-Polymorphismen (hier v.a. ApoEε4-Polymorphismen) zu nennen [126; 195].

- Arterielle Hypertonie:

Bei der Hypertonie spielen nicht nur die veränderten hämodynamischen Komponenten, sondern teilweise auch die begleitenden genetischen Faktoren eine Rolle in der Atheroskleroseentstehung. Da bei Männern mit hohen Triglycerid- und niedrigen HDL-Cholesterinwerten das Risiko für eine KHK in Studien nicht direkt mit dem Niveau von systolischem und diastolischem Blutdruck korreliert, ist strittig, ob sich eine Blutdrucksenkung oder aber eine Therapie der Dyslipoproteinämie stärker auf die KHK-Risikosenkung auswirkt (für Patienten mit Dyslipoproteinämie sollte der Blutdruck gesenkt werden, um das Schlaganfallrisiko zu reduzieren, bei Hypertonikern ist es aber wohl therapeutisch sinnvoll, nicht nur den Blutdruck, sondern mehrere Risikofaktoren - siehe unten - mit zu therapieren, um das Risiko für eine ischämische Herzerkrankung zu minimieren).

- Diabetes mellitus: neuere Studien deuten darauf hin, dass den postprandialen Blutzuckerwerten, insbesondere hinsichtlich der Spätkomplikationen Mikroangiopathie und Atherosklerose, eine besonders große Bedeutung zukommt [73]. Dies ist für den Diabetiker und seinen behandelnden Arzt insofern wichtig, als die postprandialen Werte weniger stark in den HbA_{1c}-Wert einfließen als die Nüchternwerte.

- Hyperhomocysteinämie: die Aminosäure Homocystein kommt als Zwischenprodukt im Methionin-Stoffwechsel vor. Der Plasmaspiegel ist primär abhängig vom Ernährungsverhalten, von genetisch regulierten Spiegeln essentieller Enzyme sowie der Zufuhr von Vitaminen und Spurenelementen, aber auch Faktoren wie Niereninsuffizienz, höheres Lebensalter sowie gewisse Noxen oder Chemotherapeutika (z. B. N₂O, MTX) können eine Rolle spielen [79; 414; 440; 461]. Pharmakotherapeutische Ansatzmöglichkeiten zur Regulation erhöhter Homocysteinspiegel scheint die kombinierte Gabe von Folsäure, Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin) oder Betain darzustellen [112].

- Hyperfibrinogenämie

► Klasse II:

Folgende Punkte treten meist kombiniert und oft mit Klasse I-Faktoren zusammen auf (oft subsummiert unter "ungesunder Lebensweise" oder "metabolischem Syndrom") und sind daher statistisch schwerer greifbar.

- Adipositas:

Ein wichtiger Mechanismus, der Übergewicht mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko verbindet, ist - neben Kreislaufbelastung, mangelnder Bewegung, Hyperlipidämie und verschobener endokriner Parameter - eine durch Übergewicht beeinflusste Funktionsstörung des Gefäßendothels, die auch durch kurzfristigen, moderaten Gewichtsverlust nicht zu beheben ist [47].

- falsche Ernährung:

Hierunter zählen v. a. eine dauerhaft erhöhte Kalorienzufuhr, tierische Fette (hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren) und eine dauerhaft erniedrigte Aufnahme pflanzlicher Ballaststoffen (wie α-Glucane, die einen Teil an Cholesterin und Triglyceriden schon im Darm binden sollen). Auch die regelmäßige Zufuhr von Antioxidantien (z. B. Ascorbinsäure und α-Tocopherol) soll (beispielsweise durch Ein-

schränkung der Oxidation von aufgenommenen Nahrungsfetten) protektiv wirken [405; 407].

- Stress
- Bewegungsmangel
- Typ A-Persönlichkeit (Ehrgeiz, Hektik, Aggressivität)
- Hyperurikämie

► unbeeinflussbare Risikofaktoren:

- Lebensalter
- Geschlecht

Geschlechtsreife Frauen weisen höhere HDL- und niedrigere LDL-Spiegel auf als Männer, sie haben daher (falls Nichtraucherin und keine Einnahme oraler Kontrazeptiva) ein niedrigeres Atheroskleroserisiko. Diese in weiten Bereichen noch wenig aufgeklärte physiologische Schutzwirkung wird durch die Wirkung von Östrogenen erklärt, da sie in der Postmenopause zurückgeht.

- Genetische Faktoren

Sie treten oft bei der Untersuchung besonders junger Patienten oder durch eine "familiäre Infarktanamnese" zutage. Als besonders gefährdet gelten Patienten mit einer Hyperlipoproteinämie der Typen II (Hypercholesterinämie) oder IV (Hypertriglyceridämie), mit Homocystinurie [79; 414; 461] sowie Hyperurikämie (Gicht) - eine kausale Bedeutung kommt der Harnsäure bei der Entstehung der Atherosklerose aber vermutlich nicht zu (möglicherweise wird die Abgabe von Lipoproteinlipasen durch Gefäßendothelium und Leber beeinträchtigt) und eine Therapie der Hyperurikämie scheint keinen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Gefäßsklerosierung zu haben.

Als unabhängiger Risikofaktor wird weiterhin ein erhöhter Plasmafibrinogenspiegel gewertet [121]. Auch Gewebsthromboplastin (Tissue Factor) scheint eine Rolle bei der Atherogenese zu spielen [422]. Sind zwei Risikofaktoren erster Ordnung vorhanden, ist das Infarktrisiko im Vergleich mit der Normalpopulation vervierfacht, bei drei Risikofaktoren steigt das Risiko schon um den Faktor zehn [142; 188].

Bei primären Formen der Atherosklerose ist die Ätiologie weitgehend ungeklärt, bei den sekundären Formen sind in der Vorgeschichte meist länger andauernde metabolische, entzündliche oder physikalische Gefäßwandschäden beschrieben, die progredient in Umbau und Sklerosierung des Gefäßes münden. Zur Diagnostik und Therapie von Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit sind in den letzten Jahren neue Standards etabliert (z.B. Katheteruntersuchungen, Herzsintigraphie, neue biochemische Marker) sowie neue Ansätze in Diagnostik [183; 284] und Therapie angedacht worden, wie beispielsweise die *long-term release*-Beschichtung von Koronarstents mit Chemotherapeutika wie Ciclosporin oder Rapamycin, bzw. die Verhinderung von Restenosen nach Angioplastie durch den Einsatz von Antisense-Oligodeoxynukleotiden gegen Regulatorgene des Zellzyklus [291] oder Ansätze in Gentransfermodellen [70].

3.3.3. Pathogenese

Obwohl unterschiedliche Theorien zur Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose existieren (injury-response-Modell, chronischer Entzündungsprozeß oder Immundysregulation, bakterielle Dauerinfektion [20; 254; 408; 410]) sind die einzelnen Vorstellungen dabei aber doch recht ähnlich. Als "Atherosklerose" im eigentlichen Sinne wird meist eine fortschreitende Lipideinlagerung in die Arterienwand bezeichnet, deren Ursachen v. a. in einem gestörten Lipoproteinstoffwechsel zu suchen sind.

Von den nach Aufnahme aus dem Darmlumen im Blut zirkulierenden Lipoproteinkörpern (Chylomikronen, VLDL, LDL und HDL) können nur LDL und HDL die Endothelschranke überwinden, da diese Molekülgebilde wegen ihrer relativ geringen Größe (200 respektive 100 Å) durch Vermittlung der vorhandenen endothelialen Transportvesikel vom Gefäßlumen ins Subendothel transportiert werden [111]. Weiter innerhalb der Gefäßwand werden die Lipoproteine dann durch den in der Media bestehenden Flüssigkeitsstrom weiterbefördert oder auch durch rezeptorgesteuerte Endozytose von Myozyten aufgenommen. Ein gesteigertes Anfluten des stark cholesterinreichen LDL im Blutstrom führt somit auch zu einer Konzentrationserhöhung dieses Lipoproteins in den Gefäßwänden. HDL ist, wie im vorigen Kapitel erwähnt, in der Lage, als sogenannter "protektiver Faktor" einen gewissen Cholesterinüberschuß aufzunehmen und von der Peripherie Richtung Leber zu transportieren, wo dieses u.a. für die Gallensäurebiosynthese benötigt wird [111; 244]. Eine längerfristige Erhöhung der LDL-Konzentration ist mit einer erhöhten Verweilzeit dieses Stoffes sowohl im Blut, als auch im vaskulären Interstitium verbunden. Im Bereich der Gefäßwand kann LDL auch dann vermehrt angereichert werden, wenn der oben angeführte interstitielle Flüssigkeitsstrom durch fortgeschrittene arteriosklerotische Kollagenfaser- und Proteoglykanbildung stärker beeinträchtigt wird. Auch ein primäres Intimaödem wäre als Erklärung denkbar: durch eine Vorschädigung (z. B. ausgelöst durch arteriellen Hypertonus) würden Wasser und Plasmabestandteile eingepreßt und es kommt zu einer ödematös-gelatinösen Verquellung der Intima, die Stofffluss und Metabolismus beeinträchtigt [111]. Solche "liegendebliebenen" LDL-Moleküle verändern sich chemisch, sie "altern", d.h. sie werden oxidiert. Das dabei entstehende oxidierte LDL wird oxLDL abgekürzt.

Monozyten und Makrophagen werden durch Chemokine, chemotaktische Lockmoleküle wie MCP-1, die unter anderem von den Endothelzellen der betroffenen Region ausgeschüttet werden [6], angezogen. Makrophagen, die von in die Gefäßwand eingewanderten Blutmonozyten abstammen, besitzen spezielle Scavenger-Rezeptoren, die überschüssiges denaturiertes LDL binden und phagozytieren können [315]. Diese Lipidspeichermakrophagen sammeln sich vor allem im Bereich der Intima, zunächst vereinzelt, später zunehmend herdförmig an, was pathomorphologisch als Lipidplaque sichtbar wird [122]. Aufgrund des schaumigen Aspekts ihres Cytoplasmas bei zunehmender intravakuolärer Anhäufung oxidierten LDLs werden diese Makrophagen auch als Schaumzellen bezeichnet. In den Schaumzellen durchläuft der Großteil der aufgenommenen Lipoproteine eine saure Hydrolyse in den Lysosomen, es entstehen Aminosäuren, Glycerin und Fettsäuren. Das beim Hydrolyseschritt aus Cholesterinestern freigesetzte Cholesterin kann von den Makrophagen nicht weiter verstoffwechselt werden und fällt bei ausreichend hoher Konzentration als Kristalle aus, ein Vorgang der schließlich auch die Integrität auch der umgebenden Zellen schädigt. Aus diesem Grunde gehen ältere Schaumzellerherde oft in Nekrose über, wobei ein Großteil des phagozytierten Materials, überwiegend Cholesterin, in kristalliner Form freigesetzt wird. So entsteht ein Herd mit einer zentralen, fettigen Detritus enthaltenden nekrotischen Zone, der von noch vitalen Schaumzellen umgeben ist. Eine solche Konstellation wird als stabile atherosklerotische Plaque oder Atherom bezeichnet [123]. Oftmals beginnt, besonders bei älteren Menschen, zusätzlich ein ausgeprägter sklerosierender Prozess durch Einlagerung von Calciumsalzen. Die atherosklerotische Plaque wird dann von einer sklerosierenden Zone der schon erwähnten proliferierten Myofibroblasten mit aktinhaltigem Cytoskelett eingeschlossen [215]. Diese aktivierten Myofibroblasten einer atherosklerotischen Plaque leiten sich von einer einzigen Mutterzelle her. Die starke Proliferation und Umwandlung zum m-Phänotyp erfolgt wahrscheinlich fol-

gendermaßen: das im gesunden System antikoagulatorisch wirksame Endothel über der atherosklerotischen Plaque wird, auch wenn strukturell noch intakt, in eine partiell prokoagulatorisch wirkende Schicht umgewandelt [364]. Die durch oxLDL aktivierten Plaquemakrophagen geben zunehmend proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 ab. Diese bringen zum einen Endothelzellen dazu, Endothelin-1, Plättchenaktivierungsfaktor (PAF) sowie einen Inhibitor des Plasminogenaktivators freizusetzen, zum anderen bewirken sie ein - wenn auch geringfügiges - Begleitinfiltrat von T-Lymphozyten [215; 252; 253]. Zusätzlich werden Thrombozyten aktiviert. Eine besondere Rolle spielt vermutlich das sowohl vasokonstriktorisch als auch mitogen wirkende Endothelin-1 (es kann sowohl von Endothelzellen, Makrophagen als auch den Myofibroblasten selbst gebildet werden [254]). Auch von den Plaquemakrophagen produzierte mitogene Faktoren und die von den Lymphozyten sezernierten Zytokine haben eine stark myozytenproliferative Wirkung [43; 153; 252; 253]. Im perivaskulären Bereich kann es außerdem sekundär zur Ausbildung von erweiterten Räumen der Größe von 500-1000 μm^3 , sog. Kriblüren oder Lakunen Typ III kommen, was weitere Instabilität der betroffenen Regionen bedeutet [331].

Im weiteren Verlauf reißt schließlich die Endotheldecke über der fettreichen Plaque ein (Plaquesfissur): es kann nachfolgend zu Einblutungen in die Plaque kommen. Die Folge ist eine intramurale Gerinnselbildung durch Thrombozytenaggregation und Thrombinbildung, gleichzeitig kommt es aber auch zur Freisetzung weiterer Myofibroblasten-Mitogene. Falls die Plaquesfissur nicht abheilen kann und es zu weiteren Einbrüchen der Gewebsdecke kommt, entsteht ein atherosklerotisches Ulkus. Auf dieses Ulkus kann sich sekundär ein Thrombus aufpropfen, der anfänglich das Gefäßlumen nur einengt (im Falle koronarer Beteiligung kann eine Angina pectoris-Symptomatik auftreten), es aber im weiteren Verlauf auch ganz verschließen kann (manifeste Infarkt). Bei weiterer Progredienz der Sklerose erschöpft sich die proliferative Aktivität der Mediamyozyten, die Umgebung des Atheroms wird zellarm, faserreich und verhärtet durch die Einlagerung von Calciumsalzen. Durch die damit verbundene Gefäßwandschwäche ist schließlich auch die Ausbildung eines atherosklerotischen Aneurysmas möglich [49; 142].

Einige Autoren sehen als Ursache des chronisch entzündlichen und degenerativen Krankheitsprozesses der Atherosklerose und verwandter Erkrankungen eine Immunmodulationsstörung bzw. eine chronische Entzündung beispielsweise durch eine persistierende Chlamydieninfektion im Bereich der Gefäßwand [20; 254; 410]. Auch ein möglicher Zusammenhang in der Ätiologie und Pathogenese von atherosklerotischen Prozessen und *M. Alzheimer*, beides Erkrankungen mit längerer Latenzperiode, wird in jüngerer Zeit diskutiert [62; 94; 361]: so soll der *M. Alzheimer* möglicherweise als sekundärer Prozess in der Folge atherosklerotischer Geschehnisse in intrakranialen [361] oder extrakranialen Gefäßen [195] auf der Basis einer prolongierten Minderperfusion [94] oder Infarzierung [445] entstehen. Auch mutmaßlich toxische Effekte einiger Gefäß-Faktoren auf die Mikrogefäßversorgung empfindlicher Hirnregionen (wie dem medialen *Lobus temporalis*) wurden in diesem Zusammenhang diskutiert [125]. Auch andere Beobachtungen, wie ein weitgehend übereinstimmendes Risikofaktoren-Profil [62], (neo-)angiogenetische Prozesse [438] oder auch vergleichbar positive Effekte beim Einsatz verschiedener pharmakologisch aktiver Substanzklassen (antiinflammatorische NSAIDs, Statine, Antioxidantien wie EPCG) bei beiden Erkrankungen lassen vermuten, dass es sich - bei letztendlich ungeklärter Ätiologie (Störungen der Immunregulation, prolongierte Entzündungsprozesse, chronische Infektion, genetische Komponenten) doch um konvergente Krankheitsprozesse handeln könnte [62].

3.3.4. Molekulare Mechanismen bei Myokarduntergang und Revaskularisierung

Man beginnt gerade erst zu verstehen, welche molekularen intra- und interzellulären Regulationsmechanismen eine Rolle spielen, wenn es bei einem KHK-Patienten infolge fortgeschrittener Atherosklerose mit nachfolgender Infarktzierung nicht zu einem großflächigen irreversiblen Myokarduntergang oder zu Reperfusionsschäden kommt, sondern solche Schädigungen nur geringfügig ausgeprägt auftreten oder eine Revaskularisierung erfolgt. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Reduktion ischämischer Schäden (wie die VEGF-gesteuerte Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Ödembildung) wahrscheinlich über eine Inhibition von c-Src verursacht wird. Die Angiogenese im durch ein Infarkt-ereignis geschädigten Myokard verläuft dagegen vermutlich über ein Zusammenspiel von Freisetzung verschiedener Transkriptionsfaktoren (wie Stat3, Pax-5, NFκB, TFIID und SP1) und Aktivierung antiapoptotischer Gene beispielsweise für Bcl-2 und Survivin [152].

4. Das französische Paradoxon: Was ist die Ursache für die mutmaßlich protektive Wirkung auf die Gesundheit?

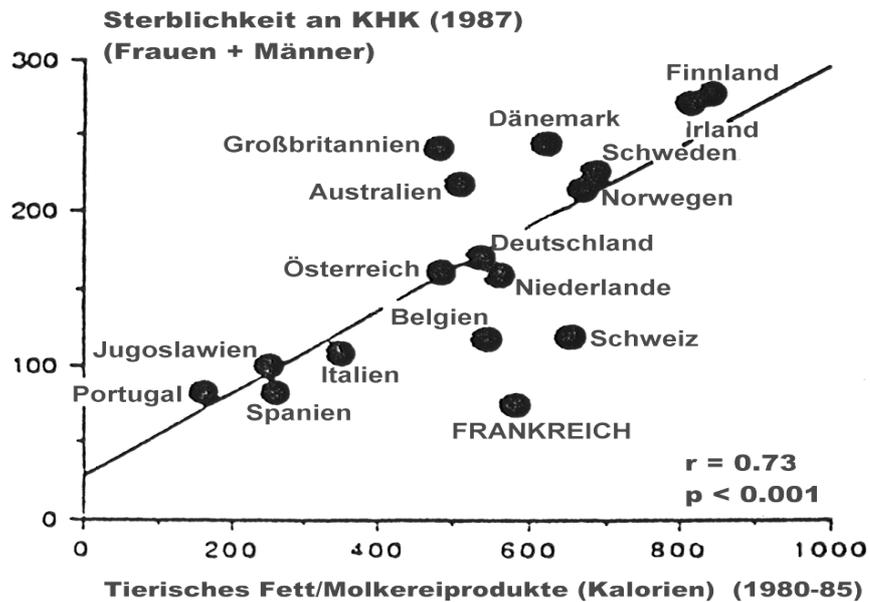
4.1. Der Wissensstand

Eine Reihe epidemiologischer Untersuchungen wiesen auf eine graphisch U-förmige Beziehung zwischen mäßigem Alkoholkonsum und der Sterblichkeit an koronarer Herzerkrankung hin. Dieses Phänomen, das in der Literatur gemeinhin mit dem Schlagwort "French paradox" bezeichnet wird, könnte also mit Rotwein bzw. einigen seiner Inhaltsstoffe zusammenhängen, zumal für einen wirklich als gefäßprotektiv anerkannten Faktor - das HDL-Cholesterin - in Frankreich keinesfalls höhere Blutwerte gemessen wurden als in den Vergleichsländern. Dem Rotwein bzw. einigen seiner Inhaltsstoffe werden von verschiedener Seite gewisse „positive“ oder protektive Eigenschaften (sowohl bei Reisediarrhoe als auch im Bezug auf Atherosklerose- und sogar Tumorprotektion [404]) beigemessen.

4.1.1. Epidemiologische Daten

Die Ergebnisse des MONICA-Projektes der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 1989 [463]) zeigten, dass die Mortalitätsrate ischämischer koronarer Ereignisse in Frankreich (besonders für Frauen) eher der in China oder Japan als der vergleichbarer westlicher Industrienationen nahezukommen scheint. Dieses Ergebnis ist daher interessant, weil auch der Franzose im Schnitt mindestens 15 % der aufgenommenen Tagesenergiemenge durch gesättigte Fette abdeckt, und die untersuchten Cholesterin-Serumkonzentrationen sich nicht von den Werten in Großbritannien oder den USA unterscheiden. Auch andere Risikofaktoren wie Hypertonus, Rauchen, wenig körperliche Bewegung und Übergewicht kommen in Frankreich laut der Untersuchung im Vergleich mit anderen westlichen Industrienationen keineswegs minder häufig vor.

Renaud und De Logeril zeigten in einer Auswertung statistischer Daten der WHO und der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) von 1980 bis 1985 u. a., dass unter verschiedensten Nahrungsmitteln eigentlich nur die regelmäßige Aufnahme tierischen Fettes (v.a. aus Molkereiprodukten und Fleisch) signifikant positiv mit der Sterblichkeitsrate an koronarer Herzkrankheit korreliert [342; 344]. Sie zeigten weiterhin mit der Auswertung von Statistiken aus 17 Ländern (MONICA-Studie) mit erfassbarem Weinkonsum der Bevölkerung, dass die Korrelation der Ereignisse 'Tod durch KHK' und 'regelmäßige Aufnahme von tierischem Fett' hochsignifikant ist.

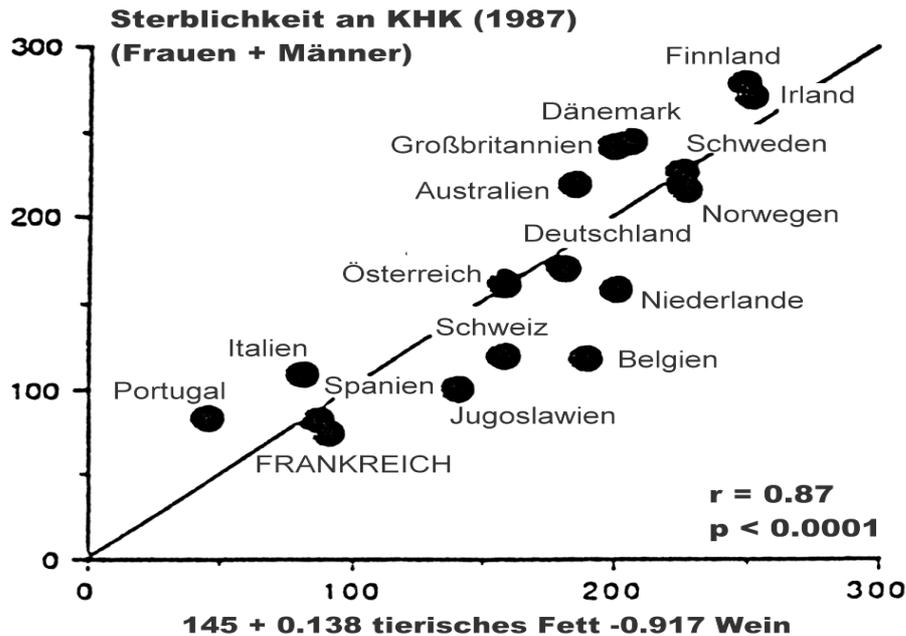


[Regressions-Gleichung: $y = 26.3 + 0.27$ tierisches Fett]

Abb. 1: Relation der altersstandardisierten Mortalitätsrate durch KHK zum Konsum tierischer Fette in Ländern mit Weinkonsum [nach Renaud u. de Logeril, [344], bearbeitet]

Für Frankreich kommt der Datenpunkt des Graphen (Abb. 1) in einigem Abstand von der Regressionslinie zu liegen, d.h. trotz des Konsums tierischer Fette in Frankreich ähnlich dem in Deutschland, Großbritannien oder Australien, ist die Mortalitätsrate für koronare Herzkrankheit niedriger (für Großbritannien scheint im Gegensatz dazu - zumindest was diese eine Statistik betrifft - sogar ein "umgekehrtes Paradoxon" zu bestehen).

Eine von den Autoren weitergeführte stufenweise Multivarianzanalyse ergab, dass in den 17 Ländern, für die Weinkonsum erfasst werden konnte, dieser neben der Aufnahme tierischer Fette der einzige Faktor ist, der ebenfalls signifikant mit der Sterblichkeitsrate korreliert.



[Regressions-Gleichung: $y = 145 + 0.138 \text{ tierisches Fett} - 0.917 \text{ Wein}$]

Abb. 2: Relation der altersstandardisierten Mortalitätsrate durch KHK und Konsum von tierischem Fett und Wein [nach Renaud u. de Logeril, [344], bearbeitet]

Bei dieser Abbildung liegt der Datenpunkt für Frankreich jetzt nahe der Regressionslinie und zeigt keine „paradoxe“ Abweichung verglichen mit anderen Ländern mehr. Dies lässt vermuten, dass die negativen Effekte der gesättigten Fette auf den Organismus und besonders das Kreislaufsystem durch den Weingenuß aufgefangen werden. Zusätzlich zeigt die größere Signifikanz in Abb. 2, dass eine postulierte schützende Wirkung des Weines auch für die Schweiz und andere Industrienationen zu gelten scheint (das "umgekehrte Paradoxon" Großbritanniens, das in Abb. 2 nicht mehr zu erkennen ist, wäre demnach vielleicht mit dem relativ niedrig anzusetzenden Weinkonsum in dieser Region zu erklären). Die Quintessenz der epidemiologischen Betrachtungen von Renaud und de Logeril ist zusammenfassend die Aussage: "Das französische Paradoxon ist auf Weinkonsum zurückzuführen". Diese Hypothese wird indirekt durch weitere Daten, erhoben in den beiden Populationen mit der welthöchsten Lebenserwartung, den Kretern und den Japanern (Okinawa), gestützt [34; 216; 235; 463; 467]. Beide Völker zeigen neben Eigenheiten in der Ernährung, zumindest statistisch, einen moderaten Alkoholkonsum: die Kreter im Schnitt 20 g/Tag (hauptsächlich in Form von Wein) [235], die Japaner 28 g (überwiegend Bier und Sake) [216].

Es wurden bislang sieben epidemiologische Studien veröffentlicht, die sich mit der Korrelation von Flavonoid- oder Rotweinaufnahme und dem Auftreten von sowie der Sterblichkeit an kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen beschäftigten:

- Zutphen Elderly Study, 1993, NL [189]
- The Hawthorn Study, 1994, D [381]
- The Seven Countries Study, 1995 [190]
- The Zutphen Stroke Study, 1996, NL [219]
- Cohort Study in Finland, 1996 [227]
- Studie über KHK-Mortalität bei männlichen Ärzten, 1996, USA [356]
- Harvard Drinking Pattern and Coronary Heart Disease Study, 2003, USA [293]

Mit Ausnahme der vorletzten zeigten alle Studien einen positiven Zusammenhang zwischen täglicher Flavonoid- bzw. Rotweinaufnahme und verbesserten Gefäßpa-

rametern bzw. herabgesetzter koronarer Sterblichkeit. In der letztgenannten Studie (über 12 Jahre durchgeführt an 38 077 im Gesundheitswesen Tätigen) erwies sich allerdings keines der untersuchten alkoholischen Getränke (Rot- und Weißwein, Bier oder harte Alkoholika) im Hinblick auf eine mögliche koronare Protektion als den anderen überlegen.

4.1.2. Alkoholika: Ethanol als möglicher alleiniger Effektor

4.1.2.1. Epidemiologische Studien zum protektiven Effekt alkoholischer Getränke

- Andere Studien haben sich mit der dargelegten umgekehrt proportionalen Beziehung von mäßigem Alkoholkonsum und KHK beschäftigt. Eine Untersuchung mit 51000 Männern zeigte beispielsweise, dass mäßiger Alkoholkonsum (Mengen von 20-50 g täglich) das Risiko für koronare Herzkrankheit senken kann [355]. Weiterführende Studien zur gleichen Thematik ergaben, dass dieser protektive Effekt des Alkohols bei Männern und Frauen [248], bei älteren Menschen [82], Rauchern wie Nichtrauchern [148; 355] und angeblich sogar in Bezug auf die Gesamtsterblichkeitsrate [248] Wirkung zeigt. Andererseits steigt das Mortalitätsrisiko bei regelmäßigem Konsum großer Mengen Alkohols an, besonders bei regelmäßigen Exzessen ('binge drinking') oder sogenannten 'Wochenendalkoholikern' [149; 232].
- Mehrere Untersucher, vor allem aus den USA, bescheinigen Bier, Wein und Spirituosen gleichermaßen protektive Eigenschaften in Bezug auf das Herz-Kreislauf-System: Eine dieser Studien räumt allerdings nur Wein und Bier (im Gegensatz zu stärkeren Spirituosen) bei einer Population von Nichtrauchern eine Schutzwirkung ein [149; 205; 293; 355].
- Vergleicht man, wie Rimm und Mitarbeiter in ihrer statistischen Bearbeitung von WHO MONICA-Daten, die Sterblichkeit an koronarer Herzkrankheit in Toulouse/F mit der in Stanford/USA, kann man eine Reduktion um 57% (78 versus 182/100 000 Untersuchte) ausmachen [355]. Der durchschnittliche von den Untersuchern ausgemachte Alkoholkonsum wird hierbei für Toulouse mit etwa 38 g/Tag angegeben (34 g davon in Form von Wein), der in Stanford konnte aus nicht beschriebenen Gründen nicht genau ermittelt werden, wird aber um einiges niedriger angesetzt. Nimmt man in der Studie die Städte Glasgow/GB und Belfast/GB noch mit in den Vergleich, wird die Absenkung der KHK-Sterblichkeitsrate in Toulouse noch augenfälliger, sie beträgt dann sogar 79%. Falls dieser Schutzeffekt wirklich durch die unterschiedlichen Trinkgewohnheiten zu erklären ist, wird postuliert, dass Wein größeren protektiven Einfluß als andere alkoholische Getränke besitzt, da Rotweinkonsum - wohl aber nicht der anderer Alkoholika - in Belfast, Glasgow und Stanford mit großer Wahrscheinlichkeit um einiges niedriger anzusetzen ist als in Toulouse.

MONICA-Zentrum	jährliche KHK-Sterblichkeit/ 100 000 Bevölkerung		mittleres Serum-Cholesterol (mg/dl)		mittlerer systolischer Blutdruck (mm Hg)		Anteil an regelmäßig Rauchenden (in %)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
	Lille, F	105	20	252	248	139	135	39
Strasbourg, F	102	21	218	216	145	137	34	15
Toulouse, F	78	11	230	224	133	128	37	17
Belfast, GB	348	88	232	236	135	132	34	33
Glasgow, GB	380	132	244	248	138	134	52	50
Schweiz (Durchschnittswert)	103	17	248	232	132	126	32	21
Stanford, USA	182	48	209	205	128	124	40	37
Beijing, VC	49	27	163	166	130	129	50	16

M = Männer
F = Frauen

Tab.1: altersstandardisierte jährliche Sterblichkeit an KHK unter Einbeziehung von Risikofaktoren bei ausgewählten Bevölkerungsgruppen der WHO MONICA-Studie (nach Renaud u. de Logeril sowie WHO) [342; 463]

- Wein wird im mediterranen Kulturkreis zum Essen konsumiert, somit eher verlangsamt aufgenommen und Ethanol oder andere Rotweininhaltsstoffe haben folglich einen verlängerten protektiven Effekt (auch oder gerade wenn die Nahrungsfette vom Körper aufgenommen werden und ihre teilweise negativen Auswirkungen beispielsweise auf Thrombozyten [151; 303], einsetzen).

4.1.2.2. Hypothesen zu einer ausschließlichen Schutzwirkung durch Ethanol

Die Hypothesen über die möglichen Mechanismen des alleinigen protektiven Effektes des Ethanols untersuchter Alkoholika haben unterschiedlichste Ansätze, sind aber alle nicht hundertprozentig überzeugend.

- Es wurde gezeigt, dass der Schweregrad der Atherosklerose nicht zwangsläufig mit der aufgenommenen Alkoholmenge korreliert [290].
- Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass das Fortschreiten arterieller Läsionen eher durch hohe ($\geq 36\%$ der aufgenommenen Tagesenergiemenge) [366] als durch niedrige Alkoholaufnahme (10% der Tagesenergiemenge) verhindert wird [23; 24], ebenso wie Alkoholiker mit vorbestehender alkoholinduzierter Leberschädigung/Leberzirrhose eine geringere Atherosklerose-Inzidenz aufweisen sollen als lebergesunde Kontrollpersonen [290].
- Auch der postulierte Anstieg von HDL-Cholesterin durch Alkoholeinfluss als Erklärungsmodell konnte bisher nicht befriedigend nachgewiesen werden, die Konzentration der antiatherogenen Fraktion apoA I scheint durch Alkoholkonsum sogar eher gesenkt zu werden [24, 245, 290, 332].
- Andere prospektive [23] oder Case-Control-Studien [467] ergaben, dass mäßige Alkoholaufnahme Myokardinfarkte und somit rückschließend wohl auch eine auch Koronar-Thrombose, nicht aber stabile Angina pectoris [467] (die ja primär das Ergebnis atherosklerotischer Läsionen ist) verhindern kann. Auch ist der rasche Verlust des KHK-Schutzes, der bei ehemaligen Alkoholikern beobachtet wird, sehr wahrscheinlich nicht auf eine gesteigerte Atheroskleroserate zurückzuführen, da diese eher als ein chronisch progredienter Prozess zu werten ist [467].

- Schließlich scheint gesteigerter Alkoholkonsum auch das Risiko für eine Subarachnoidalblutung zu erhöhen [110] - eine Beobachtung, die wiederum für einen möglichen Zusammenhang zwischen Ethanolaufnahme und Blutgerinnung sprechen könnte.

Unter den an der Blutgerinnung beteiligten Faktoren spielen die Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Entstehung thrombotischer Gefäßverengungen. Inzidenz und Prävalenz einer KHK korrelieren u. a. mit einer erhöhten Plättchenaggregabilität. Pharmakologische Substanzen wie Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, oder die GP IIb/IIIa Rezeptor-Inhibitoren die die Thrombozytenaggregation hemmend beeinflussen [120, 425] und werden als Basistherapeutika beispielsweise in der Infarktnachsorge eingesetzt.

- Tatsächlich hemmt die Aufnahme oder Infusion von Alkohol die Thrombozyten-Aggregation beim Menschen. Im Tierversuch reduziert die Zugabe von 4-6% Ethanol zur Trinkflüssigkeit bei Ratten ebenfalls die Aggregationsneigung - ein Effekt der zwar schnell eintritt, aber nach Alkoholentzug ebenso schnell wieder verschwindet und dann sogar Rebound-Effekte zeigt [339].
- Eine *ex vivo* - Studie zu dieser Thematik durchgeführt mit 1600 Patienten in Wales ergab, dass die Thrombozytenaggregation nach ADP-Stimulation durch Alkohol ebenfalls gehemmt wird und zwar durch die gleichen konsumierten Mengen, die zuvor als KHK-protektiv beschrieben wurden [355]. Zusätzliche Ethanol-Effekte auf Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen) oder auch die fibrinolytische Aktivität können nicht ausgeschlossen werden [343].
- Französische Untersuchungen verglichen außerdem Thrombozytenaktivität und Alkoholkonsum von Bauern in Südfrankreich mit der schottischer Bauern [267, 268], wobei sich herausstellte, dass die Plättchenaggregationsneigung der untersuchten französischen Population um einiges niedriger war. Die Aggregation nach ADP-Gabe (- ADP wird, wie bei Renaud et. al. [343] beschrieben, durch Alkoholwirkung mit am stärksten erniedrigt [339]) war sogar um 55% niedriger als bei den untersuchten Schotten, während das ebenfalls bestimmte mittlere Serumcholesterin in Girvan/Schottland 69 mg/dl, in Stanraer/Schottland 66 mg/dl und in Var/Frankreich 63 mg/dl betrug, also nicht signifikant durch regelmäßigen Alkoholgenuß beeinflusst wurde. Der ermittelte Alkoholkonsum war am höchsten in Var (45 g/Tag, hauptsächlich in Form von Rotwein), in den beiden schottischen Städten betrug er im Schnitt 20 g/Tag (überwiegend Bier).

Im Folgenden sind die unterschiedlichen Ergebnisse der vorstehend beschriebenen epidemiologischen Studien zusammengefasst:

- In Frankreich, dem Land mit dem statistisch höchsten pro Kopfverbrauch an Wein, herrscht - trotz kalorienreicher Kost mit regelmäßigem Konsum tierischer Fette, sowie Serumcholesterinwerten und Risikofaktoren, die denen der Nachbarländern durchaus vergleichbar sind - die geringste Mortalitätsrate durch koronare Ereignisse unter allen untersuchten westlichen Industrienationen.
- Regelmäßiger mäßiger Konsum alkoholischer Getränke (zwischen 20 und 40 g Alkohol täglich) scheint, unabhängig von anderen Ernährungsfaktoren, das Risiko, an den Folgen koronarer Herzkrankheit zu versterben signifikant zu verringern.
- Einen tatsächlich hemmenden Effekt auf atherosklerotische Läsionen scheint dabei aber nur der Konsum solcher Alkoholmengen zu haben, der mit einer einigermaßen gesunden Lebensführung nicht mehr vereinbar ist.
- Die gemäßigte Ethanolaufnahme, deren mutmaßlich protektive Wirkung gegenüber den Folgen der KHK epidemiologisch nachgewiesen ist, könnte zumindest

teilweise auf einer Beeinflussung der Blutgerinnung - dabei am ehesten einer Verminderung der Thrombozytenaktivität - beruhen. Der ebenfalls nachgewiesene Rebound-Effekt der Thrombozytenaggregabilität nach Alkoholentzug könnte dabei das gesteigerte Risiko für plötzlichen Tod, das besonders mit exzessivem Alkoholkonsum assoziiert ist, erklären.

Alle Ergebnisse der zitierten Studien und epidemiologischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass die besagte Schutzwirkung bezüglich Mortalitätsrisiko und KHK auf der Ernährungsweise und zu einem weiteren Teil wohl auf mäßigem Konsum alkoholischer Getränke - hier vor allem Rotwein - beruht. Die genauen Mechanismen und die Substanzen, die neben dem oft zitierten Ethylalkohol, sicherlich eine Rolle spielen, bleiben unklar. Allein aufgrund epidemiologischer Daten lässt sich ein verstärkter protektiver Effekt von Rotwein gegenüber Ethanol alleine, zumindest in Hinblick auf die koronare Herzerkrankung, nicht beweisen.

Da die Ethanol-Hypothese alleine vielen Untersuchern offenbar nicht plausibel erschien, wurde eine ganze Reihe von Versuchen mit Rotweintextrakten [250] oder dealkoholisierten Rotweinkontrollen [390] unternommen, um eine besondere Wirkung von bestimmten, ebenfalls potentiell gesundheitsförderlichen Substanzen im Wein, den "Sekundären Pflanzenstoffen", nachzuweisen, die im Verlauf des Produktionsprozesses stabil vorhanden sind [31] bzw. während der Weinreife entstehen [48; 164; 166] oder um eine Ethanolwirkung bei den Untersuchungen auszuschließen [52; 53; 147; 162; 220; 390]. Einer Gruppe von Phenol-Derivaten, den mono- bis polyzyklischen Phytophenolen scheint dabei eine besondere Rolle zuzukommen [166; 356].

4.2. Rotweininhaltsstoffe mit vermuteter protektiver Wirkung

Wie eingangs erwähnt, sind im Rotwein eine große Zahl sowohl anorganischer als auch phytochemischer Substanzen enthalten. Die Mehrzahl dieser wohl über 400 möglichen verschiedenen Einzelsubstanzen ist noch nicht näher untersucht und somit liegen auch physiologische Wirkungen weitgehend im Dunkeln. Ein Großteil dieser Stoffe sind sogenannte sekundäre Pflanzenstoffe.

4.2.1. Sekundäre Pflanzenstoffe

Unter dieser Sammelbezeichnung fasst man in der Pflanzenphysiologie eine Vielzahl im chemischen Aufbau recht heterogener Verbindungen zusammen, die vom Syntheseparat der Pflanzenzellen erzeugt werden, ohne im Primärstoffwechsel nachweisbar eine wirkliche Rolle zu spielen. Sie können in Auftreten und Zusammensetzung für bestimmte Arten, Gattungen oder Familien typisch sein und dienen den produzierenden Pflanzen entweder als Schutzstoffe (Gerbsäuren, Catechine, Phytoalexine), Bau- und Speicherstoffe (Zimtaldehyd-Derivate, Lignin, Stärkemoleküle), oder es sind Farbstoffe (Anthocyane, Flavone, Carotine), Metabolite und Stoffwechselendprodukte (organische Säuren, Desoxyadenin-Derivate) oder Phytohormone (Cytokinine, Abscisinsäure, Sterolverbindungen, Ethylen).

4.2.2 Mögliche Pflanzeninhaltsstoffe aus Weintraube und Holz im Rotwein

Etlche Pflanzeninhaltsstoffe (im Folgenden eine unspezifische und sicherlich auch unvollständige Aufzählung) können über Trauben, Kerne, Fasholz oder chemische Umbaureaktionen und Reifungsprozesse in den Rotwein gelangen. Sie können aus Cytosol oder Speicherorganellen, Traubenschalen, Kernen oder Holzstrukturen stammen.

- Der Vakuoleninhalt von Pflanzenzellen kann u.a. eine Vielzahl organischer Carbonsäuren oder ihrer Salze enthalten : Wein-, Äpfel- Citronen- Oxal-, Kaffee- und etliche andere Säuren.

- Viele Pflanzen, darunter auch die Weinrebe (*Vitis vinifera*) und diverse Eichenpezies (*Quercus*) enthalten Farbstoffe (auch als Saffarbstoffe oder Vakuolenfarbstoffe bezeichnet), wasserlösliche Anthocyane und Anthoxanthine und fettlösliche Lipochrome.

Die überwiegend violetten, blauen und purpurroten Anthocyane bestehen aus einem zuckerfreien Anteil, dem sog. Anthocyan-Aglykon (oder Anthocyanidin) und einer Kohlenhydratkomponente (meist Glucose, Galactose, Rhamnose oder Glucuronsäure) auf welche die Wasserlöslichkeit solcher Chromosaccharide zurückzuführen ist. Als chemischer Grundbaustein dieser Pflanzenfarbstoffe ist das Flavangerüst anzusehen.

Die wichtigsten Anthocyanidine, von denen auch die Weinrebe höhere Konzentrationen produziert, sind Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Paeonidin, Pelargonidin, Petunidin und das besonders in den Fruchtschalen der Trauben vorkommende Oenidin.

Weißer Blüten können auch farblose Modifikationen von Anthocyanen, sog. Leukoanthocyanidine, enthalten.

Den Anthocyanen chemisch nahe verwandt sind die ebenfalls zu den Flavanabkömmlingen zählenden Anthoxanthine oder Flavone. Sie tragen vor allem gelbliche Farbtöne und sind als Glykoside ebenfalls wasserlöslich. Die häufigsten Aglykone der Anthoxanthine sind die sogenannten Flavonole (Oxidationsprodukte der Anthocyane).

- Aus der großen Gruppe der Glykoside, die nur einen chemisch-systematischen Begriff darstellen (- die Aglykone können den verschiedenen chemischen Stoffklassen angehören) können beispielsweise Bitterstoff- und Cumaringlykoside auftreten.
- In sehr geringen Konzentrationen könne auch Aldehyde wie Acetaldehyd und Formaldehyd vorkommen [225]
- Mitglieder der nächsten Gruppe, Gerb- und Flechtenstoffe angefüllter Vakuolen, finden sich vor allem in Rinde und Stängeln (als bräunliche Phlobaphene oder oxidierte Gerbstoffe) und in Früchten. Gerbstoffe sind in der Lage, Eiweiße auszufällen und fungieren deshalb auch als eingelagerte Schutzstoffe der Pflanze gegenüber Mikroorganismen. Es sind überwiegend Gemische verschiedener Polyphenolverbindungen. Weitverbreitete Bausteine sind Chlorogen-, Gallus- und Ellagsäure. Bekanntere Vertreter dieser Phenolsäureester (Depside) leiten sich beispielsweise als sogenannte Gallotannine oder "hydrolysierbare Gerbstoffe" von der Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) ab. Die bekannteste Verbindung ist hierbei Tannin, ein weiterer Vertreter ist die m-Digallussäure.

Die andere Gerbstoffhauptgruppe stellen die "kondensierten Catechugerbstoffe" oder Catechine und Catechole dar. Etliche Stoffe dieser Gruppe schützen Pflanzen vor Tierfraß oder Schädlingsbefall (beispielsweise das weitverbreitete o-Diphenol Brenzkatechin). Einige dieser Stoffe oder Stoffgemische können beim Menschen Dermatitiden auslösen, z. B. Urushiol (enthalten beispielsweise im Giftefeu (*Rhus radicus*) und Sumach) oder Primin [176, 472].

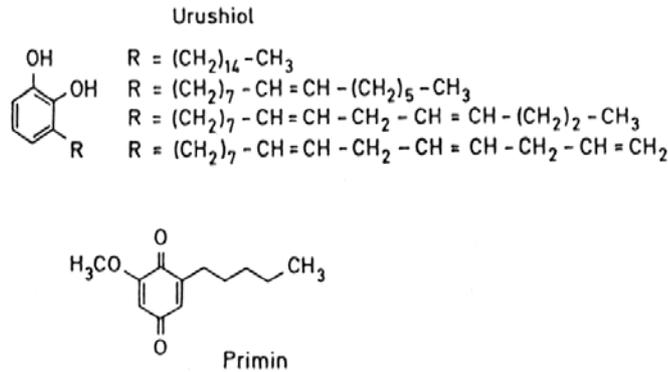


Abb. 3: Struktur der Phenolderivate Urushiol und Primin [aus 472]

- Vor allem fäulnisverhindernde Eigenschaften haben auch die vielen unterschiedlichen ätherischen Öle, Balsame und Harze. Sie sind, ebenso wie die Carotinoide, überwiegend aus Isoprenmolekülen (C₅H₈) oder deren oxidierten Derivaten aufgebaut (Isoprenoide oder Polyterpene).

(C ₅ H ₈) _n	Gruppe	Beispiele
1	Hemiterpene	«Prenylrest» in Chinonen und Cumarinen
2	Monoterpene	offen: Citral, Geraniol, Linalool monocyclisch: Limonen, Menthol, Thymol, Menthon, Carvon Cineol, Phellandren bicyclisch: Kampfer, α- und β-Pinen
3	Sesquiterpene	offen: Farnesol cyclisch: β-Cadinen, Abscisinsäure
4	Diterpene	offen: Phytol cyclisch: Harzsäuren, Gibberelline
6	Triterpene	offen: Squalen cyclisch: Triterpenalkohole, Triterpensäuren, Steroide, Gossypol, Cucurbitacine
8	Tetraterpene	Carotinoide (Carotine, Xanthophylle)
x	Polyterpene	Kautschuk, Guttapercha, Balata

Tab. 2: Die Gruppe der Isoprenoide (modifiziert nach [326])

- Einen wichtigen Einfluss auf Wachstum und Orientierung einer Pflanze sowie Fruchtreifung und Blattwechsel hat die Gruppe der Phytohormone. Nach Wirkung und Bau lassen sich u.a. folgende Phytohormongruppen unterscheiden [473]:
 - Auxine (Streckungswachstum): z. B. β-Indolylessigsäure, Glucobrassicin.
 - Cytokinine (fördern Zellteilung): z. B. Kinetin, Zeatin; chemisch gesehen handelt es sich meist um Desoxyadenin-Derivate, in 1 l Rebenblutungssaft können 50-100 µl enthalten sein.
 - Abscisinsäure (ein Terpenoid) hemmt Stoffwechsel und Wachstum, induziert Fruchtreifung, Blatt- und Fruchtfall; in einem Liter Xylemsaft höherer Pflanzen können 6-1000 µg enthalten sein.
- Einige Isoflavone haben östrogenartige Wirkung: bei vielen Pflanzen (z. B. Leinsamen, Soja, Hopfen, Traubensilberkerze, Rotklee) sind Phytoesterole bekannt, deren pflanzenphysiologische Funktion aber unklar ist. Ihrer östrogenähnlichen physiologischen Wirkungen beim Menschen we-

gen werden sie auch als Phytoöstrogene bezeichnet. Ihr Vorkommen in der Weinrebe ist eher gering und eine mögliche Atheroskleroseschutzfunktion unwahrscheinlich, obwohl es Autoren gibt, die die positive Wirkung des Rotweins primär oder zumindest teilweise auf Inhaltsstoffe mit östrogenartiger Wirkung zurückführen [53, 328, 424]. Östrogenartige Verbindungen sollen beispielsweise die Signaltransduktion bzw. über den MAP-Kinase-Weg (siehe auch Kap 6.) Form und Funktion von Endothelzellen [157, 337, 369] und glatter Gefäßmuskulatur [276] beeinflussen können

Die Mehrzahl der typischen sekundären Pflanzenstoffe mit wünschenswerten biologischen Eigenschaften für den Menschen - auch die im Rotwein enthaltenen - sind also Phenole oder Phenol-Derivate/Polyphenole, Flavonoide, 3,4-Trihydroxystilbene und Leukocyanidole. Chemisch gesehen sind natürliche Polyphenole Chroman-Derivate [401]. Aufgrund des mutmaßlich positiven Effektes auf das kardiovaskuläre System ist die Gruppe der Flavonoide die bislang am besten untersuchte. In höheren Pflanzen und deren Produkten treten sie in einer außerordentlichen Vielfalt auf (über 4000 natürlich vorkommende Flavonoide) [143]. Flavonoide sind Derivate des Phenylchromans. Anhand struktureller Unterschiede können sie in unterschiedliche Untergruppen eingeteilt werden: Flavane, Flavanone, Flavone, Flavonole und Anthocyanidine. Die Grundstruktur besteht aus einem aromatischen Ringsystem: zwei Benzenringen, die durch einen mittleren heterozyklischen Pyran- oder Pyronring verbunden sind. So haben Flavonoide und Tocopherole (z. B. Vitamin E) eine gemeinsame Grundstruktur, den Chromanring [280]. Flavonoide unterscheiden sich untereinander durch die Orientierung von Hydroxy- oder Methylgruppen oder funktionellen Derivaten davon, durch die Position von Benzolsubstituenten und in der Anzahl ungesättigter Bindungen.

Meist liegen sie in der Form von Glykosiden oder Zuckerestern vor (beispielsweise Hyperosid = Quercetin-3-galactosid, Rutin = Quercetin-3-rutinosid, Isoquercitrin = Quercetin-3-glucosid) [343]. In diesem Fall sind sie wasserlöslich. Die Struktureigenschaften von Flavonoiden scheinen also eng mit den ihnen zugeschriebenen Eigenschaften wie antioxidative und antiproliferative Aktivität in Verbindung zu stehen [67; 143; 280]

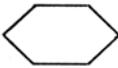
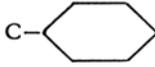
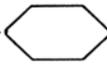
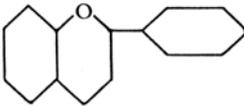
C-Grundgerüst	Gruppe	Beispiele
	einfache Phenole	Hydrochinon Arbutin
C- 	Phenol-carbonsäuren	p-Hydroxybenzoesäure Protocatechusäure Gallussäure
C-C-C- 	Phenylpropane	Zimtsäuren Zimtalkohol Cumarine Lignin
	Flavan-derivate	Flavanone Flavone Flavonole Anthocyanidine

Abb. 4: Übersicht über die Hauptgruppen pflanzlicher Phenole [aus 472]

Im Folgenden eine kurze Beschreibung häufiger Untergruppen dieser wichtigen Stoffe [nach 472]:

- Zimtsäurederivate:

Zimtsäure kann frei oder verestert in Ölen, Harzen und Balsamen vorkommen. Durch Hydroxylierung entsteht p-Cumarsäure. Diese kann durch weitere Hydroxylierung in Kaffeesäure und durch nachfolgende Methylierung in Ferula- und Sinapinsäure umgewandelt werden. Deren Alkohole Coniferylalkohol und Sinapylalkohol stellen wiederum zusammen mit dem Alkohol der p-Cumarsäure, dem p-Cumarylalkohol die Grundbausteine des Lignins dar. Ein weiteres Zimtsäurederivat ist Vanillin.

- Lignin ist nach der Cellulose mengenmäßig gesehen die zweitwichtigste Substanz im Pflanzenreich und wird durch Polymerisation der drei vorgenannten Alkohole (bzw. deren glykosylierten Transportformen Coniferin, Syringin und Glucocumarylalkohol) von der Pflanzenzelle gebildet. Das Verhältnis der Alkohole untereinander schwankt dabei in Abhängigkeit von der Organisationsstufe des Produzenten.

- Derivate der Phenolcarbonsäuren und freie Phenole haben, oft als Schutzstoffe vor Fraß oder Schädlingsbefall (siehe auch unter Gerbstoffe), eine weite Verbreitung. Beispiele: p-Hydroxybenzoesäure ist Ausgangssubstanz für Ubichinon, die Substanz o-Hydroxybenzoesäure ist auch als Salicylsäure bekannt.

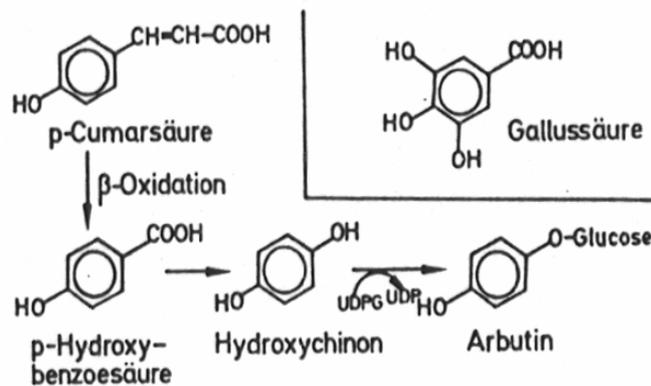


Abb. 5: Biosynthese von Phenolcarbonsäuren bzw. Phenolglucosiden sowie Strukturgerüst der Gallussäure [aus 472]

Freie Phenole/Phenolderivate sind beispielsweise Brenzcatechin, Epicatechin, Resorcin, Hydrochinon und dessen Glukosid Arbutin, Chinon, Phloroglucin, Protocatechusäure, Veratrol und Kämpferol.

Eine weitere Gruppe phenolischer Stoffe sind die sogenannten Phytoalexine, Schutzstoffe, die von der Pflanze oft erst bei Infektion mit pathogenen Organismen (z.B. bei *Vitis* mit dem 'Edelfäule'-Pilz *Botrytis cinerea*) oder Verletzung produziert werden [472]. Beispiele sind Viniferin, Resveratrol, Adstringin, Kaffeesäure und Chlorogensäure.

4.2.3. Die Flavanderivate oder Flavonoide

Die letzte Gruppe der hier vorgestellten Phenolverbindungen sind die Flavanderivate oder Flavonoide, die ubiquitär im Pflanzenreich vorkommen. Das polyphenolische Grundgerüst des Flavans ist das chemische Strukturmotiv für eine große Anzahl unterschiedlicher Stoffgruppen [89; 181; 472], darunter viele Farbstoffe. Bislang sind über 4000 verschiedene Flavonoide isoliert worden. Ihre Aufgaben sind unter anderem Beteiligung an Redoxsystemen der Zelle, Schutzfunk-

tion (ähnlich den verwandten Phytoalexinen, s. o.) und, bereits erwähnt, Farbgebung [85; 274; 447; 472].

Die Flavonoide werden systematisch in acht Hauptklassen eingeteilt:

1. Flavone (Flavon-Derivate im eigentlichen Sinne enthalten die C-2/C-3-Doppelbindung, aber keine Sauerstoff-Funktion am C-3)
2. Flavonole (z. B. Quercetin)
3. Flavonone/Flavanone
4. Catechine (Vorstufen von Gerbsäuren)
5. Anthocyanidine oder Anthocyanine
6. Isoflavone (bei Isoflavon-Derivaten findet sich der aromatische Substituent am C-3-Atom des Ringes)
7. Dihydroflavonole
8. Chalcone [181; 194; 197; 237]

4.2.3.1. Struktur und chemische Eigenschaften

Die chemische Aktivität von Flavonoiden und ihren Metaboliten ist stark abhängig von chemischer Struktur, Anzahl und Anordnung von Hydroxyl-, Oxy- und C-Alkylresten an den flankierenden Ringen sowie dem Oxidationsgrad des zentralen sauerstofftragenden C-Ringes:

Polyphenole agieren als reduzierende Agentien, Protonendonatoren und Metall-Chelatoren. Da bislang relativ wenig über den Zusammenhang zwischen ihrer Struktur und der antioxidativen Aktivität bekannt ist, untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen strukturell unterschiedliche Polyphenole [17; 56; 453]. Demnach erhöhen Hydroxylreste am Flavonoid-Ring die antioxidative Aktivität, während eine Substitution dieser Gruppen durch Methoxyreste diese Aktivität herabsetzt. Andere Arbeiten [264; 268] suchten einen Zusammenhang von spektroskopischer Identifizierbarkeit von Polyphenolen und ihren strukturellen Charakteristika: die meisten Flavone und Flavonole zeigen zwei Absorptionsbanden im Ultraviolett-Bereich (B-Ring- und die A-Ring-Absorptionen). Es wurde aber auch beobachtet, dass eine ansteigende Zahl an Hydroxylgruppen eine Rotverschiebung zur Folge hat (beispielsweise von 367 nm für Kaempferol mit Hydroxylsubstituenten in den Positionen 3,5,7, und 4' nach 371 nm für Quercetin mit Hydroxylgruppen in den Positionen 3,5,7,3' und 4'). Die gemessenen kürzeren Wellenlängen bei Flavonen resultieren aus dem Fehlen einer 3-OH-Gruppe in der Strukturformel. Bei den Flavanonen mit gesättigtem heterozyklischem C-Ring ist die fehlende Bindung zwischen A- und B-Ring durch sehr starke Maximum-UV-Spektren und eine schwächere antioxidative Aktivität definiert [17, 56]. Das Flavonol Quercetin trägt beispielsweise die gleiche Anzahl an Hydroxylgruppen in den gleichen Positionen wie das Flavan Catechin, gleichzeitig aber noch eine Doppelbindung im C-Ring zwischen Position 2 und 3 sowie eine 4-Oxy-Gruppe. Erst dieses Zusammenspiel der 3-OH-Gruppe mit der 2,3-Doppelbindung neben dem 4-Carboxylrest im C-Ring verleiht dem Quercetin seine antioxidativen Eigenschaften [349]. Flavanone mit nur einer Hydroxylgruppe am B-Ring besitzen lediglich geringe antioxidative Aktivität [349; 391]. Aufgrund seines ungesättigten Heterozyklus hat Quercetin eine zweimal höhere antioxidative Aktivität als Catechin mit seinem gesättigten heterozyklischen Ringssystem [349]. Auch andere Autoren berichten, dass das Ausmaß der Hydroxylierung und die Position der OH-Gruppen der Schlüssel zur antioxidativen Aktivität der Flavonoide sind [115; 330]. Flavonoide benötigen zum Radikal-Fang die o-Dihydroxy-Struktur im B-Ring, die dem Molekül größere Stabilität verleiht und auch an Elektronenverschiebungen teil hat [42; 395]. Die Doppelbindung zwischen Position 2 und 3 in Nachbarschaft zu einer 4-Oxo-Gruppe im C-Ring verursacht Elektronenverschiebungen im B-Ring, während die 3- und 5-OH Gruppen in der Nähe zu

einer 4-Oxo-Gruppe für Elektronenverschiebungen im A- und B-Ring verantwortlich sind.

Viele Flavonoide sind außerdem mit Zuckern zu einem Glucosid verbunden, was ihre Löslichkeit erhöht. So ist beispielsweise Rutin (internationaler pharmazeutischer Freiname der Substanz Rutosid), das auch pharmakotherapeutisch genutzt wird (Birutan[®], Rutinon[®]), ein Glykosid (3-Rutinosid) des Quercetins. [266; 447]. Allerdings reduziert eine Glucosylierung in gewissem Maße auch die antioxidative Potenz der Flavonoide [391].

Die zum Ende dieser Arbeit untersuchten, häufig in Wein und Nahrungspflanzen vorkommenden Flavonoide Quercetin, Resveratrol und Myricetin werden systematisch den Flavonolen zugerechnet [140; 143; 190; 266; 274], während beispielsweise Delphinidin [11; 270; 271], Cyanidin und Oenidin, weitere aktive Rotweinhaltstoffe, Anthocyanidine sind. In welchen Größenordnungen diese Substanzen jeweils in Weinen enthalten sind ist weitgehend ungeklärt, die Konzentrationen schwanken sicherlich stärker. In lediglich einer einzigen Arbeit war der gefundene Gehalt von Resveratrol in einem alkoholfreien, aus Rotwein gewonnenen Polyphenol-Extrakt mit 0,57 mg/l angegeben [250].

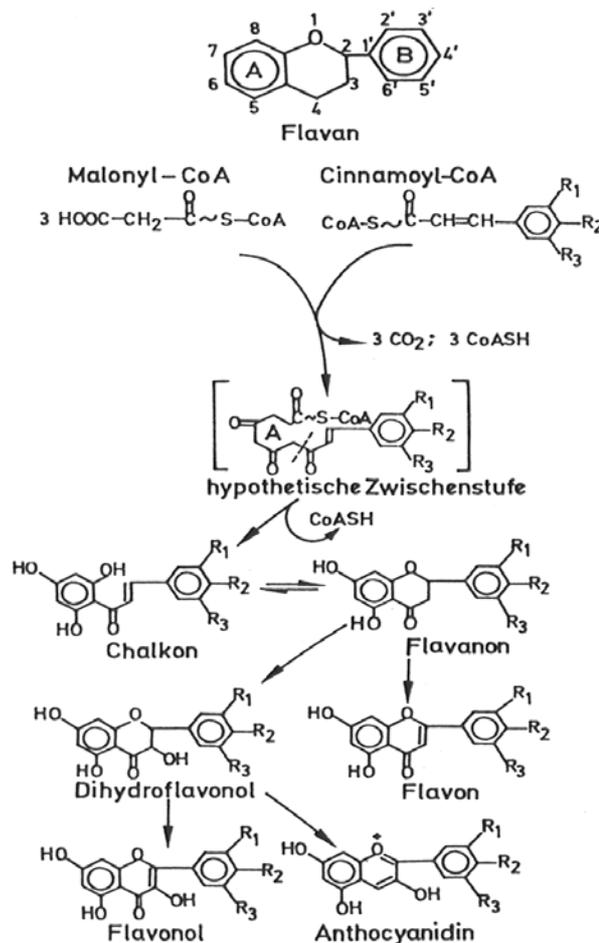


Abb. 6: Flavangerüst und schematische Übersicht über die Biosynthese wichtiger Derivate wie Flavonol [aus 472]

Chemisch nahe verwandt sind, wie oben schon erwähnt, auch die Heterozyklen der Chromangruppe, beispielsweise Chromon, Cumarin (u. a. in Waldmeister und gemähtem Heu), Fisetin (u. a. in Bohnen) und Taxifolin (u. a. in Eiben).

4.2.3.2. Flavonoid-Wirkungen im Körper

In der Pflanze spielen phenolische Flavon-Derivate vor allem die Rolle von Radikalfängern und Redoxkatalysatoren. In einer Reihe von Arbeiten werden Flavonoiden bioaktive Wirkungen aber auch im Warmblüterorganismus zugeschrieben, so z. B. antioxidative und antivirale Wirkungen [132; 177], immunmodulierende und anti-allergische Wirkungen [197, 198], sowie antiinflammatorische und sogar potentiell neuroprotektive Eigenschaften [131; 319; 374; 428].

Bald nach der Entdeckung der Ascorbinsäure beobachtete man, dass die reine Säure nicht in gleichem Maße wirksam ist, wie Früchte oder pflanzliche Zubereitungen, die gleiche Ascorbinsäuremengen enthalten. Der zunächst unbekannteste Faktor, der diese Wirkung offensichtlich synergistisch unterstützt, wurde "Vitamin P" genannt. Man fand dann heraus, dass es sich beim sogenannten Faktor P um ein Gemisch von Flavon-Derivaten handelt, von denen wohl dem Rutin (ein Glykosid des Quercetins, s. o.) die größte Wirksamkeit zukommt. Flavon-Derivate wirken je nach struktureller Konstitution außerdem mehr oder weniger kapillarabdichtend. Die Gefahr der Kapillarbrüchigkeit soll dabei gleichzeitig verringert werden, eine Wirkung, die vielleicht über eine Hemmung der Hyaluronat-Lyase und somit über einen verzögerten Abbau von Hyaluronsäuren erfolgt [447]. Auch eine gewisse Schutzfunktion bezüglich maligner Transformation bzw. der Bildung von Neoplasien [190; 197; 210; 416] wurde postuliert.

Im Folgenden sind verschiedene sekundäre Pflanzenstoffe unterschiedlicher Stoffklassen aufgelistet, die nach Aufnahme in den Körper theoretisch eine protektive Wirkung entfalten könnten:

<u>Stoffname</u>	<u>Gruppe oder Funktion</u>	<u>chemische Stoffklasse</u>	<u>mögliche oder bekannte Wirkung</u>
- Carotine	Farbstoff	Terpen	Antioxidantien
- Lycopin	Farbstoff	Terpen	Antioxidantien
- Anthocyane und deren Glykoside	Farbstoffe	Flavonoid	Antioxidantien
- Anthoxanthine und deren Glukoside	Farbstoffe	Flavonoid	Antioxidantien
- Flavonole und deren Glucoside (wie Quercetin, Delphinidin, Myricetin)		Flavonoid	Antioxidation
- Chromane (Chromon)	Farbstoffe	Flavonoid (phenol.)	Antioxidantien
- Cumarine	Farbstoffe, Schutzstoffe	Phenylpropane	
- Resveratrol, Genistein	Phytoalexin	Stilbenderivat, Isoflavonoide	Antioxidans, Phytoöstrogen
- Adstringin	Phytoalexin	Stilbenderivat	
- Chlorogensäure	Schutzstoff	org. Säure	
- Zimtsäurederivate (Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure)	Bausteine, Schutzstoff	Phenylpropane	
- Ascorbinsäure	Vitamin	Lacton/KH-Derivat	Antioxidans
- Riboflavin	Farbstoff, Vitamin	Flavin	
- Salicinsäure		Phenolcarbonsäure	
- Salicin		PCS-Glucosid	
- Cumarinsäure, Protocatechusäure	Schutzstoff, Baustoff	Phenolcarbonsäure	
- Coniferin, Syringin, Glucocumarylalkohol	Ligninbausteine	Phenylpropane	
- Sterole und Stilbene ("Phytoöstrogene")	Funktion unbekannt		Weingehalt vermutlich in geringsten Mengen
- Phlobaphene	oxid. Gerbstoffe	Phenolcarbonsäuren	
- Gallusäurederivate	Gerbstoff	Phenolcarbonsäuren	
- Catechine	kondensierte Catechugerbstoffe	PCS-Derivate	
- Brenzcatechin, Epicatechin	Schutzstoffe	einfache freie Phenole	
- Hydrochinon, Arbutin	Schutzstoffe	einfache freie Phenole	
- Resorcin, Veratrol	Schutzstoffe	freie Phenole	
- Phloroglucin	Schutzstoffe, Bausteine	einfache freie Phenole	
- Cytokinine	Phytohormon	Desoxyadenin-Derivate	Weingehalt fraglich

Tab. 3: Einige sekundäre Pflanzenstoffe (mögliche Rotweinhaltstoffe) mit potentiell protektiven Eigenschaften

Es ist weiterhin möglich, dass auch geringe Mengen an Fassdesinfektionsmittel- oder Herbizidrückständen im Wein verbleiben, die in größeren Mengen eine Wirkung zeigen könnten, oder dass durch Manipulationen bei Erzeugung oder Abfüllung Fremdstoffe zugesetzt werden („Aufzuckern“, Schwefeln, Glykolskandal in Österreich in den 80er-Jahren).

Beispiele für Herbizide wären Norflurazon, Oxyfluorfen, Oxadiazon, Trifluratin und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure. Die Substanz mit der längsten Halbwertszeit ist offenbar Norflurazon, andere Herbizide sind Untersuchungen zufolge nach etwa 28 Tagen abgebaut. In weißen Trauben scheinen sich dabei aus noch ungeklärten Gründen etwas höhere Konzentrationen an Herbizidrückständen anzureichern und zu verbleiben [8; 468]. Das Vorhandensein geringster Reste von Fassdesinfektionsmittel-Rückständen (wie Formaldehyd) ist ebenso möglich. Synthetische, im Pflanzenbau eingesetzte Substanzen zur Wachstumsregulation sind beispielsweise Naphtyllessigsäure, Etephon und Diaminozid [473].

Weiter offene Fragen im Rahmen dieses Thesenkomplexes um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im Rotwein bleiben die Klärung der durchschnittlichen Konzentrationen physiologisch relevanter Stoffe (Problem der fraglichen Reproduzierbarkeit von Inhaltsstoffen) im Naturprodukt Rotwein, die Frage der digestiven Degradation/Zerstörung genannter Stoffe im Verdauungstrakt bzw. die Frage, welche Inhaltsstoffe überhaupt eine entsprechende Bioverfügbarkeit aufweisen, um in wirksamen Konzentrationen im Körper vorzuliegen [447; 449] und schließlich die Frage wie im Falle einer Aufnahme pharmakologische Effekte, intrakorporale Wechselwirkungen, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik aussehen. Zuverlässige Daten sind hier aufgrund der komplexen und wahrscheinlich auch stark schwankenden Zusammensetzung des Weines bezüglich seiner Inhaltsstoffe rar. Die meisten Angaben beziehen sich überwiegend auf den „Einzelstoff Resveratrol: die Resveratrolkonzentration in Rotwein soll einigen Autoren zufolge etwa bei 0,57 mg/l [250] bzw. zwischen 0,4 und 60 µM [464], anderen zufolge bei etwa 100 µM [306] liegen. Resveratrol-angereicherter Traubensaft (17,5 µM) wird vom Darm [402] in offenbar genügend großen Mengen aufgenommen, um im *in vivo*-Experiment bei gesunden männlichen Probanden eine Beeinflussung des Aggregationsverhaltens von Thrombozyten zu bewirken [309]. Im Tiermodell wurde außerdem beschrieben, dass Resveratrol, wenn es regelmäßig an Ratten verabreicht wird, sich einigen Geweben anreichert [97; 402; 464]. Eine andere Autorengruppe fand einen Anstieg von Plasma-Polyphenolen von $6,4 \pm 3,0$ mg/g Protein (Bestimmung nach Folin-Ciocalteu), nachdem die Probanden über zwei Wochen hinweg kontrolliert 375 ml Rotwein täglich zu sich genommen haben [300]. Dies soll einer im Zellexperiment effektiven *in vitro* Plasma-Polyphenolkonzentration von etwa 450 µg/ml entsprechen [250].

4.2.4. Veröffentlichungen von Ergebnissen zur Wirkung von möglichen Rotwein-inhaltsstoffen

Im Folgenden werden die Aussagen von Arbeiten zusammengefasst, die sich überwiegend mit Rotwein bzw. einem oder mehreren Weininhaltsstoffen und deren biochemischen oder physiologischen Wirkungen befassen.

a) Thrombozytenfunktion und Gerinnung:

untersuchte Komponente:	Wirkung:	Autoren:
1) Synthetisches und natürliches Rotwein-Resveratrol:	zeigen 'antiplatelet'-Aktivität	Bertelli et al., 1995 [28]
2) <i>trans</i> -Resveratrol und Quercetin:	hemmen die Plättchenaggregation beim Menschen	Pace-Asciak et al., 1995 [308]
3) Wein und Traubensaft:	beeinflussen die Plättchenaggregation beim Gesunden, allerdings viel schwächer als Ethanol	Pace-Asciak, 1996 [309]

4) Rotwein und Alkohol:	vermindern die kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und den Fibrinogenspiegel bei gesunden freiwilligen Probanden	Pellegrini et al. ,1996 [321]
5) Rotwein:	verändert die Zusammensetzung von Thrombozyten-Phospholipiden beim Gesunden	Pellegrini et al., 1996 [322]
6) Rotwein-Phenole wie Quercetin und Resveratrol:	vermindern die Thrombozytenaggregationsneigung und steigern die Fibrinolyse	Constant, 1997 [84]
7) Rotwein und Traubenprodukte	vermindern die Plättchenaktivität	Folts et al., 1997 [140]
8) Rotwein-Phenole	hemmen die Thrombozytenaggregation	Lugasi, 1997 [260]
9) Wein-Phenole	vermindern evtl. die durch NO vermittelte (?) Plättchenaktivität; desweiteren heben sie den Vitamin E-Spiegel an und vermindern die Oxidation von Thrombozyten, die oxidativem Stress unterworfen sind	Ruf, 1999 [367]
10) Polyphenole in Wein und Kakao:	beeinflussen die Plättchenaktivität und -funktion	Rein et al., 2000 [338]
11) Antioxidantien (Resveratrol, Tocopherol, Selen):	beeinträchtigen die Plättchenadhäsion	Zbikowska & Olas, 2000 [469]

b) Modifikation der Eicosanoid-Biosynthese:

untersuchte Komponente:	Wirkung:	Autoren:
1) Trans-Resveratrol und Quercetin :	hemmen die Eicosanoidsynthese	Pace-Asciak et al., 1995 [308]
2) Phenole/Resveratrol:	Phenole steigern die Prostacyclinsynthese und senken Thromboxan; evtl. senkt Resveratrol die intrazelluläre Konzentration und Freisetzung von Apolipoprotein B	Goldberg, 1996 [164]
3) Rotwein-Phenole:	vermindern die Eicosanoidsynthese	Lugasi, 1997 [260]
4) Rotwein:	stimuliert Endothelzellen zur Prostacyclin-Sekretion	Schramm et al., 1997 [385]
5) Wein-Phenole:	senken die Prostanoidsyntheserate aus Arachidonsäure	Ruf, 1999 [367]
6) Rotwein, sowie auch dessen hochmolekulare ("Tannine") und niedermolekulare Fraktion ("SMW"):	SMW induziert die 6-keto-Prostaglandin F1- α -Synthese, RW bzw. seine hochmolekulare Fraktion erhöhen den Thromboxan B ₂ - und den 6-ket Prostaglandin-Spiegel	Schramm et al., 1999 [386]

c) antioxidative Wirkungen:

Untersuchte Komponente:	Wirkung:	Autoren:
1) pflanzliche Polyphenole:	sind Antioxidantien und können sowohl die LDL-Oxidation, als auch die Bioaktivität carcinogener Substanzen hemmen; zusätzlich sind sie in der Lage, antioxidative und detoxifizierende Enzyme zu aktivieren	Zloch, 1974 [474]
2) Resveratrol:	hemmt die Oxidation humanen LDLs	Frankel et al., 1993 [146]
3) Phenole; Zimtsäurederivate (Kaffeensäure) aus Rotwein:	Extrakte phenolischer Stoffe aus verschiedenen Getränken hemmen die Serum- und LDL-Oxidation (Lipid-Hydroperoxid-Bildung) <i>in vitro</i> ; das extrahierte Zimtsäurederivat Kaffeensäure hemmt in Konzentration ab 1 μ M die Lipidoxidation und schont so α -Tocopherol	Abu-Amsha et al., 1996 [1]
4) Phenole:	schützen LDL vor Oxidation	Goldberg et al., 1996 [163]
5) pflanzliche Phenole:	wirken als Radikalfänger und Antioxidantien. Hypothese: aus Traubenpigmenten werden im Laufe des Reifungsprozesses stabilere Pigmentmoleküle mit veränderter Aktivität	Brouillard et al., 1997 [48]
6) Wein-Flavonoide, Vitamin E und andere Antioxidantien aus Nahrungsmitteln:	senken <i>in vitro</i> die Spiegel cytotoxischer Komplexe wie Acetaldehyd und Acetaldehyd-Albumin	Wickramasinghe et al., 1996 [457]
7) Rotwein-Flavonoide wie Resveratrol und Quercetin:	haben bessere antioxidative Wirkungen als α -Tocopherol, wobei in Traubensaft nur etwa die Hälfte der Flavonoidmenge des Rotweins enthalten sein soll	Constant, 1997 [84]
8) Rotwein-Inhaltsstoffe: Stilbene (Resveratrol und Adstringin) und Flavonoide (Anthocyane und Catechin):	haben antioxidative Eigenschaften und können als Radikalfänger wirken	Fauconneau et al., 1997 [127]
9) Rotwein und dessen fraktionierte phenolische Komponenten:	hemmen LDL-Oxidation und verzögern die Aufnahme durch Makrophagen	Kerry & Abbey, 1997 [220]
10) Flavonoide aus Rotwein und Traubensaft:	hemmen die LDL-Oxidation, RW hat dabei die längere Wirkdauer (bessere Aufnahme der Rotwein-Flavonoide?)	Miyagi et al., 1997 [285]

11) Polyphenolische Flavonoide:	hemmen die makrophagengesteuerte Oxidation von LDL	Aviram & Fuhrman, 1998 [14]
12) Rotwein-Polyphenole	vermindern <i>in vivo</i> die Anfälligkeit von LDL für Oxidation	Nigdikar et al., 1998 [300]
13) Flavonoide und Hydroxystilben:	schützen vor „oxidativen Schäden“ im Körper	Goldberg et al., 1999 [165]
14) (+)-Catechin:	verhindert durch AAPH gesteuerte Oxidation von Vitamin E und Lipiden im Plasma	Lolito & Fraga, 1999 [258]
15) Resveratrol	schützt isolierte Rattenherzen vor ischämischen Reperfusionsschäden	Ray et al. 1999 [336]
16) Rotwein:	verhindert die zellgesteuerte Oxidation von LDL und HDL	Rifici et al., 1999 [354]
17) Resveratrol	verhindert eine durch Cu ²⁺ -Ionen oder Azokomponenten induzierte oxidative Modifikation humanen LDLs	Zou et al.; 1999 [476]
18) <i>trans</i> -Resveratrol:	wirkt als Hydroxylradikalfänger, hilft Glutathion zu sparen und verhindert somit DNA-Schädigung	Burkitt & Duncan, 2000 [50]
19) Rotwein:	erhöht postprandial die antioxidative Kapazität bei älteren Frauen	Cao et al., 2000 [55]
20) Rotweine (hier speziell Vini novelli):	besitzen antioxidative Kapazität	Pellegrini et al., 2000 [323]
21) Phenole aus Bitterschokolade:	erhöhen dosisabhängig den Epicatechin-Plasmaspiegel und verhindern oxidative Schäden	Wang et al., 2000 [545]
22) <i>trans</i> -Resveratrol	erniedrigt die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase in Rattenaorta-Homogenaten <i>in vitro</i>	Orallo et al.; 2002 [306]

d) andere Effekte

untersuchte Komponente:	Wirkung:	Autoren:
1) Weine und andere Traubenprodukte:	verursachen eine endothelabhängige Vasorelaxation	Fitzpatrick, 1993 [134]
2) Nahrungsflavonoide wie Quercetin (besonders aus Tee):	können bei regelmäßiger Aufnahme das Risiko eines Schlaganfalls verringern	Keli et al., 1996 [219]
3) nichtalkoholische Komponenten des Rotweins:	erhöhen den Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Plättchen-Phospholipiden beim Gesunden und verringern die Thrombozytenaggregationsneigung	Pellegrini et al., 1996 [321]
4) Rotwein-Phenole wie Quercetin und Resveratrol:	erhöhen die HDL-Konzentration	Constant, 1997 [84]
5) Wein (bzw. seine Inhaltsstoffkomposition aus Ethanol, Glycerin, Ascorbinsäure und phenolischen Weinhaltstoffen):	schützt vor Peroxid-induzierten DNA-Schäden (Weißwein sogar besser als Rotwein)	Fenech et al., 1997 [131]
6) Rotwein-Phenole:	fördern <i>in vivo</i> die Bildung endothelabhängiger Relaxationsfaktoren wie NO	Lugasi, 1997 [260]
7) natürliche Phenole in der Nahrung	bewirken experimentell eine Endothel-abhängige Vasorelaxation in der Rattenaorta <i>in vitro</i>	Andriambelason et al., 1998 [11]
8) Grapefruitsaft sowie auch Rotwein:	haben hemmenden Einfluß auf zelluläres Cytochrom P ₄₅₀ 3A4	Chan et al., 1998 [68]
9) Resveratrol:	hemmt die Ribonukleotid-Reduktase sowie die DNA-Synthese in Säugerzellen	Fontecave et al., 1998 [141]
10) Rotwein-Extrakte und Phenole:	die Stoffe Resveratrol, Catechin, Epicatechin (aus der Traubenschale) und die Proanthocyanidine (aus Kernen) wirken - wie auch Rotweinextrakte - als Antioxidantien und schützen das Myocard vor ischämischen Reperfusionsschäden	Das et al., 1999 [92]
11) Resveratrol	hemmt MAP Kinasen-Aktivität und wirkt stimulatorischen Effekten von Endothelin-1 entgegen	El Mowafy & White; 1999 [119]
12) Resveratrol:	steigert den NO-Synthetase-Gehalt, die Exprimierung des Tumorsuppressorprotein-Gens p53 und des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 (WAF1/CIP1), und unterdrückt die Proliferation bovinen Pulmonararterien-Endothels <i>in vitro</i>	Hsieh et al., 1999 [200]
13) Rotwein:	Weingenuss sowohl zu fettreicher als auch mediterraner Ernährungsweise erhöht die antioxidative Kapazität des Plasmas, vermindert DNA Schäden und normalisiert die Endothelfunktion	Leighton et al., 1999 [249]
14) Gallate (Gerbsäureverbindungen):	hemmen die cytokinininduzierte Aktivierung von NFκB, sowie die Bildung von IL-1α, TNFα-induzierter mRNA und Zelloberflächen-Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin in kultivierten HUVEC	Murase et al., 1999 [294]

15) Resveratrol:	hemmt die Expression von 'tissue factor' in Gefäßzellen	Pendurthi et al., 1999 [324]
16) Rotwein	kann die Flow-velocity reserve im Tiermodell beeinflussen	Shimada et al. 1999 [393]
17) Resveratrol:	induziert <i>in vitro</i> Apoptose in menschlichen promyelo-zytischen Leukämiezellen (HL-60)	Surh et al., 1999 [404]
18) Resveratrol:	induziert MAP-Kinase-Aktivität in bestimmten neuronalen Zellen und könnte als Neuroprotektivum wirken (Demenz)	Tredici et al., 1999 [428]
19) Rotwein:	wirkt den Folgen fettreicher Ernährung entgegen und führt über den NO-cGMP-Weg zu einer Relaxation glatter Muskulatur in Blutgefäßen	Cuevas et al., 2000 [91]
20) Resveratrol:	hat einen antiproliferativen Effekt auf menschliche Colonkarzinom-Zellen	Schneider et al., 2000 [382]
21) Rotwein:	beeinflusst Lipoproteine und stimuliert die zelluläre Abgabe von Cholesterin an Serumproteine	Senault et al., 2000 [389]
22) <i>trans</i> -Resveratrol	hemmt in zellfreien <i>in vitro</i> Studien die DNA-Polymerase α und δ	Stivala et al.; 2001 [411]
23) Rotwein-Polyphenole	steigern eNOS-Expression und NO-Freisetzung aus Endothelzellen	Leikert et al.; 2002 [250]
24) Resveratrol	verhindert eine durch Angiotensin-II-induzierte Hypertrophie von glatter Gefäßmuskulatur	Haider et. al.; 2002 [174]
25) Rotwein-Polyphenole	erhöhen den Calciumgehalt in Endothelzellen der Rinderaorta	Martin et al.; 2002 [269]
26) Resveratrol und Quercetin	senken die TF-Expression	Di Santo et al.; 2003 [99]
27) Delphinidin (phenolischer Rotweininhaltsstoff)	zeigt - wahrscheinlich über einen Cyclin-abhängigen Signalweg - einen hemmenden Effekt auf die Angiogenese	Favot et al.; 2003 [128]
28) Rotwein-Polyphenole	steigern die NO-Synthase Expression und nachfolgende NO-Freisetzung von Endothelzellen	Hollenberg; 2003 [196]
29) Delphinidin (ein Anthocyan aus dem Rotwein)	hemmt eine Endothelzellproliferation und ein Fortschreiten des Zellzyklus durch vorübergehende Aktivierung von ERK-1/-2	Martin et al.; 2003 [270]
30) Delphinidin	verhindert eine Endothelzell-Apoptose durch Aktivierung des 'NO-Signalwegs' und über Regulation der intrazellulären Calciumhomöostase	Martin et al.; 2003 [271]
31) Trauben-Polyphenole	haben vasorelaxierende Wirkung auf präparierte Ratten-Aorten; dieser Effekt wird möglicherweise über einen purinergen Signalweg (P2Y1 und P2Y2 Purinozeptoren in Endothelzellen) vermittelt	Mendes et al., 2003 [277]
32) Rotwein-Polyphenole	verursachen über einen redoxsensitiven Mechanismus eine Endothel-abhängige, EDHF-vermittelte Relaxation von Koronararterien-Präparaten des Schweines	Ndiaye et al.; 2003 [296]
33) Resveratrol	hemmt die membranassoziierte Proteinkinase C α (PKC α) und die konventionelle PKC β	Slater et al.; 2003 [398]
34) Rotwein	reguliert die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene hoch	Wallerath et al., 2003 [450]
35) Rotwein-Polyphenole	induzieren Vasorelaxation über gesteigerte NO-Bioaktivität	Zenebe et al., 2003 [470]

e) Aussagen zu Weißwein und Ethanol:

untersuchte Komponente:	Wirkung:	Autoren:
1 & 2) Alkohol:	erhöht HDL und senkt die Thrombozytenaggregation (proportional zum Gehalt)	Goldberg et al., 1996 [164] und Goldberg et al., 1999 [165]
3) Rotwein, Weißwein, Traubensaft, Traubensaft und Resveratrol:	scheinbar ist nur Ethanol die Komponente mit der antithrombotischen Wirkung	Pace-Asciak et al., 1996 [309]
4) Rotwein und Weißwein:	Weißwein schützt besser als Rotwein vor Hydrogenperoxid-induzierten DNA-Schäden <i>in vitro</i>	Fenech et al., 1997 [131]
5) Ethanol und Nichtflavonoid-Phenole:	haben keinen Einfluß auf die LDL-Oxidation	Miyagi et al., 1997 [285]
6) Alkohol:	beeinträchtigt die Plättchenfunktion und hat Einfluß auf die Fibrinolyse	Hendriks & van der Gaag, 1998 [187]
7) Rotwein, Weißwein:	Weißwein hat einen geringeren Phenolgehalt als Rotwein	Lamuela-Raventos & de la Torre-Boron, 1999 [243]
8) Ethanol:	hat bei der Hemmung zellvermittelter LDL- und HDL-Oxidation durch Rotwein keinen Einfluß	Rifici et al., 1999 [354]

9) Ethanol	steigert, in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration und anderer Aktivatoren, entweder die Aktivierung der PKC α über rho GTPasen durch Erhöhung der Interaktionen beider Proteine oder aber vermindert die Aktivität der rho GTPase assoziierten PKC α durch Beeinflussung der entscheidenden Konformationsänderungen	Slater et al.; 2003 [399]
------------	---	---------------------------

f) kontroverse Ergebnisse:

untersuchte Komponente:	Wirkung:	Autoren:
1) Rotwein:	der kardioprotektive Effekt wird vermutlich über Urat vermittelt	Day & Stansbie, 1995 [93]
2) Wein:	protektiv wirkt geringer Lebensstress, Alkoholkonsum dagegen erhöht das Myokardinfarkt-Risiko	Cleophas et al., 1996 [78]
3) Rotwein:	hat keinen Einfluß auf die Oxidierbarkeit von LDL	De Rijke, 1996 [95]
4) Resveratrol:	fördert atherosklerotische Läsionen im Tiermodell bei Kaninchen (Hypercholesterinämie-Stämme)	Wilson, 1996 [459]
5) pflanzliche Polyphenol:	Quercetin, RW-Farbstoffe und Phenolcarbonsäuren in Kaffee zeigen in Gentoxizitätstests mutagene Eigenschaften (bei der Aufnahme normaler Mengen besteht aber kein erhöhtes Risiko bezüglich der Induktion neoplastischer Erkrankungen)	Zloch, 1996 [475]
6) Resveratrol:	hat bei gesunden Ratten keinerlei Effekt auf das Lipoproteinprofil und schützt sich <i>in vitro</i> aber ein antioxidativer Effekt gegenüber Hydroxid-Radikalen	Turrens et al., 1997 [432]
7) Rotwein:	zeigt keinen positiven Akuteffekt auf die Endothelfunktion	Djoussé et al., 1999 [108]
8) Rotwein, Bier und Spirituosen:	vermindern den β -Carotingehalt im Plasma (Bier und Spirituosen vermindern zusätzlich noch den Vitamin C-Gehalt) - die absolute antioxidative Kapazität des Blutplasmas wird dadurch aber nicht wesentlich beeinflusst	Van der Gaag et al., 2000 [439]
9) (-)-Epigallocatechin-3-gallat (ein Tee-Catechin)	induziert eine Endothel-unabhängige Kontraktion der Rattenaorta, wahrscheinlich durch Erhöhung unspezifischer und Dihydropyridin-sensitiver Ca^{2+} -Kanäle in den Membranen der glatten Gefäßmuskulatur	Alvarez-Castro et al.; 2004 [9]

4.3. Hinweise und Ergebnisse aus *ex vivo*-, *in vivo*- und Tiermodellen

untersuchte Komponente:	Ergebnis:	Autoren:
1) Alkohol:	mehr als 36% der Tagesenergiemenge regelmäßig in Form von Ethanol aufgenommen vermindert das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen	Rudel et al., 1981 [366]
2) Resveratrol:	zeigt an der isolierten Meerschweinchen-Trachea einen Relaxierungseffekt, der durch β -Blocker und Indometazin hemmbar ist	Ragazzi et al., 1988 [334]
3) und 4) Rotwein, sowie <i>trans</i> - und <i>cis</i> -Resveratrol:	Kinetikexperimente und Konzentrationsmessungen von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Resveratrol in Rattengeweben nach oraler Rotwein-Gabe zeigen eine Affinität zu Leber und Nieren sowie eine verstärkte Bioaktivität im Herzen	Bertelli et al., 1996 [30], und Bertelli et al., 1996 [31]
5) Resveratrol und Quercetin:	zeigen an isolierter Rattenaorta vasorelaxierende Effekte	Chen et al., 1996 [71]
6) Rotwein:	<i>i. v.</i> Gabe hemmt im Tierversuch die Plättchenaktivität und die Thrombosierungsneigung in stenosierten Koronararterien.	Demrow et al., 1996 [98]
7) Wein und Traubensaft:	können die Plättchenaggregation <i>in vivo</i> beeinflussen, allerdings schwächer als Ethanol	Pace-Asciak, 1996 [309]
8) Rotwein-Phenole:	induzieren NO-Produktion und endothelgesteuerte Vasorelaxation in der Rattenaorta	Andriambeloston et al., 1997 [10]
9) Resveratrol:	hemmt, wenn auch etwas schwächer als Flavonoide, beim Schwein die Oxidation von LDL (in Konzentrationen 0,5, 1 und 1,5 μ M) durch Chelierung von Metallionen und Radikalfängereigenschaften	Belguendouz et al., 1997 [25]
10) Rotwein:	induziert im Kaninchen eine endothelabhängige, wohl über cGMP vermittelte Gefäßrelaxation, die durch NG-L-Arginin-Methylester hemmbar ist.	Cishek et al., 1997 [77]

11) Rotwein, Quercetin und Catechin:	senken LDL-Oxidation (durch Erhöhung einer Serum-Paraoxonase-Aktivität) und Thrombozytenaggregation in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen. Phenole könnten mit den LDL-Partikeln dabei eine Etherbindung ausbilden.	Hayek et al., 1997 [182]
12) Traubenkern-Proanthocyanidine:	zeigen im Rattenmodell Radikalfängeraktivität und schützen so Zellen vor oxidativem Stress, wie er bei Ischämie und Reperfusion auftreten kann	Sato et al., 1999 [374]
13) Rotwein:	moduliert im Rattenversuch die Hämostase und verhindert eine experimentell erzeugte Thrombosierung wahrscheinlich über einen NO-abhängigen Mechanismus	Wollny et al., 1999 [460]
14) Resveratrol	schützt im experimentellen Tiermodell (Kaninchen) nach Endothel-Denudation vor einer Intima-Hyperplasie	Zou et al.; 2000 [477]
15) Rotwein	verhindert eine durch Homocystein induzierte Endotheldysfunktion in Koronararterien des Schweines	Fu et al.; 2003 [150]
16) Rotwein und Resveratrol	verbessern die Endothelfunktion in Kaninchen (hypercholesterämische Stämme) gemessen an den Parametern FMD (flow mediated dilatation) der <i>Arteria femoralis</i> , ET-1-Freisetzung und Plasma-NO-Gehalt	Zou et al.; 2003 [478]
17) Rotwein (bzw. die darin enthaltenen Antioxidantien)	wirkt einer durch Zigarettenrauch induzierten Endotheldysfunktion in gesunden Nichtrauchern entgegen	Papamichael et al; 2004 [314]

4.2.4. Zusammenfassung der protektiven Eigenschaften sekundärer Pflanzenstoffe in Hinsicht auf die Atheroskleroseentstehung

Die Mehrzahl der vorgenannten Untersuchungsergebnisse läßt den Schluss zu, dass vor allem Rotweininhaltsstoffe primär pflanzlichen Ursprungs für die angeführten protektiven Eigenschaften verantwortlich sind, die sich folgendermaßen zusammenfassen lassen:

1. Senkung des oxidativen Stresses durch Erhöhung der antioxidativen Kapazität und Radikalfängeraktivität, dadurch auch verminderte Fettsäure-Oxidation
2. antithrombotischer Effekt durch Hemmung der Thrombozytenaktivität und -aggregabilität
3. Gefäßrelaxation durch eine NO-cGMP-vermittelte Beeinflussung der glatten Gefäßmuskulatur
4. Beeinflussung von Mediatorproduktion sowie Oberflächenmolekülstruktur des Endothels (Einflüsse auf Suppressorgen- und DNA-Ebene.)

Die WHO definierte 1997 "moderaten" Alkoholkonsum mit 10-30 g Alkohol pro Tag, die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) 1999 mit maximal 20 g Alkohol täglich. Um das Risiko für koronare Herzerkrankung, Myokardinfarkt und Apoplex um bis zu 40% zu reduzieren, könnten Frauen demnach maximal 15-25 g und Männer maximal 20-35 g Alkohol täglich zu sich nehmen [82, 156; 249, 344, 355]. Bei einem angenommenen durchschnittlichen Alkoholgehalt von 12 Vol.% entspricht das 150 bis 350 ml Rotwein täglich. Viele Mediziner gehen aber davon aus, dass schon bei regelmäßiger Aufnahme von etwas mehr als 30 g Alkohol täglich die schädlichen Auswirkungen etwaige Nutzeffekte bei weitem überwiegen [149, 232; 293].

5. Informationsübertragung in der Zelle

Alle in den vorgenannten Kapiteln erwähnten Erkenntnisse zu Zellentwicklung und Wachstum, zu Entstehung von Gefäßerkrankungen und schließlich auch zu pharmakologisch fassbaren Eingriffen von Nahrungsinhaltsstoffen in physiologische Systeme des Organismus haben Regelkreise und den Austausch von Informationen zwischen verschiedenen Körperregionen und Organbausteinen zur Grundlage. Die Mechanismen zur Informationsweitergabe haben sich im Laufe der Evolutions-

geschichte herausgebildet. Sie sind kompliziert, untereinander vernetzt, und haben Anteil unter anderem an immunologischen Prozessen, Zellreaktionen, Determinierungsprozessen und Apoptose. Somit stehen sie auch mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Zusammenhang, angefangen bei Mißbildungen über chronisch entzündliche Prozesse bis hin zu maligner Entartung.

5.1. Übersicht

5.1.1. Mechanismen und Signalstoffe

Die Zellen eines Zellverbandes sind durch sogenannte Gap Junctions (*Nexus*), bestehend aus verschiedenen Proteinen (z.B. Integrine, Connexine, Cadherine und Catenine) [199; 201; 242] miteinander verbunden, die ihrerseits mit dem Cytoskelett in Verbindung stehen [383]. So kann kontrollierter Stoffaustausch stattfinden und Informationen (beispielsweise über cAMP) innerhalb einer Zelle weitergegeben bzw. von einer Zelle zur nächsten übermittelt werden. Wenn Information über weitere Strecken von einer Körperregion oder einem Organsystem zu einem anderen transportiert werden soll, wird in der Regel auf Hormone und Transmittersubstanzen zurückgegriffen. Im Gegensatz zu lipophilen Botenstoffen wie Steroidhormonen, Thyroxin oder Retinolsäure [221], deren Wirkort in der Regel direkt im Zellkern der Zielzellen liegt, sind hydrophile Signalmoleküle (meist kleine Proteine oder Peptide) wie die meisten Hormone und Wachstumsfaktoren nicht ohne weiteres in der Lage, die lipophile Zellmembran zu überwinden. Ihre Information wird daher über unterschiedliche, membrangebundene Rezeptoren ins Zellinnere weitervermittelt. Diese Rezeptoren sind integrale Membranproteine die auf extrazellulärer Seite einen - beispielsweise zellproliferationsstimulierenden - Botenstoff ("first messenger") binden können. Durch eine dadurch zustandekommende Veränderung der räumlichen Struktur wird auf der intrazellulären Seite der Membran ein Zweitsignal ausgelöst, welches im weiteren Verlauf zu zellulären Reaktionen wie DNA-Duplikation und Zellteilung (bei Wachstumsfaktoren) oder Genaktivierung und -translation (bei Hormonen) führen kann.

Wachstumsfaktoren haben aber nicht ausschließlich mitogene Wirkung, sondern können auch die Zelldifferenzierung und sogar Motilität der einzelnen Zellen beeinflussen, denn eine Zelle kann sich nur dann mitotisch teilen, wenn sie zuvor unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren mit separierender Wirkung ("Scatter-Faktoren") die Zellkontakte mit ihren Nachbarn abbrechen konnte. Diese von Fibroblasten erzeugten Glycoproteine - eines der bekanntesten ist HGF/SF (hepatocyte growth factor/ scatter factor) - beeinflussen die Zelle über transmembranale Rezeptoren, z. B. den 'C-Met Tyrosin-Kinase-Rezeptor' [421].

Einige Wachstumsfaktoren können - je nach Zielzelle und Beeinflussung der Proto-onkogen-Expression - sowohl proliferationsfördernd als auch -hemmend wirken, während sie bei embryonalen Zellen durch die Beeinflussung der Homöobox-Regulatorgen-Expression das Wachstum in eine bestimmte Richtung (Körperachsen) dirigieren [221; 417].

5.1.2. Beispiele für Wachstumsfaktoren

Name:	Vorkommen:	Struktur:	Molekulargewicht:
EGF ("epidermal growth factor")	Plasma, Speicheldrüse	eine Polypeptidkette	~6000 kd
PDGF ("platelet derived growth factor")	Thrombozyten	zwei Polypeptidketten	~ 30 000 kd
FGF ("fibroblast growth factor")	glatte Muskelzellen, Plasma, einige Isoformen sollen auch im Zellkern vorkommen [61]	eine Polypeptidkette	verschiedene Isoformen: 18, 21,5, 22 und 24 kd
IGF I ("insulin like growth factor")	Plasma	eine Polypeptidkette (sehr ähnlich dem Proinsulin)	~ 13 000 kd

Tab. 4: Wachstumsfaktoren

Die Wirkweise solcher Wachstumsfaktoren sei im Folgenden am Beispiel des "epidermal growth factors" (EGF) der Maus erläutert: Es handelt sich um ein kleines Protein (53 Aminosäuren) von 6 kd, das durch Prozessierung eines 1168 Aminosäurereste-langen Transmembran-Vorläuferproteins entsteht und dessen Tertiärstruktur durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird. Es bindet an Rezeptoren der Zelloberfläche, von denen es, je nach Zelltyp etwa 40 000 bis 100 000 pro Zelle gibt. Im Tiermodell kann es bei Injektion in neugeborene Mäuse zu vorzeitiger Öffnung der Lidspalte und Zahndurchbruch führen, aber auch die DNA-Synthese und Zellteilung verschiedener Kulturzellen anregen [81; 186; 375].

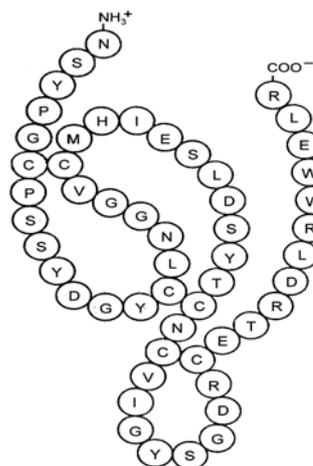


Abb. 7: Aminosäuresequenz von EGF
(nach Savage et al., 1973) [375]
(Erläuterung des internationalen Aminosäure-Codes siehe Anhang)

5.1.3. Unterschiedliche Rezeptortypen

5.1.3.1. Typ1: Proteinkinasen

Der Rezeptortyp 1 besitzt selbst Enzymaktivität. Es handelt sich um Proteinkinasen mit transmembranaler Helix, die die γ -Phosphat-Gruppe des ATP auf andere Moleküle (z. B. auf die Hydroxy-Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin, Serin und Threonin) übertragen können.

Typ:	Name:	Struktur:	Molekulargewicht:	Funktion:
1	EGF EGF- Rezeptor	eine Polypeptidkette	~ 170 000 kd	tyrosinspezifische Proteinkinase
2	IGF I - Rezeptor	zwei α - Ketten zwei β - Ketten	~ 135 000 kd ~ 90 000 kd	tyrosinspezifische Proteinkinase
3	PDGF-Rezeptor	eine Polypeptidkette	~ 185 000 kd	tyrosinspezifische Proteinkinase
4	FGF-Rezeptor	eine Polypeptidkette	~ 130 000 kd	tyrosinspezifische Proteinkinase

Tab. 5: Beispiele für Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Oftmals sind diese Rezeptoren Tyrosin-Kinasen, die durch Bindung des Botenstoffes aktiviert werden und durch Phosphorylierung von Tyrosin-Resten intrazellulärer Proteine deren chemische Aktivität verändern. Auf diese Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wird in Kapitel 5.4. noch genauer eingegangen. In erster Linie phosphoryliert dieser Rezeptor sich am zytosolseitigen, carboxyterminalen Ende selbst. An die so entstandenen phosphorylierten Tyrosinreste binden dann spezifisch Proteine, die durch anschließende Phosphorylierung ihrerseits als Enzyme aktiviert werden und so das Signal ans Zellinnere weitergeben können.

5.1.3.2. Typ 2: Ionenkanal

Der Rezeptortyp 2 ist ein Protein mit Ionenkanal-Funktion, das in der Regel vier Transmembran-Helices enthält. Die Bindung eines Botenstoffes führt hier zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit eines Kanals für bestimmte Ionen, meist Ca^{2+} , Na^+ , K^+ oder Cl^- . Auf eine solche Veränderung der Ionenkonzentration reagiert jede Zelle mit einer für sie typischen Antwort. So benötigen Muskelzellen zur Aktivierung ihrer Aktin-Myosin-Strukturen einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} - Spiegel. Auch Neuronen nutzen mit ihren Transmittern dieses Rezeptorsystem: Acetylcholin bindet an den nicotinischen cholinergen Rezeptor, einen Na^+ - und K^+ -Kanal, GABA an den neuronalen A-Rezeptor, einen Chlorid-Kanal.

5.1.3.3. Typ 3: Sieben-Helix-Rezeptor

Der Rezeptortyp 3 besitzt sieben Transmembran-Domänen in Form von α -Helices und wird auch als 7-Helix-Rezeptor bezeichnet. Er überträgt seine Signale mit Hilfe Guaninnucleotid-bindender Proteine, den sogenannten G-Proteinen. Auf diesen von vielen hydrophilen Botenstoffen genutzten Mechanismus wird in Kapitel 5.3 noch genauer eingegangen.

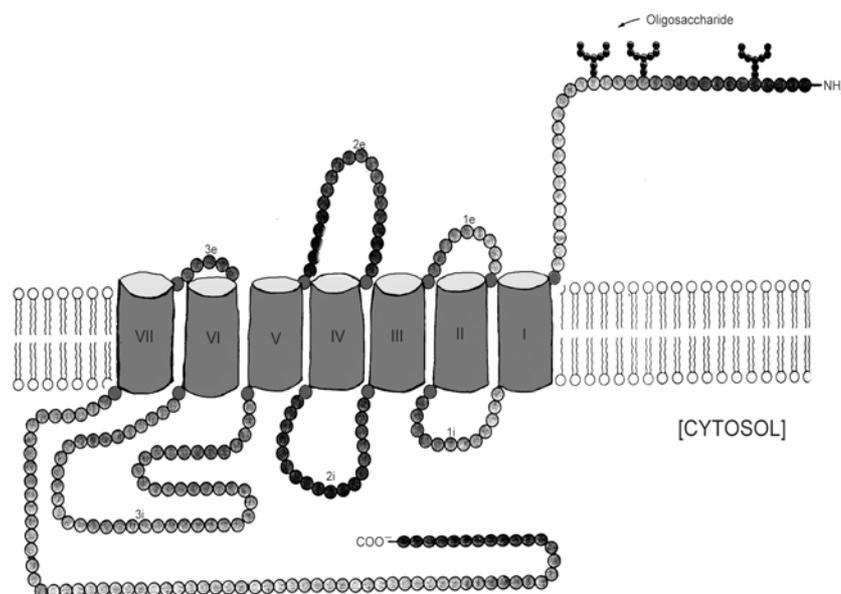


Abb. 8: Schematische Darstellung eines 7-Helix-Rezeptors
(nach Dohlman et al., 1987 und Maisel et al., 1987, bearbeitet) [109; 265]

5.2. Second Messenger

5.2.1. Eigenschaften und Beispiele

Im Laufe der Stammesgeschichte sind verschiedene Möglichkeiten für den Transport des intrazellulären Zweitsignals entstanden. Alle sogenannten Second Messenger haben gemeinsame Eigenschaften:

- Ihre intrazelluläre Konzentration wird über extrazelluläre Signale und Membranrezeptoren streng kontrolliert.
 - Sie entstehen in einer kaskadenartigen Reaktion, d. h. ein Liganden-Rezeptor-Paar kann bis zu seiner Inaktivierung viele entsprechende Zweitsignalträger freisetzen oder aktivieren
 - Falls mehrere Informationssignale über den gleichen Second Messenger generieren, ist eine Integration von Signalwirkungen möglich
- Als Second Messenger können 3',5'-cyclo-AMP (cAMP), cGMP, ein- und zweiwertige Ionen (z. B. Calcium), Diacylglycerin (DAG), Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Arachidonsäure sowie Fumarat (bei Halobakterien) fungieren.

5.2.2. Wirkungen von Ca^{2+} -Ionen als Second Messenger

5.2.2.1. Eigenschaften des Ions

Calciumionen treten bei vielen Signalübertragungswegen als intrazellulärer Botenstoff auf, außerdem sind sie für die Aktin-Myosin-Interaktion, beispielsweise bei Muskelbewegungen, von grundlegender Bedeutung.

Folgende Eigenschaften lassen es für diese Rolle geeignet erscheinen:

- Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ist normalerweise recht niedrig (etwa $0,1 \mu\text{M}$ intrazellulär gegenüber $1 \mu\text{M}$ extrazellulär). Ein Grund dafür ist unter anderem das Vorhandensein eines Überschusses an phosphathaltigen Verbindungen im Cytoplasma mit der Gefahr der Bildung schwer löslicher Calciumphosphate. Durch spezielle Transportsysteme, z.B. die Ca^{2+} -ATPase oder den Na^+ - Ca^{2+} -Antiport sorgen die Zellen für eine gleichmäßig niedrige Calcium-Konzentration in ihrem Inneren. Der so aufrecht erhaltene Konzentrationsgradient gibt einer Zelle die Möglichkeit, über die Öffnung von Ionenkanälen in Plasmamembran und/oder sarkoplasmatischem Retikulum, eine Anhebung des intrazellulären Calciumspiegels - schnell und reversibel - zur Verschlüsselung für die Weiterleitung eines extrazellulär eintreffenden Signals zu nutzen.
- Eine weitere Eigenschaft ist seine Fähigkeit, sich fest an Proteine anzulagern. Sowohl ungeladene Sauerstoffatome (wie Carbonylgruppen der Proteinhauptketten oder die Sauerstoffatome von Glutamin- und Asparaginresten), wie auch negativ geladene (in Glutamat- und Aspartatresten) binden bevorzugt an das zweifach positiv geladene Calcium-Ion (- das Mg^{2+} -Ion, ein möglicher Konkurrent und Ca^{2+} -Inhibitor kann, selbst in zwei bis drei Zehnerpotenzen höherer Konzentration, verdrängt werden, weil es nur sehr geringe Affinität zu ungeladenen Sauerstoffatomen zeigt, und weil Mg^{2+} in der Regel nur kleine symmetrische Koordinationsräume bildet, während Ca^{2+} auch zur Ausbildung asymmetrischer Komplexe mit größerem Radius fähig ist.)

Somit ist von den ubiquitär im Körper vorhandenen Kationen das Calcium, im Gegensatz zum Magnesium, gut für die Bindung an unregelmäßig geformte Proteintaschen ausgestattet.

5.2.2.2. Vermittlung der Ca^{2+} -Wirkung

Viele der Calciumwirkungen in der Zelle werden durch Calmodulin, ein 17 kd-Protein (148 Aminosäuren) vermittelt. Es dient in fast allen eukaryontischen Zellen als Calciumsensor und besteht aus zwei ähnlich aufgebauten globulären Regionen, die durch eine flexible lange α -Helix verbunden sind. Jede globuläre Region besitzt zwei sogenannte "EF-Hand-Strukturen", welche die eigentlichen Calciumbindungsstellen sind. Diese Orte der Calciumbindung vieler calciumempfindlicher Proteine (benannt nach den Helices E und F im Parvalbumin [83]) bestehen jeweils aus einer "Helix-Schleife-Helix"-Einheit, in der das Ca^{2+} an sechs Sauerstoffatome angelagert werden kann [233]. Calmodulin besitzt somit vier Bindungsstellen für Calcium-Ionen. Steigt der cytoplasmatische Calciumspiegel auf über $0,5 \mu\text{M}$ an,

wird Calmodulin durch die Bindung von drei oder vier Calcium-Ionen aktiviert und verändert seine Form.

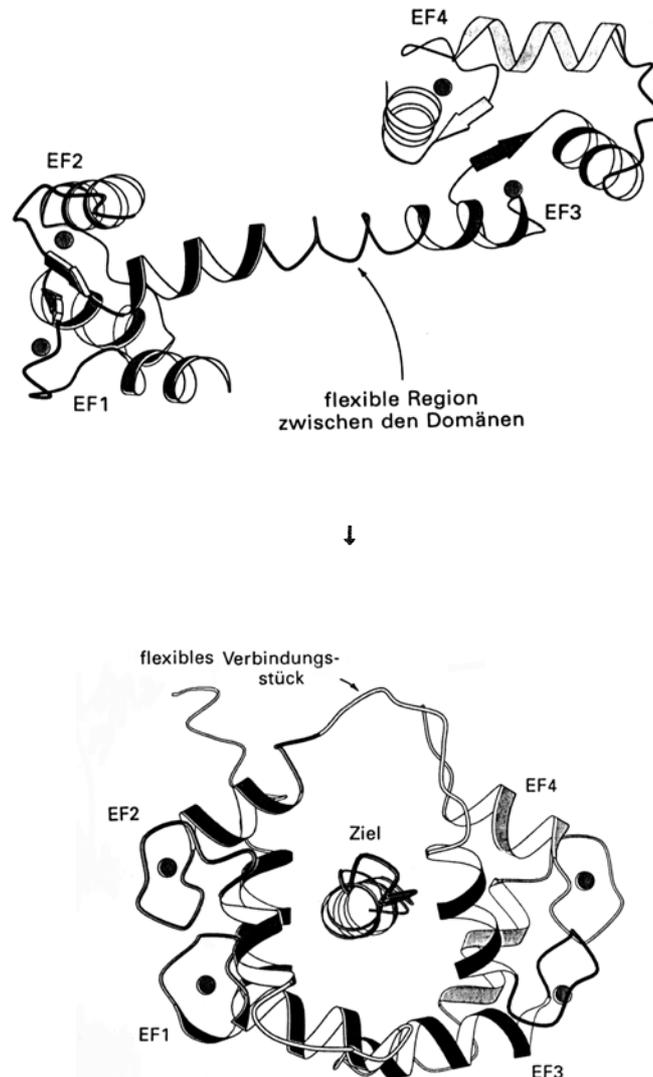


Abb. 9: Ca^{2+} -Calmodulin und seine Konformationsänderung bei Bindung an ein Zielprotein (nach Babu et al., 1987 u.1988 und Ikura et al., 1992) [21; 22; 204]

Das Ca^{2+} -Calmodulin ist ein Regulator, der mit etlichen Zielproteinen in Wechselwirkung treten und diese so aktivieren kann. Beispiele hierfür sind die Myosin-Leichtketten-Kinase, die multifunktionelle, calmodulinabhängige Protein-Kinase II (CaM-Kinase II) [187; 357; 387], welche verschiedene Proteine phosphoryliert und so Einfluss auf Ionenpermeabilität, Energiestoffwechsel und auch Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern nehmen kann und schließlich die Ca^{2+} -ATPase-Pumpe der Plasmamembran, die die ursprüngliche Calciumkonzentration in der Zelle wieder herstellt [80].

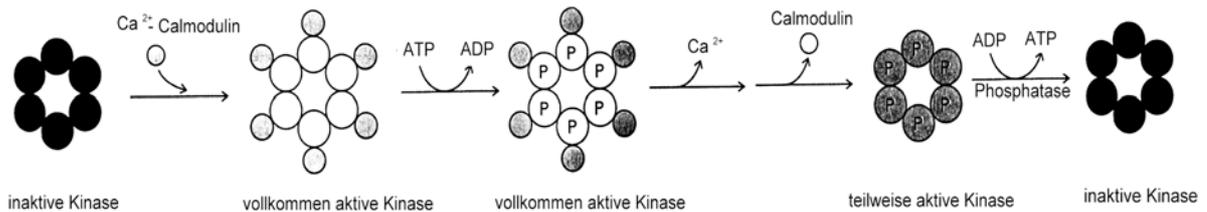


Abb. 10: Wirkweise des aktivierten Calmodulins am Beispiel der CaM II-Kinase [modifiziert, nach 387]

Die vielen unterschiedlichen Zielproteine erkennt Calmodulin wahrscheinlich über deren positiv geladene, amphipathische α -Helixregionen mit Leucin-, Lysin- oder Tryptophanresten, die mit durch die Ca^{2+} -Bindung frei werdenden negativ geladenen komplementären Regionen der globulären Domänen eine Bindung eingehen können [80; 233].

5.3. G-Proteine

5.3.1. Aufbau, Funktionsmechanismus und Inaktivierung

"Guaninnucleotidbindende Proteine" oder G-Proteine sind Teil des Signaltransduktionsmechanismus bei sogenannten Klasse-3-Rezeptoren oder "G-Protein-gekoppelten Rezeptoren". Diese zeichnen sich, im Gegensatz zu den Klasse-2-Rezeptoren (sog. "ligandengesteuerten Ionenkanälen"), durch sieben statt vier Transmembran-Domänen aus und werden deshalb auch als "7-Helix-Rezeptoren" oder "Serpentinrezeptoren" bezeichnet. G-Proteine sind Heterotrimeren, sie bestehen aus je einer α -Untereinheit mit 45 kd, einer β - sowie einer γ -Untereinheit, mit 35 bzw. 7 kd [169; 267; 360]. Die α -Untereinheit ist der Bindungsort eines Guanosin-Diphosphat (GDP)-Moleküls. Nach Bindung eines passenden Moleküls am Rezeptor wird das zugehörige ruhende G-Protein durch Austausch von Guanosin-Diphosphat an der α -Untereinheit gegen energiereicheres Guanosin-Triphosphat (GTP) aktiviert. Die aktivierte α -GTP-Untereinheit spaltet sich vom $\beta\gamma$ -Proteinkomplex ab und interagiert ihrerseits mit der ebenfalls zum Rezeptor gehörigen Effektoreinheit (z. B. Ionenkanal, Phospholipase C, Adenylat-Cyclase oder einer zytosolständigen Proteinkinase). Ein einzelner Botenstoff-Rezeptor-Komplex kann so die Bildung vieler aktiver G_α katalysieren und so beispielsweise ein Anspringen der Adenylat-Cyclase-Kaskade initiieren [208; 359].

Die Inaktivierung erfolgt durch Hydrolyse des GTP zu GDP (wobei die α -Einheit selbst als GTPase fungiert) und anschließendem 'Reassembling' mit dem verbliebenen $\beta\gamma$ -Proteinkomplex [169; 360].

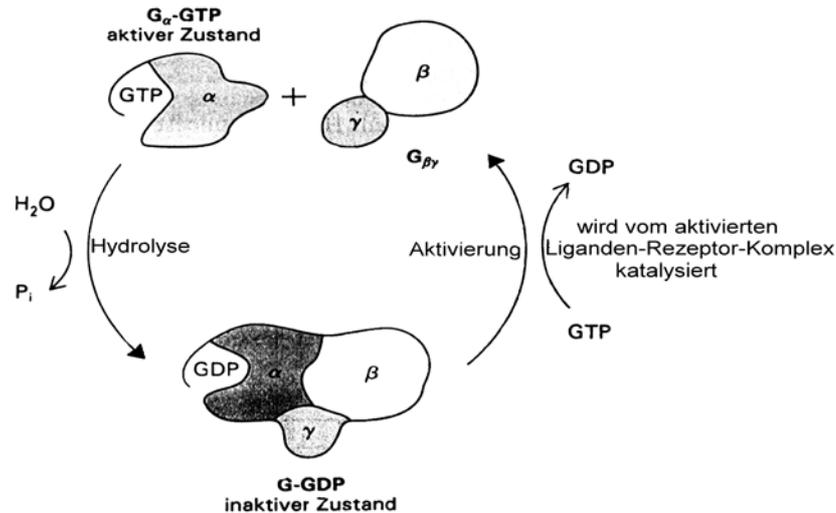


Abb. 11: Schema von Aktivierung und Inaktivierung bei G-Proteinen [modifiziert, nach 169 und 360]

5.3.2. Funktionelle Regionen und Angriffspunkte für bakterielle Toxine

G-Proteine können durch die Bindung von Cholera toxin (produziert von virulenten Stämmen von *Vibrio cholerae*) oder Pertussis toxin (*Bordetella pertussis*) in ihrer Funktion verändert werden. Die Toxine katalysieren die Übertragung einer ADP-Ribosylgruppe von NAD^+ auf einen Arginin- oder Cysteinrest der G_α -Untereinheit. Diese Modifikation durch das Cholera toxin scheint die aktivierte GTP-Form des G-Proteins, die Veränderung durch Pertussis toxin dagegen die inaktive GDP-Form zu stabilisieren und somit die bekannten Wirkungen im Körper auszulösen [87; 348].

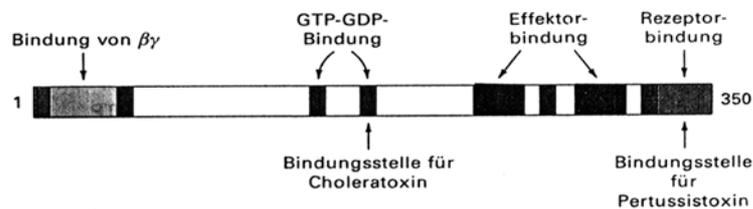


Abb. 12: Funktionelle Regionen von G_α [modifiziert, nach 377]

5.3.3. Vier funktionelle Untertypen

5.3.3.1. Die Adenylat-Cyclase-Kaskade

5.3.3.1.1. Wirkmechanismus und Inaktivierung

Die α -Untereinheit eines bestimmten G-Proteins aktiviert eine membranständige Adenylat-Cyclase, welche ATP-Moleküle in cAMP umwandelt, so dass dessen intrazelluläre Konzentration ansteigt. Das G-Protein, das die Adenylat-Cyclase kontrolliert, wird auch stimulatorisches G-Protein oder G_s genannt (bei einigen wenigen G-Proteinen kann allerdings auch eine Hemmung der Adenylat-Cyclase beobachtet werden). Die meisten Wirkungen des cAMP in Eukaryontenzellen gehen vermutlich auf dessen Aktivierung einer einzigen Proteinkinase zurück [239]. Dieses Schlüsselenzym bezeichnet man als Protein-Kinase A (PKA). Es besteht aus zwei katalytischen C-Ketten, die von zwei regulatorischen R-Ketten blockiert werden. In Abwesenheit von cAMP ist der R_2C_2 -Komplex katalytisch inaktiv. Wird jedoch cAMP, ein allosterischer Effektor, an die regulatorischen Einheiten gebunden, kommt es zur Freisetzung der katalytischen Ketten. Die aktivierte PKA phosphoryliert nun spezifische Serin- und Threoninreste in einer ganzen Reihe von Zielproteinen, z. B. in Ionenkanälen, und ist so in der Lage, deren Aktivität zu verändern [202].

Um den inaktiven unstimulierten Ausgangszustand wieder herzustellen, sind folgende Schritte nötig:

- durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit von G_s wird gebundenes GTP in kurzer Zeit wieder zu GDP hydrolysiert.
- auch der Hormon-Rezeptor-Komplex muss inaktiviert werden: eine Rezeptor-Kinase phosphoryliert das carboxyterminale Ende eines Hormon-Rezeptor-Komplexes und ein Arrestin-Protein schirmt den phosphorylierten Rezeptor zusätzlich ab, um die Fähigkeit der Aktivierung von G_s weiter zu verringern [358; 360].
- schließlich wird das am Rezeptor gebundene Hormon entfernt und cAMP wird durch die cytoplasmatische Phosphodiesterase abgebaut. Dieser Enzymschritt kann pharmakologisch durch Methylxanthine wie Coffein und Pentoxifyllin oder die pharmakologische Stoffgruppe der PDE-Inhibitoren [257] gehemmt werden.

5.3.3.1.2. Hormone, die cAMP als Second Messenger benutzen

Folgende Hormone nutzen cAMP als Zweitsignalträger: Adrenalin, Calcitonin, Choriongonadotropin, Corticotropin, FSH, Glucagon, Lipotropin, LH, MSH, Noradrenalin, Parathormon, TSH und Vasopressin.

5.3.3.1.3. Beispiele für physiologische Prozesse, die von cAMP und PKA reguliert werden

- Aktivierung der Phosphorylase-Kinase [144]
- Senkung der Produktionsrate proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α via NF κ B und NFAT [214; 423]
- Stimulierung der Expression spezifischer Gene über die PKA durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (‘cAMP-response element binding protein’) oder AP-1 [214]
- Glykogenabbau
- Inaktivierung der Glykogen-Synthase [144]

5.3.3.2. Aktivierung eines Ionenkanals

5.3.3.2.1. Wirkmechanismus und Inaktivierung

Bei dieser Variante bindet die aktivierte G_α -Untereinheit des G-Proteins an einen Ionenkanal für Ca^{2+} - oder K^+ -Ionen. Die intrazelluläre Veränderung der Ionenkonzentration löst bei den Zellen entsprechende Reaktionen aus. Nach Hydrolyse des GTP verringert sich die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanalproteins wieder.

5.3.3.3. Aktivierung einer Phosphodiesterase

5.3.3.3.1. Mechanismus

Die α -Untereinheit stimuliert hier eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase, dadurch wird cGMP beschleunigt hydrolysiert und der cytoplasmatische Spiegel sinkt schnell ab (inhibitorischer Regelkreis).

5.3.3.4. Die Phosphoinositidkaskade

5.3.3.4.1. Wirkmechanismus und Inaktivierung

Hierbei handelt es sich um die rezeptorvermittelte Hydrolyse von membranständigem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.

Die Bindung eines Hormons wie ADH an einen Oberflächenrezeptor mit G-Protein-Kopplung führt über einen der vorgenannten Schritte zur Aktivierung eines weiteren Enzyms, der Phospholipase C (PLC). Dieses Enzym kommt in verschiedenen Isoformen vor (α , β , γ und δ mit Molekülmassen von 61 bis 154 kd), von denen vermutlich alle bis auf den Isotyp PLC γ 1 von G-Proteinen aktiviert werden. PLC hydrolysiert Membranlipide, und zwar an der Phosphodiesterbindung, welche die phosphorylierte Inositoleinheit mit der acylierten Glycerineinheit verbindet. So ent-

stehen durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zwei Reaktionsprodukte mit Second Messenger-Funktion:

- Inositol-1,4,5,-trisphosphat (IP₃) und
- Diacylglycerin (DAG) [256; 346; 347; 409].

Das hydrophile IP₃ wandert ins endoplasmatische Reticulum und bewirkt dort die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern. Das lipophile DAG verbleibt in der Membran und aktiviert dort die multifunktionelle Protein-Kinase C (PKC), die bei Anwesenheit von Ca²⁺ und Phosphatidylserin Serin- und Threoninreste in vielen Zielproteinen phosphoryliert [281; 302]. Moleküle, die mit Diacylglycerin Strukturähnlichkeit aufweisen, können die Proteinkinase C ebenfalls aktivieren. Ein Beispiel hierfür ist die Gruppe der Phorbolster wie Crotonöl. Da Phorbolster physiologisch schwer abzubauen sind, ist die von ihnen induzierte Aktivierung von längerfristiger Natur. Wegen dieses möglichen Eingriffs in die Kontroll-ebene von Zellteilung und Zellproliferation gelten Phorbolster als potente Carzino-gene bzw. Tumorpromotoren.

Beide so entstandenen Second Messenger werden in physiologischem Milieu in kurzer Zeit wieder metabolisiert. IP₃ kann entweder direkt durch Phosphatasen zu Inositol abgebaut, oder auf anderem Wege erst zu Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat phosphoryliert, und anschließend in Inositol umgewandelt werden DAG wird entweder zu Phosphatidat phosphoryliert, oder aber zu Glycerin und den entsprechenden Fettsäuren hydrolysiert (darunter auch Arachidonsäure, die normalerweise die Position 2 der Glycerineinheit von PIP₂ einnimmt und Vorstufe der Prostaglandine ist) [27].

5.3.3.4.3. Durch die Phosphoinositidkaskade vermittelte Effekte

- Adrenalinsekretion der chromaffinen NNR-Zellen
- Aggregation von Thrombozyten
- Glykogenolyse in Leberzellen
- Histaminsekretion von Mastzellen
- Insulinsekretion der Inselzellen
- Kontraktion glatter Muskelzellen
- Serotoninfreisetzung durch Thrombozyten und
- Sehreizübertragung in Photorezeptoren wirbelloser Organismen

<u>Signal</u>	<u>Rezeptor</u>	<u>G-Protein-Typ</u>	<u>Effektor</u>	<u>Zellantwort</u>
Adrenalin	β-adrenerger Rezeptor	G _s	Adenylat-Cyclase	Glykogenabbau
ADH	7-Helix-ADH-Rezeptor	G _q	Phospholipase C	Kontraktion glatter Muskelzellen
Acetylcholin	muscarinischer Rezeptor	G _i	Kaliumkanal	Verringerung der Schrittmacheraktivität
Geruchsstoff-Molekül	Geruchsrezeptor	G _{olf}	Adenylat-Cyclase	Geruchsempfindung
Licht (Photonen)	Rhodopsin	Transducin	cGM-Phosphodiesterase	Sehempfindung

Tab. 6: Von verschiedenen G-Protein-Typen vermittelte physiologische Reaktionen (nach Stryer & Bourne, 1986) [413]

5.4. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind ebenfalls Vermittler von Proteinphosphorylierungen bei der Signalübertragung. Im Gegensatz zu den "informationsmoderierenden" 7-Helix-Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die nur eine Transmembran-Domäne aufweisen, jedoch selbst Enzyme. Die extrazelluläre Domäne mit

dem N-Terminus trägt die Bindungsregion für den Botenstoff, die katalytische Domäne mit den Autophosphorylierungsstellen ragt frei ins Cytosol.

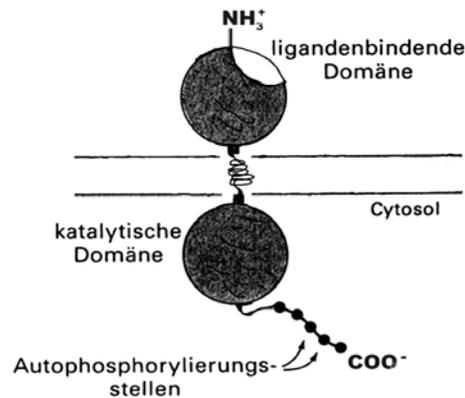


Abb. 13: Schematische Darstellung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase

5.4.1. Die vier Klassen

Wie in Kapitel 5.1.3. einleitend angesprochen, unterscheidet man vier Klassen von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Der EGF-Rezeptor steht für Typ 1, der IGF I- bzw. Insulin-Rezeptor für Typ 2, der PDGF-Rezeptor für Typ 3 und FGF-Rezeptoren für den vierten Typ.

Typ 2 ist, im Gegensatz zu den drei anderen monomeren Proteinen, ein Tetramer: jede α -Kette ist über Disulfidbrücken an die andere α - sowie an eine β -Kette gebunden. Bei allen vier Ketten liegt das N-terminale Ende auf extrazellulärer Seite.

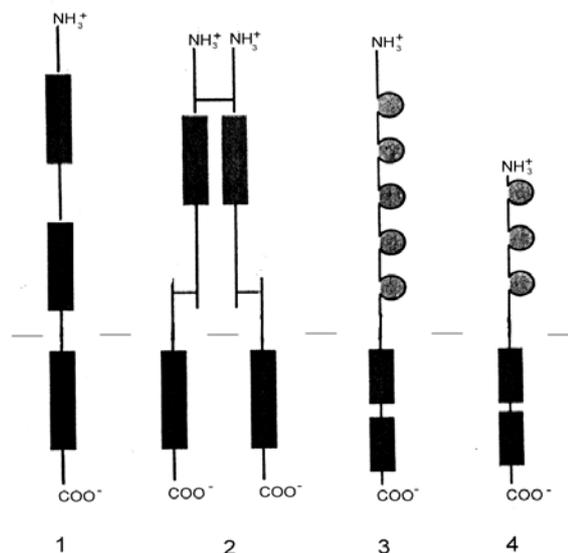


Abb. 14: Die vier Klassen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (modifiziert nach Ullrich et al., 1986) [434]

1= EGF-Rezeptor; 2= Insulin-Rezeptor; 3=PDGF-Rezeptor; 4= FGF-Rezeptor

5.4.2. Funktionsweise

Docken Botenstoffe, beispielsweise EGF, an den extrazellulären Bindungsregionen der Rezeptormoleküle an, kommt es bei den einzelnen Rezeptormolekülen zur Konformationsänderung und einer Zusammenlagerung zu Dimeren. Dadurch wird die Tyrosin-Kinase-Aktivität des Proteins „angeschaltet“ und das katalytische Zen-

trum einer Kette phosphoryliert in der Folge fünf Tyrosinreste am carboxyterminalen Ende der anderen Kette des Dimers. Diese Autophosphorylierung steigert die Fähigkeit des Rezeptors, das empfangene Signal durch Phosphorylierung anderer Proteine ins Zellinnere weiterzuleiten und scheint den Zielproteinen die Anlagerung zu erleichtern.

Beim schon als Dimer aus zwei $\alpha\beta$ -Ketten vorliegenden Insulinrezeptor läuft die Aktivierung ebenfalls über räumliche Konformationsänderung und gegenseitige Autophosphorylierung der Dimerpartner ab.

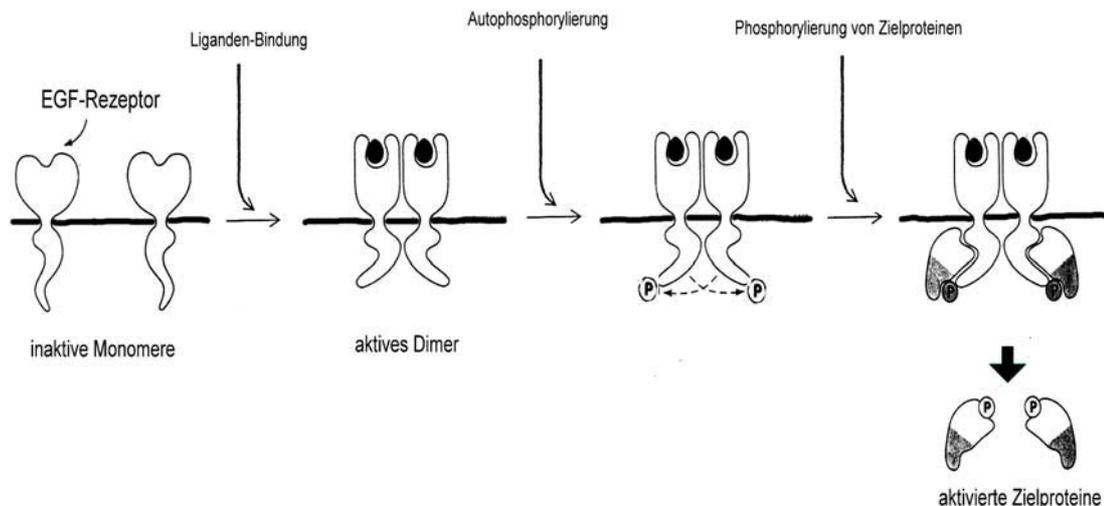


Abb. 15: Schematische Darstellung von Konformationsänderung, Dimerisierung und Aktivierung durch Autophosphorylierung am Beispiel des EGF-Rezeptors.

5.4.3. Tyrosin-Kinasen der src-Familie („Nichtrezeptor-Tyrosin-Kinasen“)

Das c-src-Protein ist der Prototyp für eine Familie von neun Tyrosin-Kinasen (darunter src, hck, fyn, yes und lyn), oft auch als Nichtrezeptor-Tyrosin-Kinasen bezeichnet. Alle Mitglieder der src-Familie besitzen eine variable Region gefolgt von SH2 (src-homology 2)- und SH3 (src-homology 3)-Domänen, der katalytischen (Kinase)Region und einem kurzen carboxyterminalen Schwanz. Src, ein 60 kd-Protein des Cytoplasmas, ist im aktiven, metabolisch wirksamen Zustand membranaffin (inaktiv ist es vorwiegend perinukleär angesiedelt). Diese Membranaffinität wird durch eine Myristylierung, eine kovalenten Verknüpfung des N-Terminus mit Fettsäuren, vermittelt [230; 231].

Die Protein-Kinase c-src wird beispielsweise in Säuger-Fibroblasten vorübergehend während des Zellzyklus beim Übergang von der G₂-Phase zur Mitose aktiviert. Auch Thrombin induziert über den G-Protein-gekoppelten 7-Helix-Thrombin-Rezeptor einen schnellen (<30 sec), vorübergehenden Anstieg der Kinase-Aktivität. Schließlich sind auch sowohl der α_2 -adrenerge Rezeptor als auch der muskarinische m₁-Rezeptor in der Lage, die src-Kinase-Aktivität sowohl über Pertussis-toxin-sensitive als auch -nichtsensitive G-Proteine zu erhöhen [318].

Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass die Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen der src-Familie ein Effektorsystem darstellen, das G-protein-gekoppelte Membranrezeptoren mit der Aktivierung untergeordneter Ebenen wie den ras-Proteinen und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase)-Kaskade verbindet, die Signalweiterleitung also moderiert [263; 396].

4.4.3.1. Wirkmechanismus

Adapterproteine wie Grb2 scheinen durch Tyrosinphosphorylierung aktivierte Wachstumsfaktorrezeptoren mit einem sog. ras-Guaninnukleotid-Austauschprotein (z.B. sos) in Kontakt bringen zu können (siehe auch Abb. 18). Nach einem solchen Nukleotidaustausch bringt das GTP-gebundene ras ein Protein Namens raf-1-Kinase zur Plasmamembran, wo es aktiviert wird und die MAP-Kinase-Kaskade anstößt [396]. Nichtrezeptor-Tyrosin-Kinasen wie die Mitglieder der src-Familie können offenbar sowohl als direkte Effektoren von G-Proteinen wirken, als auch den ras-Signalübertragungsweg aktivieren. Vermutlich geschieht dies über Adaptoren wie die Shc-Moleküle, die - nach Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste - mit Grb2 und sos komplexieren und interagieren. Tyrosinphosphorylierte Shc-Moleküle werden beispielsweise in Zellen gefunden, die mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren stimuliert oder auch durch v-src transformiert wurden [65; 263; 316; 318; 377].

Auch die verschiedenen Klassen der Phosphoinositid 3-Kinasen (PI₃K) tragen an ihrer regulatorischen Einheit SH2-Domänen [182; 183]. Diese strukturkonservierte Familie - Oberflächenrezeptor-aktivierte PI₃K finden sich in so verschiedenen Eukaryonten wie Säugetieren, Insekten, Nematoden und Schleimpilzen, nicht aber bei Hefen - mit Signalübermittler-Funktion ist mutmaßlicher Erzeuger von Second Messengern, beispielsweise der Lipide Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (IP₃), die offensichtlich bei rezeptorstimulierten Signalprozessen, z. B. über eine Verbindung mit dem platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), von Bedeutung sind [275; 281; 466]. Klasse 1A PI₃-Kinasen sind heterodimere Proteine bestehend aus einer regulatorischen Untereinheit (85 kD), die eng mit einer katalytischen Untereinheit (110 kD) verbunden ist. Eine Aktivierung erfolgt wahrscheinlich durch eine Translokation an der Plasmamembran durch eine Interaktion der SH2-Domäne der p85-Untereinheit von PI₃K mit pYXXM-Motiven von Rezeptorproteinkinasen oder deren Substraten, wobei verschiedene Domänen von Adapter-Untereinheiten, Ras, sowie interagierende Proteine eine Rolle spielen sollen. Das letztendlich entstehende Produkt, Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP₃), kann dann seinerseits mit verschiedenen Proteinen wie der Akt/Proteinkinase B (PKB), Bruton's Tyrosinkinase (Btk), Phosphoinositid-dependent kinase (PDK), der Integrin-linked kinase (ILK), der Proteinkinase C (PKC), der Phospholipase C_γ und anderen interagieren. Neben der Bildung von D₃-phosphorylierten Lipiden haben die PI₃K auch eine intrinsische Proteinkinase-Aktivität [466]. Für die trimere GTP-bindende protein-aktivierte PI₃K_γ beispielsweise, scheint eine entsprechende Proteinkinase-Aktivität sogar notwendig zu sein, um mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) beeinflussen zu können [466]. PI₃K kommt somit eine Schlüsselrolle in vielerlei zellulären Prozessen vielzelliger Organismen wie Zellteilung und Zellbewegung, Apoptose, Aktin-Reorganisation sowie Regulation des vesikulären 'membrane-trafficking' zu [65; 231; 400; 404; 441]. Die Steigerung ihrer Lipidkinase-Aktivität kann *in vitro* unter anderem durch MCP-1 stimuliert werden [431], Statine (erste Untersuchungen existieren zu Lovastatin) scheinen diesen Growth factor-Signalweg teilweise blockieren zu können [275].

5.4.3.2 Bedeutung von Autophosphorylierung und SH2- und SH3-Domänen

Die Zielproteine des Cytoplasmas erkennen ihre durch phosphorylierung aktivierten Tyrosin-Kinasen mit Hilfe einer konstanten Region aus 100 Aminosäureresten, die SH2 (src-homologe Region 2) genannt wird. Das src-Protein besitzt ebenfalls eine katalytische Region mit Tyrosin-Kinase-Aktivität, ihm fehlt allerdings eine extrazelluläre Rezeptordomäne für Botenstoffe. Aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen jedoch

können src binden und phosphorylieren die Tyrosinreste dieses Proteins - dadurch wird auch seine katalytische Aktivität angeschaltet (src-Kinase) [133; 318].

Die SH2-Domänen, ein immer wiederkehrendes konserviertes Strukturmotiv, können also offenbar bestimmte phosphorylierte Peptide erkennen und gezielt daran binden. So bringen sie ihre Träger (src oder andere intrazelluläre Signalproteine wie ras) effektiv zu den aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen [133; 230; 396; 448]. Ein weiteres Beispiel hierfür ist die Phospholipase C-Isoform $\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$), die in Kapitel 5.3.2.4. erwähnt wurde. Dieses Enzym wird vom EGF-Rezeptor aktiviert, was Calcium-Freisetzung und Stimulierung der Protein-Kinase C zur Folge hat. Es wurde nachgewiesen, daß PLC $\gamma 1$, im Gegensatz zu den anderen Phospholipase C - Isoformen, zwei SH2-Domänen trägt (- zusätzlich ermöglicht auch ihr eine weitere spezielle Domäne, SH3 genannt, die Bindung an die inneren Cytoskelettstrukturen der Plasmamembran) [346; 347].

In der Regel erkennen SH3-Domänen Aminosäure-Motive, die die Sequenz PXXP, also eine Polyprolin-Typ II (PP II) - Helix beinhalten. Sie selbst bestehen aus fünf β -Strängen, die eine hydrophobe Bindungsoberfläche für die prolinreiche Sequenz bilden, flankiert von zwei Verbindungs-Schleifen, der sog. RT und der n-Src-Schleife. Diese Schleifen können selbst offenbar ebenfalls spezifische Bindungen mit Liganden eingehen und so die Affinität erhöhen [318; 396].

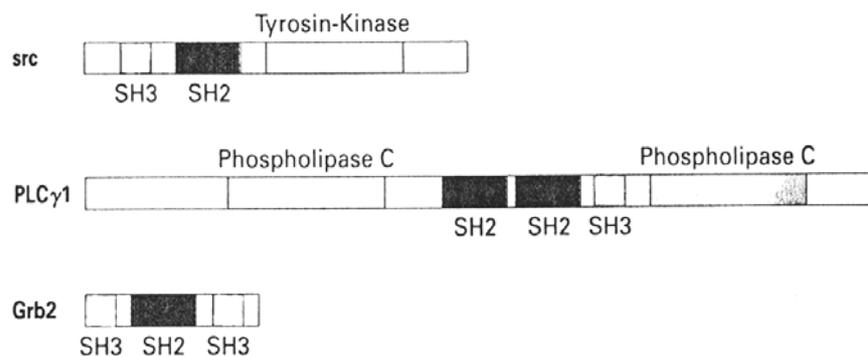


Abb. 16: SH2-Domänen in Signal- und Regulatorproteinen wie src, PLC $\gamma 1$ und Grb2 (nach Schlessinger & Ullrich, 1992 und Pawson, 1997) [318; 377]

6. 'Downstream- Effektoren': MAP-Kinasen (MAPK) und GTPasen

6.1. MAP-Kinasen

Die Signalübertragungskaskade *via* Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) ist ein wichtiger und von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern oft beschrittener Weg, um physiologische Antworten zu regulieren. Obwohl die Aktivierung des MAPK-Weges über Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität und nachfolgende Enzymschritte geklärt ist, liegt ein Großteil der Mechanismen, wie heterotrimeren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren dies im einzelnen bewerkstelligen, noch im Dunkeln.

6.1.1. Aktivierung und Funktion

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind eine Familie von Enzymen, die durch Phosphorylierung von Threonin- und Thyrosinresten, die durch eine einzige Aminosäure getrennt sind, aktiviert werden. Diese Aktivierung geschieht - wahrscheinlich über Vermittlung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren - durch eine Proteinkinase aus der Genfamilie der sogenannten Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Ki-

nasen oder MAP Kinase Kinasen (MAPKK). Diese werden, zumindest teilweise, ihrerseits von Protoonkogenprodukten reguliert [307; 370; 451]. Die ersten beiden entdeckten Mitglieder der MAPK-Familie in Säugerzellen waren die nah verwandten p42 und p44 MAP-Kinasen, die von einer ganzen Reihe Wachstumsfaktoren und anderer Stimuli aktiviert werden können. Sie phosphorylieren ihrerseits eine Vielzahl intrazellulärer Proteine, darunter andere Kinasen, Transkriptionsfaktoren aber auch Cytoplasma- und Cytoskelettproteine. Beide scheinen für die Zellproliferation und Differenzierungsschritte von Bedeutung zu sein [458].

Als nächstes wurden p54 MAPK (α , β und γ) und p38 MAPK gefunden. Beide Proteine werden nur in geringem Maße durch mitogene Substanzen, dafür aber von Zellstressoren, Endotoxinen und den Entzündungsmediatoren Interleukin 1 (IL-1) und TNF (Tumornekrosefaktor) aktiviert [370]. Die p54 MAP-Kinase phosphoryliert und aktiviert die Transkriptionsfaktoren c-Jun und "activating transcription factor-2", ihre Hauptfunktion scheint somit die Kontrolle der Expression von c-Jun und anderen, von Aktivator-Protein-1-Komplexen regulierten Genen zu sein. Die Funktion der p38 MAP-Kinase ist nicht völlig klar. Sie ist strukturell verwandt mit dem Hefe-Genprodukt HOG1. Dieses ist Teil eines alten osmosensorischen Signalwegs, der unter anderem die Glycerinsynthese reguliert, um dem primitiven Eukaryonten das Überleben unter hyperosmolaren Bedingungen zu ermöglichen [173]. Im Säugetierorganismus scheint die p38 MAPK ein potenter Aktivator der MAPK-aktivierten Proteinkinase-2 (MAPKAPK-2) zu sein, die das kleine Hitzeschockprotein hsp 27 phosphoryliert. Die physiologische Bedeutung dieses Schrittes ist fraglich, es könnte Zellen helfen, thermischen Stress besser zu überstehen. Ein starker Anstieg von phosphoryliertem hsp 27 wird aber auch während der Plättchenaktivierung beobachtet, so dass das Enzym eventuell zusätzlich eine Rolle in der physiologischen Thrombozyten-Antwort spielt [38; 305; 370].

6.2. ras-ähnliche GTPasen

Hier handelt es sich um eine Familie von etwa 50 kleinen, zytosolischen Proteinen (20-35 kd) mit GTPase-Aktivität, die durch ihre regulatorischen Wirkungen eine Kontrollfunktion in der Zelle, beispielsweise auf Cytoskelettkonformation, Zellproliferation und -differentiation, intrazellulären Vesikeltransport sowie die NADPH-Oxidase-Funktion übernehmen (Beispiele sind die Familien der GTP-bindenden rho-, rac-, und ral-Proteine und eben die ras-Familie). Sie liegen als Monomere vor und sind kleiner als G-Proteine, scheinen mit diesen aber einige gemeinsame Eigenschaften und Struktur motive zu haben [37; 39; 129; 130].

6.2.1. Funktion und Inaktivierung

Säugerzellen besitzen vier ras-Proteine mit jeweils einem Molekulargewicht von 21 kd: H-, N-, K- und K-rasB. Diese Proteine pendeln zwischen einer aktivierten GTP- und einer inaktiven GDP-Form hin und her. Die GTP-Formen dieser Proteine können über eine Wirkung auf Serin-Threonin-Proteinkinasen Zellwachstum und Differenzierung stimulieren [378].

Durch die autokatalytisch eingeleitete Hydrolyse von GTP zu GDP kommt es durch eine Konformationsänderung des ras-Proteins zu dessen enzymatischen Inaktivierung [37; 39; 310].

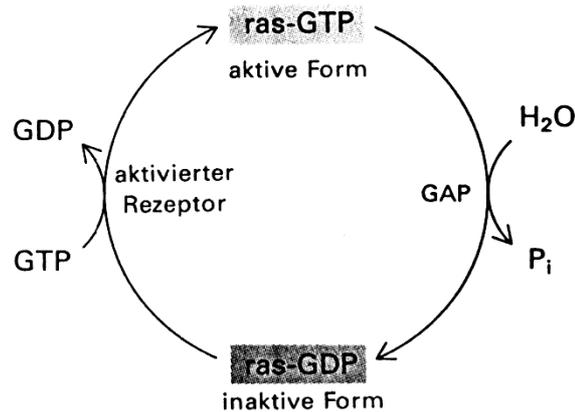


Abb. 17: Schematische Darstellung einer ras-Aktivierung durch Phosphorylierung

6.2.2. Das ras-Gen und seine Produkte

Einige ras-Proteine besitzen - ebenso wie die membranassoziierten Strukturproteine Ankyrin, Vinkulin und Glycophorin oder einige Hormonrezeptoren - einen Membrananker aus Lipiden (Fettsäuren und Isoprenoide).

Die ras-Proteine wurden durch die krebsauslösenden Eigenschaften ihres viralen Gegenstücks v-ras entdeckt, das von bestimmten Mäuse-Sarkom-Viren codiert wird. Dieses virale Onkogenprodukt unterscheidet sich vom zellulären c-ras-Genprodukt lediglich durch seine verminderte GTPase-Aktivität, die es dauernd katalytisch aktiv hält. Schon die Mutation in einer einzigen Aminosäure, z.B. Austausch von Glycin gegen Valin, genügt zur Umwandlung von c-ras in ein Onkogen. Bei den zellulären ras-Proteinen kann der inaktivierende Hydrolyseschritt von gebundenem GTP zu GDP durch das sogenannte GTPase-aktivierende Protein GAP (116 kd) erheblich beschleunigt werden. Dieses Protein bindet zwar auch an onkogene ras-Produkte, kann deren Hydrolysegeschwindigkeit aber nicht nennenswert heraufsetzen. Onkogenes ras-Protein befindet sich somit die meiste Zeit in der aktivierten GTP-Form [37].

6.2.3. Mechanismen in der Zellentwicklungskaskade

Ras-Proteine bekommen die für sie bedeutsamen Informationen von Botenstoffen wie Wachstumsfaktoren über Tyrosin-Kinase-assoziierte Rezeptoren (TKAR), 7-Helix-Rezeptoren und vor allem Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und SH2-Domänen-tragende, sogenannte Adapterproteine wie Grb2, vermittelt. Ihr Aktivierungsschritt kann in Säugerzellen noch von GTP-GDP-Austausch-Katalysatoren wie dem Protein sos getriggert werden [129; 396]. Aktivierte ras-Proteine katalysieren die Aktivierung in der Signaltransduktionshierarchie der Zelle untergeordneter Proteine, vor allem von Serin- und Threoninkinasen, die durch Phosphorylierung wiederum die Funktionszustände anderer Proteine beeinflussen. Letztendlich werden Zellproliferations- und Transkriptionsprozesse stimulierend beeinflusst [130; 378].



Abb. 18: Schematisierte Wachstumskontrollkaskade im Säugerorganismus (nach Schlessinger, 1993 und Simon et al., 1993, bearbeitet) [378; 396]

6.3. Bedeutung unterschiedlicher Signaltransduktionsproteinen für Zellfunktion und -interaktion

Besondere Bedeutung für die Zelle haben Signaltransduktionsproteine (die sich gegenseitig beeinflussen können bzw. in den Kaskadereaktionen voneinander abhängig sind), besonders der MAP-, Src- und Ras-Gruppen. Sie beeinflussen und modulieren unter anderem Veränderungen an Aktinfasern und Cytoskelett [75; 353], und damit verbunden auch intrazellulären Transport, die Zelladhäsion [221], über Interaktionen mit Cateninen und Cadherinen die Undurchlässigkeit von tight junctions, sowie Zellteilungsvorgänge [75; 76; 86; 199; 353].

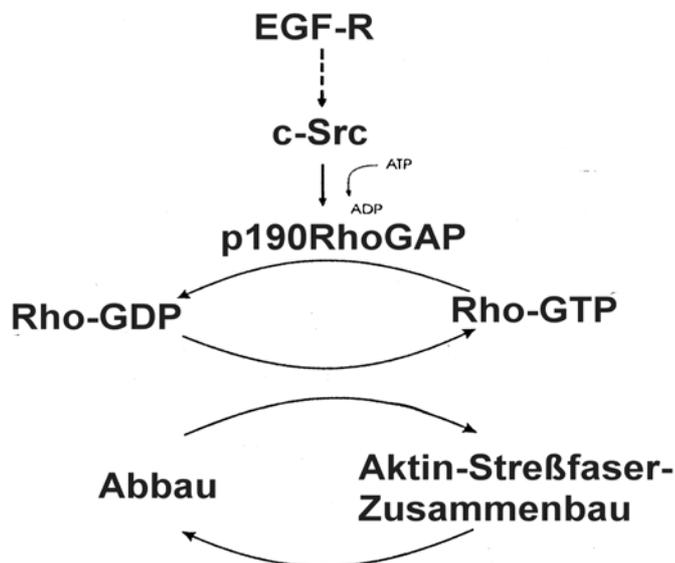


Abb. 19: Schema des Zusammenwirkens verschiedener Ebenen der Signaltransduktionskaskaden vom Wachstumsfaktor-Rezeptorsignal bis zur Umstrukturierung des Aktin-Gerüsts (nach Chang et al., 1995, bearbeitet) [69]

Durch die Vielzahl dieser basalen Funktionen ist auch ein Einfluss auf die Integrität des Endothel-Monolayers, die Funktionalität des Endotheliums und Atheroskleroseentstehung [75; 165], und im Falle einer Fehlregulation sogar die Gefahr von pathologischer Zellfunktion oder maligner Transformation, aber auch eine Möglichkeit zur pharmakologischen Beeinflussung durch von außen zugeführte Faktoren gegeben.

7. Gene: Erbinformation und ihre Trägersubstanzen

7.1. Nucleinsäuren

Die Gene beinhalten die Information über den Gesamtbauplan und die biochemischen Funktionsmöglichkeiten eines Organismus. Sie liegen in bei Eukaryonten der Regel auf der DNA (Desoxyribonucleinsäure) einer jeden Zelle, einem meist doppelsträngigen, gerichteten polymeren Nucleinsäuremolekül. Die monomeren Bausteine einer Nucleinsäure sind die sogenannten Nucleotide, die aus drei Komponenten aufgebaut sind: einer Purin- oder Pyrimidinbase, einem Pentose-Zucker, und an dessen C5-Atom einem Phosphatrest. In der unverzweigten DNA kommen als Zuckerbestandteil Desoxyribose, sowie die beiden Purinbasen Adenin und Guanin und die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin vor.

Die ebenfalls unverzweigten RNA-Moleküle (Ribonucleinsäuren) unterscheiden sich von der DNA in folgenden Merkmalen: sie enthalten als Zuckeranteil Ribose und die Pyrimidinbase Uracil anstelle von Thymin. Es gibt mehrere Arten von RNA: ribosomale RNAs (rRNA) sind die Bau- und Funktionselemente der Ribosomen (Proteinsyntheseapparat der Zelle), Messenger-RNA (mRNA) überbringt dem Proteinsyntheseapparat eine Kopie des Gens auf der DNA, Transfer-RNA (tRNA) liefert jeweils exakt markierte und aktivierte Aminosäurebausteine zum Ort der Proteinsynthese, und bei RNA- und Retroviren tritt sie als originärer Träger der Erbinformation des Viruspartikels auf. Der redundante genetische Code aus dem die Erbinformation aufgebaut ist, besteht aus einer Dreierfolge von Nucleotiden: je (mindestens) ein Triplet auf der DNA oder RNA steht für eine Aminosäure im nachfolgend entstehenden Genprodukt, dem Protein. Die Proteine werden an den Ribosomen genau nach der "Blaupause" auf der m-RNA aus einzelnen aktivierten Aminosäuren zusammengebaut. Der internationale Ein- und Drei-Buchstaben-code für Aminosäuren ist im Anhang aufgeführt.

7.2. Early-Response-Genes: Funktionen und Beispiele

'Early-Response-Genes' bzw. 'immediate early genes' sind unterschiedliche Gene, die in der Frühphase einer Zellreaktion aktiviert und abgelesen werden, deren mRNA und Genprodukt also sehr früh, beispielsweise nach einer entsprechenden Zellstimulation (in der vorliegenden Arbeit Inkubation mit TNF oder PMA), nachweisbar ist. Beispiel für ein Frühphase-Protein bei Entzündungsprozessen im Säugerorganismus ist das C-reaktive Protein (CRP). Bei Endothelzellen können, abhängig vom einwirkenden Reiz, beispielsweise die Gene c-fos, EGA-1 und MCP-1 [362; 363] aktiviert werden. Ihre Funktion in der Zelle kann unter anderem die Bereitstellung von Kernproteinen oder Transkriptionsfaktoren (c-fos, NF κ B) oder die Bildung bestimmter Oberflächenproteine und Chemokine, die u. a. eine Rolle beim Anlocken von Monozyten, deren Adhäsion an die Gefäßinnenfläche bzw. Transmigration durch die Intima spielen (MCP-1, ICAM).

7.2.1. MCP-1

Das 'Monocyte Chemoattractant Protein' (MCP-1) ist ein Mitglied der CC-Chemokin-Familie [455]. Es hängt eng mit der Interaktion verschiedener Zellarten bei Immunreaktionen und Entzündungsprozessen sowie mit dem Beginn atherosklerotischer Prozesse zusammen. Es wird vor allem durch proinflammatorische Substanzen wie die Interleukine IL-8 und IL-12 oder TNF- α induziert [46; 394] und vor allem von cytokinaktivierten Endothelzellen gebildet und sezerniert [362]. Es tritt bei entzündlichen Prozessen, rheumatoider Arthritis [229], Lungenfibrose, bestimmten infektiösen und granulomatösen Lungenerkrankungen [72] sowie in atherosklerotischen Läsionen bzw. atheromatösen Plaques auf [6; 298; 420]. Sein Konzentrationsgradient bei Expression scheint Monozyten und CD45RO⁺ Lymphozyten über

das Rezeptormolekül Chemokinrezeptor 2 (CCR2) hochwirksam anzulocken [154] und somit ein effektiver Regulator der Monozytenwanderung zu sein [60; 261]. In Monozyten scheint es zusätzlich die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle zu regulieren sowie (eventuell über einen NFκB-vermittelten Weg) einen Einfluß auf die Produktion von Cytokinen zu nehmen [213; 214]. Im *in vitro* Versuch lagerten sich Monozyten bevorzugt an wandernde Endothelzellen bzw. an die Zellen der Reparaturfront nach Ballon-Denudationsverletzungen im lebenden Modell an [213; 362]. *In vitro* scheint MCP-1 außerdem in der Lage zu sein, Phosphatidylinositol 3-Kinasen zu aktivieren [431].

In der vorliegenden Arbeit wurde beispielhaft *in vitro* die Aktivierung von MCP-1 in Endothelzellen nach alleiniger Vorbehandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor/TNF bzw. Phorbol-12-myristilat-13-acetat/PMA (einem unspezifischen Mitogen, das über Proteinkinase C und ras wirkt), mit dem möglichen Einfluß einer nachfolgenden Exposition mit physiologischem Rotwein-Eluat (1%) auf die Zellen verglichen.

8. Onkogene und Möglichkeiten der malignen Transformation

8.1. Übersicht und Beispiele

Onkogene sind genetische Elemente, deren eigentliche Funktion im Bereich Zellteilung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung anzusiedeln ist, die nach Veränderungen oder Wegfall von Kontrollinstanzen aber tumorigenes Potential haben. Sie wurden zuerst in Sarkom-verursachenden Viren entdeckt: 1909 klärte P. Rous den ursächlichen Zusammenhang eines - später Rous-Sarkom-Virus getauften - Virus mit dem Auftreten bestimmter Geflügel-Tumoren auf.

c-onc :	Mutation :	Tumorform :
abl	Translokation zum <i>bcr</i> -Gen auf dem Chr. 22 ('Philadelphia-Chromosom')	chronisch myeloische Leukämie (CML)
erb B	Genamplifikation	Glioblastom
myc	Translokation zum Immunglobulin-Gen	Burkitt-Lymphom u. a.
L-myc	Genamplifikation	Kleinzelliges Lungenkarzinom
N-myc	Genamplifikation	Neuroblastom u. a.
K-ras	Punktmutation	Colon-, Lungen-, Pankreas-Karzinom u. a.
H-ras	Punktmutation	Blasenkarzinom u. a.

Tab. 7: Beispiele für die Rolle von Onkogenen bei der Tumorentstehung (nach Fleckenstein et al., 1994) [135]

8.1.1 Protoonkogene, Onkogene und ihre Produkte

Um zwischen Onkogenen, die in ein Retrovirusgenom aufgenommen und eventuell verändert wurden und den "Protoonkogenen", die im regulären Genom einer Zelle vorkommen unterscheiden zu können, wurden die Abkürzungen v-onc (viral) und c-onc (zellulär) eingeführt. Reguläre zelluläre Onkogene, auch Protoonkogene genannt, codieren in der Regel für eine Gruppe von Proteinen, die an der Kontrolle normaler Wachstums-, Differenzierungs- und Regenerationsprozesse beteiligt sind. Am Beispiel der rho-Subfamilie (rho A, B und C, CDC 42, sowie rac 1 und 2) wären das Veränderungen der Aktin-Binnenstrukturen und der fokalen Adhäsion.

Virale Onkogene sind meist nicht mehr mit den Ursprungsgenen identisch, und ein Protoonkogen kann, nachdem es von einem Retrovirus aufgenommen wurde, folgendermaßen zu einem Onkogen verändert werden: entweder wird seine Sequenz durch Nucleotidaustausch, Deletion oder Vervielfachung strukturell verändert oder durch Fusion mit retroviralen Strukturgenen modifiziert, oder aber das Protoonkogen gerät unter die Kontrolle der viralen LTR-Transkriptionsstartsignal-Sequenzen und wird deshalb überexprimiert (letzteres könnte auch mit einem regulären zellu-

lären Protoonkogen geschehen, das nach dem Einbau einer retroviralen DNA-Kopie in den Einflussbereich eines schwach karzinogenen Retrovirus gerät [54; 229]).

Genprodukt	Onkogen	Retrovirus	Wirt	Tumor
nukleäre Proteine / Transkriptionsfaktoren:	fos	FBJ-Osteosarkom-Virus	Maus	Sarkom
	myb	Vogel-Myeloblastose-Virus	Geflügel	Leukämie
	myc	Vogel-Myelo-cyтомatose-Virus	Geflügel	Karzinom Sarkom Leukämie
Tyrosin-Kinasen:	abl	Abelson-Mäuse-Leukämie-Virus	Maus	Leukämie
	erbA	Vogel-Erythroblastose-Virus	Geflügel	Erythroleukämie
	erbB	Vogel-Erythroblastose-Virus	Geflügel	Erythroleukämie
	src	Rous-Sarkom-Virus	Geflügel	Sarkom Gliom
	yes	Yamaguchi-Sarkom-Virus	Geflügel	Sarkom
	neu	Ratten-Neuroblastom-Virus	Nager	Neuroblastom
	HER-2	Punktmutation durch Neuroblastom-Virus?	Mensch	Brust- und Gebärmutterkrebs
guanylnucleotidbindende Proteine	H-ras	Harvey-Ratten-Sarkom-Virus	Nager	Sarkom
	Ki-ras	Kirsten-Ratten-Sarkom-Virus	Nager	Sarkom
Wachstumsfaktoren	sis	Affen-Sarkom-Virus	Primaten	Sarkom
	tax	HTLV-1	Mensch	T-Zell-Leukämie
Wachstumsfaktor-Rezeptoren	erbB	Vogel-Erythroblastose-Virus	Geflügel	Erythroleukämie
	tax	HTLV-1	Mensch	T-Zell-Leukämie

Tab. 8: Beispiele retroviraler Onkogene (nach Knippers, 1985 und Riede et al., 1995) [229; 351]

Onkoprotein	Gen	DNA-Virus	natürl. Wirt	tumorentwickelnde Spezies	Erkrankung
Tyrosin-Kinasen	yes	Polyomavirus	Maus	Jungmaus	Karzinom, Sarkom
proliferationsverstärkender Ligand von Transkriptions kofaktor Cyclin A	E1A	Adenoviren	Mensch	Junghamster	Sarkome, lymphatische Leukämien
nukleäre Proteine, die Tumor-Suppressorgene inhibieren (bes. P53 und pRB-110)	E1A	Adenoviren (Typen 12, 18, 31 und 3, 7, 11)	Mensch	Junghamster	Sarkome, lymphatische Leukämien
	E1B	Adenoviren (Typen 12, 18, 31 und 3, 7, 11)	Mensch	Junghamster	Sarkome, Lymphatische Leukämien
	"T"	BK-Virus	Mensch	Junghamster	Sarkome
nukleäre Proteine bzw. Transkriptionsfaktoren	myc	EBV	Mensch	Mensch	Burkitt-Lymphom, Nasopharynx-Karzinom
	myc	HPV-Typ 16, 18, 31, 33	Mensch	Mensch	Larynxpapillom, Zervixkarzinom, anogenitales Karzinom

Tab. 9: Onkogene aus DNA-Viren (nach Fleckenstein et al., 1994 und Riede et al., 1995) [135; 351]

8.1.2. Kontrollinstanzen der Zelle

Tumor-Suppressor-Gene bzw. proapoptotische Gene verhindern in ausdifferenzierten Zellen eine unkontrollierte Proliferation durch Unterdrückung einer Rückkehr zum Zellteilungszyklus. Sie werden daher auch als Anti-Onkogene bezeichnet. Beispiele sind Rb, wt1 und 2, DCC, APC und das Apoptosegen p53 mit seinen nachgeschalteten Effektoren wie bax, Bcl_{XL} oder NOXA.

8.2. Maligne Transformation

8.2.1. Ursachen und Verstärker

8.2.1.1. Initiation

Praktisch jeder Tumor beginnt mit einer Schädigung der DNA einer einzigen Zelle. Der Defekt kann durch physikalisch-chemische Noxen, Viren oder Mutation entstehen. Die Mehrzahl solcher Defekte bleibt Dank DNA-Reparaturmechanismen und nukleären Tumorsuppressor- und Apoptosegenen folgenlos. Falls der Defekt aber den Bereich eines Protoonkogens oder antiapoptotischen Gens betrifft und die

Reparatur- und Kontrollmechanismen nicht mehr greifen, kann man von 'Tumorinitiation' sprechen, denn nur Defekte von Protoonkogenen (oder aber Tumorsuppressorgenen) scheinen für eine maligne Transformation wirklich entscheidend zu sein [54; 352].

8.2.1.2. Tumorpromotion

Der als 'Tumorpromotion' bezeichnete Prozess ist eine protegierte Vermehrung geschädigter beziehungsweise veränderter Zellen (Klonbildung), der Genschaden wird durch Zellteilungen in den nachfolgenden Zellgenerationen etabliert. Es handelt sich hier in der Regel um einen langsam ablaufenden Vorgang, der sich über Monate oder Jahre erstrecken kann. Die Zellen sind nicht mehr fähig zur Differenzierung, teilen sich zunehmend ungehemmt und zeigen Veränderungen an Zelloberfläche und Cytoskelett, sowie eine verschobene Kern-Plasma-Relation. Der Terminus 'Tumorprogression' bezeichnet dann die dritte Stufe, den Erwerb der Malignität mit Infiltrationstendenz und Metastasierung [352].

8.2.2. Beispiele für Mechanismen maligner Transformation

8.2.2.1. Fehlregulation bei Phosphorylierungen

Mutationen in Rezeptorgenen, die beispielsweise eine langdauernde Aktivität einer Tyrosin-Kinase-Funktion zur Folge haben, können zur Transformation führen. Solche Mutationen werden, wie in Tabelle 4 dargestellt, tatsächlich bei etlichen bekannten Onkogenen gefunden. Durch die andauernde Phosphorylierungsaktivität werden untergeordnete Zielproteine in ständig verändertem Aktivitätsniveau - im Sinne einer Signalimpulsweiterleitung - gehalten. Ein Beispiel für Transformationsinduktion ist die Daueraktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolester wie Crotonöl.

8.2.2.2. Daueraktivierte GTPasen

Mutationen im Bereich des ras-Gens, die seine GTPase-Aktivität einschränken, können krebsauslösend wirken: onkogenes ras hat eine sehr niedrige GTPase-Aktivität und ist deshalb permanent aktiv. Dadurch werden andere nachgeschaltete Enzyme, hauptsächlich Serin- und Threonin-Kinasen, in aktivem Zustand gehalten, was ständige Phosphorylierungen und damit Aktivierung einer ganzen Reihe weiterer Proteine zur Folge hat. Ha-ras und Ki-ras sind Beispiele für solche veränderten, onkogen wirksamen ras-GTPasen.

8.2.2.3. Veränderte Anti-Onkogene

Auch der Ausfall der regulativen Funktion von Anti-Onkogenen und Apoptosegenen, beispielsweise durch Mutation beider Allele im betroffenen Genbereich, kann durch den Wegfall der Restriktion zu einer Initiation oder Überaktivität von vorher unterdrückten Onkogenen und somit eventuell zu einer malignen Transformation führen. Beispiele hierfür ist der Wegfall des APC- und progredient des DCC-, p53- und schließlich pNM23 Gens bei der Entstehung und Metastasierung des kolorektalen Carzinoms. DCC codiert dabei für das Zelladhäsionsmolekül N-CAM, p53 ist ein Genomwächter- und Apoptosegen und pNM23 ein Anti-Metastasierungsgen [171, 352].

- Eine besondere Rolle kommt dem Genomwächterprotein p53 zu. Es ist ein aus 1572 Aminosäuren bestehender Transkriptionsfaktor (MG 174 612 kd), dessen vier identischen DNA-bindenden Domänen sich gezielt an eine genau definierte Abfolge von Nukleotidbausteinen der Doppelhelix heften können. Vereinfacht gesagt hindert p53 mit seinen nachgeschalteten proapoptotischen Proteinen genetisch geschädigte Zellen daran, sich zu vermehren - eine Funktion, die in vielen Fällen die maligne Transformation verhindern hilft [171].

- Das Gen NF1 codiert für ein Protein, das große Ähnlichkeit mit dem c-ras-assoziierten GTPase-Aktivierungsprotein GAP aufweist und seine Funktion unterdrückt. Der Ausfall eines Allels kann zu Neurofibromen und Cafe-au lait-Flecken, der Verlust beider Allele zu neurogenen Sarkomen führen. Das wt1-Gen supprimiert die Aktivität benachbarter Gene wie IGF-2, deren Genprodukte den Eintritt in den Zellzyklus steuern können, WT2 reguliert Zellwachstum. Bei ihrem Ausfall entsteht der Wilms-Tumor.
- Das Genprodukt des Retinoblastogens verhindert über die Bindung an gewisse Transkriptionsfaktoren wie E2F die Expression von Genen, die während des Zellzyklus den Übergang von G₁ in S steuern und zügelt dadurch die Zellteilung. Der Genausfall hat die Entstehung des Retinoblastoms zur Folge [352].

8.3. Tumorwachstum und -versorgung

8.3.1. Endothel, (Neo-)Angiogenese und Atherosklerose

Gefäßwachstum und Angiogenese finden sowohl unter physiologischen Bedingungen (Rekapillarierungsprozesse, Gefäßeinsprossung in verheilendes Narbengewebe oder Kollateralenbildung) als auch bei pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Hier seien beispielhaft die Bildung von Hämangiomen sowie die Angiogenese im Rahmen von Tumorwachstum und -versorgung beschrieben.

- Bei Hämangiomen oder Blutschwämmen, benignen Angiomen in Haut und Schleimhaut, handelt es sich histologisch um echte kapilläre Gefäßneubildungen, wobei endotheliale Zellen embryonalen Charakters - meist im Bereich von Papillarkörper, Cutis oder Subcutis - herdförmig proliferieren.
- Weitaus folgenreicher für einen Organismus ist die Entstehung eines autonomen, entarteten Zellhaufens. Ein wachsender Tumor vermag sich aber nur bis etwa 150 µm Durchmesser durch Diffusionsprozesse zu versorgen, weiteres Wachstum setzt den Ausbau eines eigenen Kapillar-Versorgungsnetzes voraus [36, 142]. Die meisten Tumoren produzieren, um ihr Überleben zu gewährleisten, Faktoren, die die Bildung neuer Blutgefäße anregen, z.B. Angiogenin und VEGF (vascular endothelial growth factor), der komplizierte Prozess des Einwachsens von Endothelzellen in eine neue Region wird durch Wachstumsfaktoren der FGF-Familie [97, 352] gesteuert [142; 295]. Mit Ausschüttung dieser Faktoren regelt und überwacht der Tumor den Ausbau seiner Gefäßstraßen [388]. In den aktivierten Blutgefäßen kommt es zu folgenden Prozessen: Endothelzellen beginnen sich zu vermehren und wandern durch die gelockerte Wand nach außen, wo sie die Innenröhre zu einem neuen Seitengefäß bilden und ihrerseits Wachstumsfaktoren sezernieren [33; 209]. Durch Ausbildung bestimmter Adhäsionsmoleküle (Integrine), heften sich die Zellen an Proteine der sie umgebenden Matrix an, gleichzeitig sind diese Integrine mit intrazellulären Gerüstfilamenten wie Aktin verbunden. Der betreffende Gefäßabschnitt im Bereich maligner Tumoren kann aber morphologisch stark verändert erscheinen [138, 327]. Als veranschaulichendes Beispiel der sich abspielenden molekularpathologischen Prozesse sei die Pathogenese des Kaposi-Sarkoms, einer neoplastischen Wucherung von Endothelzellen und modifizierten glatten Muskelzellen erläutert. Das Kaposi-Sarkom, im angelsächsischen Sprachraum auch als 'angioreticuloendothelioma' oder 'endotheliosarcoma' bezeichnet, tritt klinisch sowohl in einer chronischen (klassischen) Form als auch in lymphadenopathischer, transplantationsassoziiertes und der HIV-assoziiertes Form auf [352]. Letztere wird von etwa 30% aller AIDS-Patienten entwickelt. Der Entstehung geht in der Regel eine Entzündungsreaktion voraus, die in vielen Fällen auf einer Virusinfektion (EBV oder CMV) beruht. In der Folge werden im Gewebe eine Reihe proinflammatorischer Zytokine wie TNF- und IL-1 produziert, welche u. a. die Expression des angiogenetischen Wachstumsfak-

tors bFGF (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor) durch die Endothelzellen in die Wege leiten, so dass diese sich selbst dauerhaft zur Proliferation zwingen. Damit die Endothelzellen wachsen können, brauchen sie nicht nur ein Proliferationssignal durch einen angiogenetischen Faktor aus der FGF-Familie [97; 352], sondern auch ein topologisches Orientierungssignal seitens der Extrazellulärmatrix wie Fibronectin, durch das die Endothelzellen ihre Spindelform annehmen [36; 242]. Das tat-Protein (Virus-Protein 35) der HIV-Viren imitiert offenbar diesen Fibronektineffekt und bringt auch die Endothelzellen dazu, bestimmte Integrine zu exprimieren, welche als spezifische Protein-Rezeptoren fungieren [352]. Dadurch wird die Wirkung dieser Proteine prolongiert. Zusätzlich bewirkt im Falle der HIV-Infektion das tat-Protein die Bildung einer Kollagenase, welche zur Basalmembranauflösung geeignet ist. So wird den sich teilenden Endothelzellen ermöglicht zu wandern und infiltrativ das umliegende Gewebe zu befallen. Eine weitere seltene (u. U. auch in diesem Zusammenhang auftretende Erkrankung) mit Angiogenese-Tendenz kann der hyalin-vaskuläre Typ des primären Hämangiolyphoms (*M. Castleman*) sein.

Bei atherosklerotischen Prozessen im Menschen scheint eine Neovaskularisation der Intima die Plaque-Progression durch eine bessere Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie einer Förderung der Ansammlung von Blutmonozyten in der Intima zu fördern [415]. Diese neuen Gefäße entstehen aus den *Vasa vasorum*, die normalerweise nur die *Adventitia* versorgen [471]. Als Stimuli für atherosklerotische Neovaskularisation sind u. a. hypoxische Zustände, aber auch bestimmte Zytokine und andere Mediatorsubstanzen (beispielsweise VEGF) zu sehen [392; 444]. Dies legen auch Ergebnisse aus Atherosklerose-Tiermodellen nahe, in denen VEGF eine Plaque-Progression unterhielt, während die Zugabe von Angiogenese-Inhibitoren die Neovaskularisation der Intima sowie Plaqueswachstum deutlich verringern konnten [64; 292].

Ein wichtiger Punkt sowohl bei der Angiogenese wie auch bei verschiedenen Stadien der Atherosklerose und bei malignen Prozessen ist eine reaktive morphologische Veränderung vieler Zellen im betroffenen Bereich, die u. a. mit Veränderung im Zytoskelett einhergeht. Diese wird von einer Vielzahl intrazellulärer Signaltransduktions-Kaskaden initiiert, gesteuert und reguliert. Eine morphologische Veränderung der die Intima-bildenden Endothelzellen ist somit (kontrollierte physiologische Reparatur- oder Gefäßwachstumsprozesse ausgenommen) immer als Ausdruck eines pathologischen Prozesses zu sehen.

Neue Ansätze in der Krebsbekämpfung zielen u. a. auch darauf hin ab, die Blutversorgung von Tumorgewebe zu unterbinden [57, 335]. Erste Versuche in dieser Richtung gingen von J. Folkman und seiner Arbeitsgruppe aus, die mit körpereigenen Angiogenese-Inhibitoren, beispielsweise Angiostatin, experimentierten [139]. Ein weiterer Ansatz nutzt zyklische Peptide aus 5 Aminosäuren mit zusätzlicher Methylgruppe, die das Integrin $\alpha\beta_3$ /VLA-4 blockieren, das im Normalfall an das Matrixprotein Fibronectin andockt, wo es einen kurzen, als RGD-Sequenz bezeichneten Abschnitt (benannt nach dem internationalen Einbuchstaben-Aminosäurecode für Arginin, Glycin und Asparaginsäure) zu erkennen vermag [222]. Auch das Phytoöstrogen und Isoflavon Genistein aus Soja, Rotklee oder Mönchspfeffer soll die Zellproliferation reduzieren, die Angiogenese hemmen indem es der Proliferation von Endothelzellen entgegenwirkt und die Mikrovaskularisation von Tumoren verringern. Keiner dieser potentiellen Therapieansätze hat bislang allerdings das Stadium der präklinischen Phase überschritten.

8.4. Pflanzliche Nahrungsstoffe mit Schutzfunktionen

8.4.1. Einleitung und ausgewählte Beispiele

Seit altersher gibt es in allen Medizinsystemen der Welt Medikamente beziehungsweise Stoffe pflanzlichen Ursprungs, denen heilende oder vorbeugende Wirkung bei schweren chronischen oder bösartigen Erkrankungen nachgesagt wird. Unter diesen Pflanzen finden sich, neben den klassischen Heikräutern, auch Nahrungspflanzen beispielsweise Kreuzblütler wie Kohl, Broccoli, Rettich und Senf, aber auch Sojabohnen, Zwiebelgewächse, rote Rüben, Sellerie, Petersilie, Gurkengewächse, Zitrusfrüchte und Nüsse. Ein Teil dieser positiven Wirkungen wird in neuerer Zeit Polyphenolen/Flavonoiden zugeschrieben [155], die in vielen der genannten Pflanzen enthalten sind [116]. Viele Arbeitsgruppen haben sich mit der Untersuchung und dem Nachweis protektiver Funktionen von Nahrungspflanzen bzw. deren isolierten Inhaltsstoffen beschäftigt [41; 116], die oft einfach auch als „Sekundäre Pflanzenstoffe“ bezeichnet werden. Die Wirksamkeit vieler der nachgenannten Substanzen und ihrer Funktionen sind in der Literatur diskutiert [41; 328] und partiell *in vitro*, im Tiermodell oder in epidemiologischen Ansätzen nachgewiesen [155, 190; 191; 240]:

- Inhaltsstoffe von Soja-Produkten (*Glycine max*) [240; 286; 329]
- Isoflavone wie Daidzein und Genistein aus Rotklee (*Trifolium pratense*) und Mönchspfeffer (*Cimicifuga agnus-castus*)
- Silibinin, Silydianin, Silychristin sowie weitere Flavonolderivate der Mariendistel (*Silybum marianum*)
- Lycopin aus Tomaten [3] und β -Glucane wie Lentinan aus Shiitake-Pilzen [288; 299]
- das Isoflavon und Stilbenderivat Resveratrol aus Weintrauben [32, 210]
- Brassicin aus Kohlgewächsen und Senf [443]
- aromatische Verbindungen, z.B. Curcumin und Garcinol [397, 313]
- pflanzliche Lectine [212], selenhaltige pflanzliche Nahrungsmittel [7; 206], und Zitrusfrüchte [287]
- Antioxidantien pflanzlichen Ursprungs (Ascorbinsäure, α -Tocopherol, Carotine, Catechine) [287; 329; 373]. Chemische Modifikation 'klassischer' bzw. natürlicher Antioxidantien (beispielsweise das Anfügen hydrophober Gruppen) soll zukünftig Verbindungen mit weiter verbesserten Wirkeigenschaften (z.B. erhöhter Zellmembrangängigkeit) ergeben [124]
- Myrtillin und andere Extrakte aus *Vaccinium*-Spezies, z. B. Blaubeer- (*V. myrtillus*) und Preiselbeerextrakt [40], sowie Tannine, Catechine und Phenole (Proanthocyanine) [180] wie (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) [9] und Theasinensin A [58; 312] aus Grün- und Schwarztee (*Thea sinensis* und *indica*)
- aus der Ethnobotanik: *Pau d'arco* [101], und das Naphtochinon Lapachol [102] aus *Tabebuia impetiginosa* ('Lapacho tree') mit mutmaßlich canceroprotektiven sowie antipsoriatischen Eigenschaften

8.4.2. Vorkommen und Wirkmechanismen

Die genannten Stoffe kommen in alltäglichen Nahrungsprodukten vor (beispielsweise enthalten Tomatenprodukte Lycopin [3; 161], Soja enthält Genistein, Daidzein und Trypsin-Inhibitoren [240; 286], Lentinan ist in einigen höheren Pilzen (*Lentinus edodes*, *Cortinellus shiitake*, *Agaricus blazei*) enthalten [288; 299]. Kohlgemüse ist reich an Brassicin und antioxidativen Thioverbindungen [443]. Catechine sind in Obst und Kakaopulver bzw. Bitterschokolade [338; 454], das polyphenolische Stilbenderivat Resveratrol in Wein und Obstschalen [343; 382], Ascorbinsäure in vielen Gemüse- und Obstpflanzen [287; 342] enthalten) oder sind Bestandteile traditioneller Heildrogen oder -tees [101, 102; 317].

Vielen der oben genannten Stoffe oder Drogenmischungen wird in der Literatur zumindest eine antioxidative oder entzündungshemmende Wirkung bescheinigt, d.h. diese Stoffe wirken primär als Radikalfänger und senken so die Schädigungsrate der DNA, andere wie beispielsweise Mistel-Lectine [212] sollen neben einem immunstimulierenden Effekt beispielsweise auch durch induzierte DNA-Fragmentation (nachweisbar durch 'DNA-Laddering'-Apoptoseassays) cytotoxisch auf Tumorzellen wirken und die Apoptose anstoßen [212; 223]. Einige Stoffe, darunter Resveratrol hemmen außerdem die Aktivität von Enzymen wie Hydroperoxidase und Cyclooxygenase, die ihrerseits viele Stoffe erst in proinflammatorische oder potentiell cancerogene Metabolite umwandeln [210, 212, 324; 329].

Einige Stoffe die mutmaßlich protektive Eigenschaften - besonders im Hinblick auf Atherosklerose und Tumorentstehung - besitzen (z.B. Isoflavone und Lignine, darunter Genistein und Resveratrol), werden außerdem zu den Phytoöstrogenen gerechnet und ein Teil ihrer Effekte mit der schwachen östrogenähnlichen Wirkung begründet. Hier wird in der Literatur allerdings unterschiedlich und zum Teil kontrovers argumentiert [2, 44, 258; 328]. Die Bedeutung von Östrogen als atherosklerotischem Schutzfaktor im weiblichen Organismus ist - zumindest für die Zeit zwischen Menarche und Menopause - weitgehend anerkannt [58; 217]. Eine prophylaktische Substitution (Hormon Replacement Therapy, HRT) mit künstlich zugeführten Östrogenpräparaten ist im Herbst des Jahres 2003 wegen des Verdachtes seltener aber schwerer Nebenwirkungen einer neuerlichen strengen Nutzen-Risiko-Abwägung (Stufenplanverfahren des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte) der deutschen Bundesoberbehörde, sowie einer Urgent Safety Restriction der European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA) mit neuerlicher Indikationseinschränkung unterworfen worden.

8.4.3. Untersuchungen am Knoblauch (*Allium sativum*)

Eine besondere Gruppe, die in den letzten Jahren ähnlich großes Interesse wie Rotwein-Inhaltsstoffe weckten, stellen die Inhaltsstoffe der Zwiebelgewächse (Fam. *Alliaceae*) [206; 211], besonders die des Knoblauchs (*Allium sativum* L.) dar. Als wichtigste Inhaltsstoffe seien hier Ajoen, Allicin und Ajeol genannt [13, 100; 101, 211; 325]. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen gewisse anti-inflammatorische [102] und antileukämische Eigenschaften (Steigerung der Apoptoserate *in vitro*), beispielsweise über eine Förderung der Bildung von Sauerstoffradikalen, einer Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NFκB [100, 103] und eine Hemmung der MAPK ERK [13]. Im Vergleich dazu scheint das Rotwein-Polyphenol Resveratrol bestimmte Zellpopulationen wie glatte Gefäßmuskelzellen in einen reversiblen Arrest in der frühen S-Phase des Zellzyklus zu zwingen oder auch die Wirkung von modifiziertem und daher in seiner Funktion beeinträchtigtem p53 zu verstärken - ohne jedoch die untersuchte Apoptoserate betroffener Zellgruppen zu steigern [171]. Desweiteren scheint Knoblauch in gewissem Umfang die Zytokinexpression zu modulieren [218]. Eine postulierte Inhibition von NFκB und nachfolgend der Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selectin auf Endothelzellen schien sich dagegen nicht zu bestätigen [104]. Die 'Inducible NO Synthase' (iNOS) hat Anteil an atherosklerotischen Läsionen und an der Bildung der Zellnoxe Peroxynitrit. Knoblauch-Inhaltsstoffe wurden in ihrer Wirkung auch im Hinblick auf Atherosklerose-Entstehung untersucht: es konnten *in vitro* deutlich reduzierte iNOS-Protein-Level sowie entsprechend reduzierte mRNA-Level in LPS-stimulierten Makrophagen nach Inkubation mit Allicin und Ajoen gezeigt werden [101].

9. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In westlichen Industrienationen stehen kardiovaskuläre Erkrankungen als Todesursache an erster Stelle, Weingenuß soll einen gewissen Schutz vermitteln können [403]. Vor allem epidemiologische Studien weisen auf eine Senkung der Mortalität an koronarer Herzerkrankung durch mäßigen Alkoholkonsum hin, wobei einige Autoren dem gerade dem Rotwein eine zusätzliche protektive Wirkung bescheinigen [90; 170; 344]. In dieser Arbeit soll der Versuch gemacht werden, einen weiteren, bisher wenig beachteten Ansatz, nämlich die Wirkung von Rotwein auf die gefäßwandauskleidenden Endothelzellen in einem *in vitro* Versuchsaufbau zu hinterfragen. Diese Zellpopulation ist durch endokrine Regulation, Gestaltänderung, Lipidaufnahme und Einfluß auf die Monozyteneinwanderung (ebenso wie die besser untersuchten Thrombozyten und Lipideffekte) primär an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt. Durch eine orientierende stoffchemische Untersuchung sollten zusätzlich Hinweise auf beteiligte aktive Rotweininhaltsstoffe gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Techniken eingesetzt werden, die einen gewissen Einblick in sich im Zellinneren abspielenden Prozesse der Endothelzellen und mögliche biochemische Reaktionen auf Rotweinkontakt bieten:

- (1) Mikromorphologische Untersuchungen am Cytoskelett, um festzustellen, ob Rotweinkontakt bei den Endothelzellen nachweisbare Reaktionen oder morphologische Veränderungen auslöst.
- (2) Versuch des Nachweises einer möglichen Beeinflussung von kultivierten humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) durch Kontakt mit verdünnter Rotweinslösung in Western-Blot-Assays, bei denen speziell nach Proteinen mit Phosphorylierungen am Aminosäurerest Tyrosin gefahndet wird. Dies ist ein von Tyrosin-Kinasen vermittelter Stoffwechselschritt [241], der bei der intrazellulären Signalübertragung häufig dazu benützt wird, den Aktivitätszustand von Proteinen der Informationskette zu verändern. Bei Thrombozyten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Soja-Isoflavonoid Genistein, das als Tyrosin-Kinase-Inhibitor wirkt, sowohl den Gestaltwandel als auch die Tyrosinphosphorylierung verschiedener thrombozytärer Proteine hemmt [297]. Daher erschien die Frage interessant, ob Veränderungen in der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen auch bei den bislang nicht untersuchten Endothelzellen auftreten, und ob außerdem die im Rotwein enthaltenen mutmaßlich wirksamen sekundären Pflanzenstoffe/Flavonoide möglicherweise über ähnliche Mechanismen wie Genistein wirken.
- (3) Untersuchung eventuell durch den Rotweinkontakt induzierter mRNA-Expression mittels Northern-Blot-Assay. Hierzu wählten wir das Chemokin 'Monocyte Attractant Protein-1' (MCP-1) aus, das zum einen als early response-Gen früh im Rahmen einer entzündlichen Zellreaktion aktiviert wird und zum anderen als ein Vermittler der Monozytentransmigration bei Entzündungsprozessen auch mit der Progression der Atheroskleroseentstehung in Zusammenhang steht [298].
- (4) Vierter Ansatzpunkt der Arbeit sollte die orientierende Untersuchung und, wenn möglich, grobe Einordnung von eventuell als Effektoren in Frage kommenden Rotweininhaltsstoffen mit Hilfe von Fraktionierungen und einfachen chromatographischen Verfahren.

B. MATERIAL UND METHODEN

Vorgehensweise und Methodik der vorliegenden Arbeit:

Konfluente Endothelzellen der Passagen p3 bis p5 wurden über definierte Zeitabschnitte (Sekunden- bis Stundenbereich) mit pufferverdünnten 0,5‰, 1‰ und 2,5‰igen Lösungen von Wein, Ethylalkohol bzw. anderen Kontrollsubstanzen (Zellkulturmedium, PBS-Puffer, DMSO, Weißwein, Traubensaft, grüner Tee und Bier) inkubiert. Der verwendete Rotwein (12 Vol%) sowie alle anderen Versuchs- und Kontrollsubstanzen kamen somit nur stark verdünnt mit den Zellen in Kontakt. Die verwendeten Weinverdünnungen entsprechen bei 0,5‰, 1‰ und 2,5‰iger Lösung 60, 120 und 240 µg Alkohol in 1 ml Versuchslösung - was wiederum einem Blutalkoholgehalt von rund 0,06, 0,12 und 0,24‰ entspräche. Bei reinem Ethanol (98%) ergäben sich Blutalkoholwerte von 0,49 sowie 0,98 und 1,96‰.

Nach zuerst probatorischen Versuchen mit unterschiedlichen Zelloberflächen- und Zytoskelettfärbetechniken konnte mit Hilfe einer Aktinfärbetechnik zunächst eine mikroskopisch sichtbare reaktive Veränderungen am Cytoskelett ("Stressfasern") beobachtet werden. In einem weiteren Schritt wurde mittels Western-Blot-Analyse auf spezifisch nach Rotweinkontakt auftretende Veränderungen im Proteinp muster der Endothelzellen hin untersucht. Zur Detektion wurden monoklonale Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (py-Antikörper) verwendet. Die Tyrosinphosphorylierung ist bei intrazellulärer Informationsübertragung ein häufig beschrittener Weg, um Proteinaktivitäten zu verändern. Nach Auffinden einer rotweinabhängig auftretenden Proteinbande wurde versucht, deren Funktion mit unterschiedlichen Hemmstoffen von Signaltransduktionswegen einzukreisen und deren Identität gegebenenfalls zu bestimmen. Desweiteren wurde mit Hilfe RNA-analytischer Methoden (Northern-Blot) nach einer eventuell auftretenden Aktivitätsinduktion von Genen der early-response Ebene (hier beispielhaft am Genort des Chemokins MCP-1) gesucht und außerdem versucht, beteiligte Rotweinhaltstoffe mit verschiedenen Fraktionierungstechniken sowie einfachen chromatographischen Verfahren grob orientierend einzuordnen.

1. Material

1.1. Verwendete Chemikalien und Pharmaka

a) von der Firma Sigma

- Acrylamid
- Ammoniumpersulfat
- Aprotinin
- BSA
- C3-Transfersase
- EDTA
- EGTA
- Genistein
- Gentamicin
- HEPES
- 2-Mercaptoethanol
- Myricetin
- Na₃VO₄
- PBS
- Quercetin

Resveratrol
SDS
TEMED

b) von der Firma Merck:

n-Butanol
Diethylether
Diphenylboryloxyethylamin
DMSO
Ethanol
Fast blue B
HCl
H₂SO₄
Isopropylalkohol
KOH
Methanol
Ninhydrin
PEG-400
rauchende H₃PO₄
Vanillin

c) von der Firma Bio-Rad:

APS
Blotting Grade low fat Dry Milk
SDS-Page-Proteinstandard 'high range'
SDS-Page-Proteinstandard 'medium range'
SDS-Page-Proteinstandard 'Rainbow-Marker'
Tween[®] 20

d) von der Firma Biomol.

Glycin
Pefabloc[®] SC
Tris/HCl

e) von der Firma Amersham:

sekundärer AK, Klon HRP Anti-Mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody from sheep

f) von der Firma Calbiochem.

Herbimicin A
PD 98059
PP1
Tyrphostin A23
Wortmannin

g) von der Firma Santa Cruz

primärer AK, Klon py20B, Isotyp IgG_{2b} von der Maus
primärer AK, Klon p99, Isotyp IgG_{2b} von der Maus

weitere Substanzen verschiedener Hersteller:

Bromphenolblau
Kollagen G
Luminol Reagenz, Super Signal Substrat[™],
LKB Bromma
Collagenresgenz Horm
Pierce

primärer Ak, Klon 4G10, von der Maus
Y-27632

Upstate Biotechnology
Yoshitomi Pharmaceut. Ind.

1.2. Verwendete Materialien und Geräte verschiedener Hersteller

Blot-Apparatur LKB 2117 Multiphor, semidry	Bio-Rad
Filterpapier	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop	
Gelelektrophorese-Kammern	Bio-Rad
Nitrozelluloseacetat-Folie	
'Hybond [®] TMC super'	Bio-Rad
programmierbare Spannungsgeber	Bio-Rad
Filme und Röntgenfilme	Kodak
Nucleosil [®] gp 5C18	Macherey-Nugil
Laser-Scanner Ultrosan XL	Pharmacia
Sephadex-LH20	Pharmacia

Bei den benutzten Pipetten und Spitzen, Zentrifugen, Neubauer-Zählkammern, Eppendorfgefäße, Zellkulturflaschen, 6-Wells, Schaber, Blue- und Red Caps etc. handelt es sich um handelsübliche Laborbedarfsprodukte diverser bekannter Hersteller.

2. Präparation und Kultur von HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)

2.1. Allgemeines

Um lebende Endothelzellen zu Versuchszwecken zu gewinnen, verwendet man möglichst geburtsfrische Nabelschnurpräparate. Diese sind in der Regel einfacher zu beschaffen als gefäßchirurgische Resektionsspräparate und ersparen für viele Fragestellungen das Manipulieren am lebenden Tier.

2.1.1. Histologie der menschlichen Blutgefäße

Die Blutgefäßwand im menschlichen Körper besteht von innen nach außen aus drei Schichten: der *Tunica intima* ("Intima"), der *Tunica media* ("Media") und *Tunica externa* ("Adventitia"). Die innerste Schicht dichtet das Gefäßlumen durch einen Monolayer von spindeligen bis polygonalen, abgeflachten und 50-150 µm langen Endothelzellen lückenlos ab. Diese Zellen sind ebenso wie das subendotheliale Bindegewebe, in Richtung des Gefäßverlaufs ausgerichtet. Die *Tunica intima* steuert den Stoff-, Gas- und Flüssigkeitsaustausch durch die Gefäßwand. Die *Tunica media*, bestehend aus zirkulär verlaufenden Bindegewebsstrukturen und glatten Muskelzellen, reguliert die Blutbewegung und über die Adventitia mit längsgerichtetem Bindegewebe und teilweise glatter Muskulatur sind die Gefäße in ihre Umgebung eingebettet. Entsprechend den abweichenden Anforderungen der verschiedenen Kreislaufabschnitte ist der Aufbau der Wandschichten bei Venen, Arterien und Kapillaren jeweils leicht modifiziert.

2.1.2. Situs der Nabelschnurgefäße

Die Nabelgefäße entstehen nach Einsetzen der embryonalen Herzpulsation aus den sogenannten Blutinseln des Chorions. Die *Vena umbilicalis* entspringt in den Chorionzotten und führt dem Embryo, im Gegensatz zu den paarig angelegten und ebenfalls in der Nabelschnur verlaufenden *Arteriae umbilicales*, sauer- und nährstoffreiches Blut zu. Nach der Geburt obliteriert der embryoseitige Teil der Nabelvene und wird zum *Ligamentum teres hepatis* [195].

2.2. Präparation der Nabelschnur und Zellgewinnung

Die folgenden Arbeiten werden am sterilen Airflow-Zelllaborarbeitsplatz durchgeführt.

Die möglichst geburtsfrische oder kurzfristig bei ca. 4°C gelagerte Nabelschnur wird mit einer Pinzette gefasst, mit steriler Schere auf einer Seite aufgeschnitten und eine Knopfsonde in die *Vena umbilicalis* (= die nichtpaarige Struktur) eingeführt. Nach hängender Fixierung wird die Nabelschnur zuerst von anhaftendem Material und Blut gesäubert und dann außen mit vorgewärmtem, Gentamicin-versetztem PBS (1 ml Gentamicin auf 250 ml PBS), innen mit PBS und Chymotrypsin gespült. Anschließend wird die Nabelschnur am unteren Ende abgeklemmt, mit Chymotrypsinlösung (50µg Chymotrypsin auf 50 ml PBS) mit einer 20 ml-Spritze über die Sonde wurstartig aufgebläht und verschlossen. Nach 25-minütiger Inkubation bei 37°C wird der endothelzellhaltige Inhalt der Nabelschnurvene in einen roten 45 ml-Cup ausmassiert und bei 25°C und 800 U/min für 10 Minuten zentrifugiert.

2.3. Primärkultur

Das sich absetzende Pellet wird mit 5 ml FCS-haltigem Kulturmedium (ein Röhrchen Supplement ECGSVH-2 plus 50 ml fetales Kälberserum FCS auf eine Flasche "Endothelial Cell Growth Medium") gelöst und die Zellsuspension in einen kollagenisierten blauen Primaria-Kulturkolben überführt. Wenn nach 90 Minuten im Inkubator bei 37°C die meisten gesunden Zellen am kollagenisierten Boden adhären, wird die Überführungsflüssigkeit abgesaugt und durch 5 ml frisches auf 37°C vorgewärmtes FCS-Medium ersetzt. Anschließende Lagerung weiterhin im Inkubator.

2.4. Passage/Aussaat und Zellkultur

Nach einigen Tagen sollten die Zellen einen dichten, konfluenten Monolayer gebildet haben. Falls bei mikroskopischer Kontrolle keine mikrobiellen Verunreinigungen aufgetreten sind, kann auf kollagenisierte Sekundärkolben aufgeteilt werden ("Passage" oder "Splitten"). Dazu wird das alte Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen, um im serumhaltigen Medium enthaltene Proteasen zu entfernen. Nach Zugabe von 3 - 4 ml Trypsin sollten sich Zellkontakte lösen und die Zellen sich zu Kugelform zusammenziehen. Wenn sich die Zellen weitgehend abgelöst haben, werden zur Trypsin-Inaktivierung 11 ml vorgewärmtes FCS-Medium zugegeben. Nach Abschätzen der Zellzahl/ml wird die Suspension in zwei Cups aufgeteilt und bei 25°C und 800 Umdrehungen/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in vorgewärmtem FCS-Medium resuspendiert und, abhängig von der Zelldichte, in 2 bis 10 kollagenisierte Zellkulturkolben ausgesät. Nach erneuter Adhäsion der Zellen am Kolbenboden erfolgt ein Mediumwechsel. Die weitere Kultur erfolgt im Inkubator bei 37°C, 98% Luftfeuchte und 0,2% CO₂ bei 3-tägigem Mediumwechsel. Eine weitere Aussaat dieser Zellen zu Versuchszwecken kann dann auf kollagenisierten 6-Well-Platten, Petrischalen oder Deckgläschen erfolgen.

2.5. Kollagenisieren synthetischer Oberflächen

Eine Kollagenschicht auf der synthetischen Kunststoff- oder Glasoberfläche von Zellkulturkolben, Cover-Slips und 6-Well-Platten erleichtert den Endothelzellen ein Anwachsen und Ausbreitung (vgl. Kapitel 1.1, subendotheliale Bindegewebsschicht).

Herstellung der Kollagenstammlösung:

5 ml "Kollagen G" und 1 ml Gentamicin für 20 Minuten in 200 ml PBS einrühren und anschließend sterilfiltrieren.

Deckgläschen (Cover-Slips) 1 Stunde in Ether-Ethanol schwenken und autoklavieren. Auf die abgeflamnten Cover-Slips werden jeweils 200 µl, auf den Boden eines gelben 100 ml Kulturkolbens 4 ml der Kollagenlösung pipettiert und nach zwei Stunden abgesaugt. Lagerung erfolgt steril verpackt, kühl und dunkel.

3. Zellbehandlung zur Durchführung der Versuche/Versuchsansätze

3.1. Für Proteinuntersuchungen und Inhaltsstoffsuche

3.1.1. Zellinkubation mit Versuchsstoffen

Bei den in 6-Well-Schalen zur Konfluenz gezogenen Endothelzellen der Passagen p3 bis p5 wird das Kulturmedium abgesaugt und jeweils 1 ml vorgewärmte Versuchslösung zugegeben. Diese wird, je nach Versuchsanordnung zu 0,5‰, 1‰ oder 2,5 ‰ hergestellt, d.h. 0,5, 1 oder 2,5 µl Rotwein oder andere Versuchsfüssigkeit auf 1 ml Pufferlösung, 10%ig pufferverdünntes Plasma oder Vollplasma.

3.1.2. Zellinkubation unter Zugabe von Hemmstoffen der Signaltransduktion

Bei den Hemmstoff-Versuchen werden die Zellen zuerst mit einer Mediumverdünnung des jeweiligen Hemmstoffes im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des hemmstoffhaltigen Mediums wird wie unter 3.1.1. verfahren.

3.1.2.1. Genistein

Genistein wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 200 µM gebracht und die Zellen für 60 Minuten inkubiert.

3.1.2.2. PP1

PP1 wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 20 µM gebracht und die Zellen für 60 Minuten inkubiert.

3.1.2.3. Herbimicin A

Herbimicin A wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 2 mM gebracht, sterilfiltriert und die Zellen für 24 Stunden inkubiert.

3.1.2.4. Tyrphostin A23

Tyrphostin A23 wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 20 µM gebracht und die Zellen für 60 Minuten inkubiert.

3.1.2.5. C3-Transferase

C3-Transferase wird auf eine finale Konzentration von 5 µg/ml gebracht, sterilfiltriert und die Zellen für 24 Stunden inkubiert.

3.1.2.6. Wortmannin

Wortmannin wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 5 µM gebracht und die Zellen für 60 Minuten inkubiert.

3.1.2.7. PD 98059

PD 98059 wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 20 µM gebracht und die Zellen für 60 Minuten inkubiert.

3.1.2.8. Y- 27632

Y-27632 wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 10 µM gebracht und die Zellen für 90 Minuten inkubiert.

3.1.2.9. EGTA

EGTA wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 1mM gebracht und die Zellen für 45 Minuten inkubiert.

3.1.2.10. BAPTA/AM

BAPTA/AM wird in 1 ml Kulturmedium auf eine finale Konzentration von 1 µM gebracht und die Zellen für 45 Minuten inkubiert.

3.2. Für RNA-Analytik

Die Endothelzellen werden wie zuvor beschrieben in 10 cm Kulturschalen bis zur Konfluenz angezogen.

3.2.1. Vorbehandlung

Die Zellen werden zuerst mit 8 ml Inkubationsmedium für 2 Stunden depriviert, und anschließend für 30 Minuten mit 10 U/ml TNF (Tumor-Nekrosefaktor) bzw. 10 nM PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) inkubiert. Diese Stoffe dienen als Zellstressoren bzw. Stimulantien zur Induktion von Zellreaktionen.

3.2.1. Inkubation

Im Anschluss an den Vorinkubationsschritt erfolgt nach Absaugen des TNF/PMA-haltigen Mediums die Inkubation mit 8 ml Rotwein- oder Ethanollösung (1‰ in PBS) für 30 Minuten. Als Kontrolle werden Zellen mit den gleichen Lösungen für 15, 30 oder 45 Minuten inkubiert - allerdings ohne den vorhergehenden Schritt mit TNF oder PMA.

3.3. Zur Untersuchung von Aktinstrukturen des Cytoskeletts

Für Untersuchungen der Mikrostruktur lässt man die Endothelzellen auf kollagenisierten Deckgläschen zum konfluenten Monolayer anwachsen. Nach Absaugen des Kulturmediums wird jeweils 1ml der vorgewärmten Versuchslösung zugegeben. Diese wird zu 1 oder 2,5‰ hergestellt.

3.4. Fixierung, Gewinnung der Samples zur Potein-Analytik

Nach Inkubation wird die Versuchslösung gründlichst abgesaugt und 200 µl erhitzten Lysepuffers aufpipettiert. Die lysierte Zellmasse wird zusammengeschaßt, in Eppendorfgefäße überführt, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend entweder sofort weiterbearbeitet oder bei -20°C gelagert.

4. Die Aktin-Fluoreszenz-Färbung mit Phalloidin-Rhodamin

4.1. Beschreibung des Verfahrens

Phalloidin ist ein thermostabiles zyklisches Heptapeptid aus der Gruppe der Knollenblätterpilzgifte. Es beschleunigt *in vivo* die Polymerisation von Aktin, stabilisiert polymeres F-Aktin und kann zur Schädigung der Zellmembran führen. Durch diese Aktinspezifität des Phalloidins eignet sich das Verfahren nach Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Rhodamin zur mikroskopischen Darstellung von zellmembranständigen oder intrazellulären Aktinfibern.

4.2. Vorbereitung der Zellen und Durchführung

4.2.1. Fixieren der Zellen

- Die Endothelzellen werden wie beschrieben auf kollagenisierten Deckgläschen bis zur Konfluenz angezogen.
- Deckgläschen werden in PBS gewaschen und 10 Minuten in 3,7%iger Formalinlösung fixiert (dazu 1 Teil Formalin 37% mit 9 Teilen PHEM-Puffer verdünnen).
- drei mal kurz in PBS waschen.
- 5 Minuten bei -20°C in Aceton fixieren und an der Luft trocknen lassen.

4.2.2. Färbung mit Phalloidin-Rhodamin

- 5 µl Phalloidin-Rhodamin in 195 µl PBS lösen. Je 25 µl dieser Lösung auf vorbereitete Parafilm-Stückchen pipettieren.
- Die trockenen, acetonfixierten Deckgläschen mit der Zellschichtseite auf die Tropfen legen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 4 mal kurz in PBS waschen und abtupfen.
- nach Zugabe von 5 µl Mount Medium Deckglas auflegen.

- Abschließend Deckglasränder mit Nagellack versiegeln.

Auswertung und photographische Dokumentation erfolgt am Phasenkontrast-Mikroskop (Vergrößerung x 1000).

5. Der Western-Blot

5.1. Kurzbeschreibung des Verfahrens

Der Western-Blot ist eine Transfer- und Detektionstechnik aus der Proteinanalyse. In einem ersten, elektrophoretischen Schritt werden die Moleküle nach Wanderungsgeschwindigkeit (elektrische Ladung) und Größe/Molekulargewicht (Porengröße/Dichte der Laufmatrix) aufgetrennt. Das in der vorliegenden Arbeit verwandte Trennmedium Polyacrylamid wurde erstmals im Jahr 1959 von Raymond und Weintraub als Elektrophoresematrix eingesetzt. Es handelt sich um ein Radikalenpolymerisat aus Acrylmonomeren und einem Vernetzer (meist N, N'-Methylenisocrylamid, einem Dimer von Acrylamid). Die Monomere sind ein Haut- und Nervengift. In einem zweiten Schritt erfolgt die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf ein haltbareres und leichter weiterzubearbeitendes Medium (z. B. Nitrozelluloseacetat-Folie) durch Kapillarkräfte oder im elektrischen Feld. Dadurch kommt es auch zu einem Aufkonzentrierungsschritt der Proteinmoleküle aus dem Gel auf die Membranoberfläche. Nach diesem eigentlichen Blotting-Schritt erfolgt eine Markierung der zu untersuchenden Moleküle indirekt mit spezifischen Antikörpern oder direkt durch Anfärbung (z. B. Coomassie-Blau). In einem letzten, beispielsweise Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Schritt mit modifiziertem Sekundäntikörper, kann ein Sichtbarmachen markierter Proteine durch Filmschwärzung proportional der fixierten Molekülmenge auf der Nitrozelluloseacetat-Membran erfolgen.

5.2. Probenvorbereitung

5.2.1. Herstellung des Sample Buffers und des Lysepuffers

"2x Sample Buffer":

40 ml *aqua dest.*

10 ml 0,5 M Tris-HCl

8 ml Glycerol

48 ml 10% SDS

4 ml 9-Mercaptoethanol

2 ml 0,05% Bromphenolblau (w/v)

416,8 mg EDTA

Puffer nach Laemmli [238]

750 µl 2x Sample Buffer (6% SDS, 10mM EDTA)

750 µl *aqua dest.*

1,5 µl Leustatin

1,5 µl Pepstatin

1,5 µl Aprotinin

6 µl 2mM Na₃VO₄

eine Pipettenspitze Pefabloc[®] (Mix aus verschiedenen Enzyblocker und Stabilisatoren) zugeben, gut vermischt auf 95°C erhitzen und sofort verwenden.

5.2.2. Probenvorbereitung

- Nach Ende der vordefinierten Versuchszeit wird das Inkubationsmedium in den 6-Well-Platten gründlich abgesaugt und zwei mal mit PBS nachgewaschen.
- 200 µl des erhitzten Lysepuffers auf die Proben geben, abschaben und in Eppendorf-Gefäße überführen.

- Für 5 Minuten auf 95°C erhitzen, bis zur weiteren Verwendung bei -40° C lagern.

5.3. Detektionsantikörper

Zum Nachweis von tyrosinphosphorylierten Proteinen in Western-Blots wurden in unserem Labor entweder die mausgenerierten monoklonalen Antikörper py-20B (Santa Cruz) und 4G10 (Upstate Biotechnology) kombiniert oder der Klon p 99 (Santa Cruz) alleine, jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

Herstellung der Antikörper-Lösung:

jeweils 400 µl der Antikörperstammlösung in 400 ml aqua dest. einpipettieren und vorsichtig rühren, zur Konservierung Zugabe von 5 % Na-Azid. Lagerung dunkel bei 4°C.

Als Sekundärantikörper wurde "Anti-Mouse-IgG with horseraddish-peroxidase" vom Schaf (Amersham) in einer Verdünnung von 1:15000 bzw. 1:20000 (2,6 bzw. 2,0 µl Antikörperlösung in 40 ml aqua dest.) eingesetzt. Die Ligierung des AK-Moleküls mit Meerrettich-Peroxidase ermöglicht im weiteren eine Chemolumineszenz-Detektion.

5.4. Elektrophorese (PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von nativen Serum- oder Zellproteinen werden überiegend SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Polyacrylamid-Gele (PA) sind chemisch wie mechanisch stabil, anfärbbar und eignen sich zur Immunfixation, Anfärbung und nach Glycerinzugabe auch zum Trocknen. Die Porengröße des Gels wird durch die Acrylamidkonzentration und den chemischen Vernetzungsgrad C ('crosslinking') bestimmt und ist gut reproduzierbar. Durch die Zugabe von SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird die Eigenladung der Proteinmoleküle abgedeckt, ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist somit primär vom Molekulgewicht abhängig. Die Elektrophorese wird in einer vertikalen Kammer mit dem 1970 von Laemmli beschriebenen [238] Puffersystem durchgeführt.

5.4.1 Herstellung eines SDS-PA-Gels für vertikale Laufbedingungen

- Glasplatten mit aqua dest., Isopropanol und Aceton reinigen
- Gekassette mit Abstandhalter zusammenbauen, mit Parafilm abdichten und in der Gießbank befestigen (Kontrolle mit Wasserwaage).

5.4.1.1. Herstellung des 10%igen Trenngels

12,5 ml Polyacrylamid-Stammlösung 40%ig

12,5 ml Tris-Puffer (1,5 m; pH 8,8)

500 µl 10%ige SDS-Lösung

mit aqua dest. ad 50 ml auffüllen

- Rühren und für 10 Minuten entlüften
- 30 µl TEMED und 300 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS) zugeben
- bis zur Markierung in die Gekassette eingießen, Luftblasen entfernen
- mit Buthanol überschichten

5.4.1.2. Herstellung des 4%igen Sammelgels

12,8 ml aqua dest.

5 ml Tris-Puffer (0,5 m)

2 ml Polyacrylamid-Stammlösung 40%ig

200 µl 10%ige SDS-Lösung

rühren und für 10 Minuten entlüften

30 µl TEMED und 120 µl APS 10% zugeben

- nach Absaugen des Butanols auf das vollständig durchpolymerisierte Trenngel gießen und sofort den Kamm für die Samplekammern einstecken.
- Vollständige Polymerisation abwarten, mit feuchten Tüchern und Frischhaltefolie verpacken und bis zur Verwendung dunkel bei 4°C aufbewahren.

Die Polymerisatmengen reichen für ein Gel der Größe 20 x 16 x 0,15 cm.

5.4.2. Herstellung der Lauf- und Blottingpuffer

Running Buffer (Gelelektrophoresekammer):

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 0,1 % SDS

Blottingpuffer:

a) Anoden-Puffer 1 (pH 10,4):

- 300 mM Tris
- 20 % Methanol

b) Anoden-Puffer 2 (pH 10,4):

- 25 mM Tris
- 20 % Methanol

c) Kathoden-Puffer :

- 40 mM E-Aminocapronsäure
- 20 % Methanol

5.4.3. Aufbau der Elektrophoresekammer und Sample-Beschickung

- 400 ml Running Buffer mit 2000 ml *aqua dest.* verdünnen.
- Kamm aus dem vorgekühlten Gel entfernen, Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen und Puffer zugießen.
- Kühlvorrichtung anschließen.
- 9 µl Standardmarker in eine Sampletasche einpipettieren.
- Samples 45 Sekunden auf 95°C erhitzen, 30 Sekunden gründlich 'vortexen' und jeweils 50 µl pro Tasche einpipettieren.

5.4.4 Gellauf

- Der Gellauf erfolgt bei Raumtemperatur unter Wasserkühlung.
- Das Gel mit 9 mA fahren bis die Farbstoff-Protein-Front die Grenze Sammelgel-Trenngel erreicht hat, dann auf 30 mA hochschalten (Laufzeit etwa 14 Stunden).
- Gegen Ende der Laufzeit kann zur Erreichung schärferer Banden noch für etwa 1 ½ Stunden bei 40 mA fokussiert werden.
- Die Auftrennung wird beendet, wenn die Farbstofffront den Unterrand des Trenngels erreicht hat.

5.5 Der Blot (Semidry-Verfahren)

5.5.1. Vorbereitung des Gels

- Nach Beendigung des Laufs Gelkassette aus der Elektrophoresekammer entnehmen und vorsichtig öffnen.
- Gel mit *aqua dest.* säubern und auf eine Größe von 10 x 16 cm zuschneiden, Sammelgel und unteren Trenngelbereich verwerfen.

5.5.2. Aufbau und Proteintransfer (Blottingprozedur)

In der vorliegenden Arbeit wurde das Semidry-Verfahren mit diskontinuierlichem Puffersystem nach Kyhse-Andersen [236] angewandt.

- Nach Wässern der Graphitbodenplatte und Einsetzen in die Blotkammer werden zu unterst fünf zugeschnittene und in "Anodenpuffer 1" getränkte Filterpapiere deckungsgleich und blasenfrei aufgelegt.
- Darauf folgend fünf weitere in "Anodenpuffer 2" getränkte Filterpapierstücke. Zwischen den beiden Anodenpuffern entsteht so ein durch Tris vermittelter Konzentrations- und pH-Gradient.
- Die gut vorgewässerte Nitrozelluloseacetat-Folie (10 x 16 cm) und das zugeschnittene Polyacrylamidgel auflegen.
- Den Abschluss bilden fünf mit "Kathodenpuffer" getränkte Filterpapiere.
- Die gewässerte Graphitdeckplatte aufsetzen und mit Bleiplatten beschweren
- Elektrische Kontakte anschließen und die Blotkammer verschließen.
- Laufdauer: - Einzelgel (10 x 16 cm): 95 Minuten bei 195 mA und 10 V
 - für zwei Gele : 95 Minuten bei 390 mA und 10 V

5.6. Herstellung des TBS-T-Waschpuffers

TBS-T (10 x Stammlösung):

350,64 g NaCl

48,40 g Tris (pH 8)

20,00 ml Tween 20

mit *aqua dest.* auf 4 l auffüllen und ca. 1 Stunde gut mischen

5.7. Blocken der Nitrozelluloseacetat-Folie

Nach dem Blotten werden Filterpapiere und Gel von der Nitrozelluloseacetatfolie abgezogen und verworfen. Um später einen störungsarmen und definierten Hintergrund zu haben, sollten die auf der Membran noch vorhandenen proteinbindungsfähigen Valenzen abgesättigt und neutralisiert werden. Mögliche Systeme sind FCS (fetales Kälberserum) oder BSA (bovines Serumalbumin), die aber speziell für die Untersuchung von Tyrosinphosphorylierungen weniger geeignet sind. In der vorliegenden Arbeit die Folie daher für mindestens 30 Minuten in 10% "Low Fat Milk" ('Blocking-Milch') geblockt.

Herstellung der Blocking-Milch:

- 1g des Milchpulvers (BioRad) wird in 10 ml TBS-T (1:10 verdünnte Stammlösung) aufgelöst.

Die Folie kann für einige Zeit im Kühlschrank in dieser Lösung aufbewahrt werden. Vor weiteren Arbeitsschritten Folie gründlich in 1 x TBS-T waschen: 3 mal kurz spülen, 3 mal 5 Minuten auf dem Schütteltisch. Diese erste Waschung erfolgt gründlich, um nicht mit verschlepptem Milchprotein die Antikörperlösungen zu kontaminieren.

5.8. Der Primärantikörper

Der eigentliche Detektionsschritt: die Zugabe eines spezifischen, gegen Phosphotyrosin gerichteten monoklonalen Maus-Antikörpers. Wir verwendeten entweder eine Mischlösung monoklonaler Antikörper (pY-20 B und 4G10) oder nur den Klon p 99 in einer Verdünnung von jeweils 1:1000, die über einige Wochen wiederverwendet wurde (zum Haltbarmachen zusätzlich 5% Na-Azid zugeben).

- Die Nitrozelluloseacetat-Folie 90 Minuten mit der Antikörperlösung inkubieren.
- Gründliches Waschen der Folie mit 1 x TBS-T (5 mal kurz spülen, 3 mal 5 Minuten auf dem Schütteltisch).

5.9. Der Sekundärantikörper

Mit diesem Schritt wird der spezifische mausgenerierte Primärantikörper mit einem Anti-Maus-Immunglobulin markiert. Diese Antikörper sind zusätzlich mit einem Molekül Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, was eine anschließende Chemolumineszenzreaktion ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde IgG vom Schaf, Klon HRG (Amersham) in einer Verdünnung von 1:15000 oder 1:20000 verwendet.

- Herstellung der Anti-Maus-Antikörperlösung:
 - 1:15000: 2,6 µl Antikörper in 40 ml 1 x TBS-T
 - 1:20000: 2,0 µl Antikörper in 40 ml 1 x TBS-T
- Inkubation der Blotfolie für 45 Minuten.
- Waschen mit 1 x TBS-T

5.10. Zugabe des Lumineszenz-Reagens

Das verwandte Lumineszenzreagens zum Sichtbarmachen der Blot-Proteinbanden auf dem Film besteht aus den Komponenten Luminol/Enhancer und Peroxidlösung.

- Jeweils 4,5 ml der beiden lichtempfindlichen Lösungen in zwei Plastikcups einpipettieren (erst unmittelbar vor Benutzung mischen).
- Das Gemisch über die abgetropfte Nitrozelluloseacetat-Folie gießen
- lichtgeschützt für 5 Minuten inkubieren.

5.11. Filmexposition, Entwicklung und densitometrische Auswertung

- Die Nitrocellulose-Membran wird luftblasen- und faltenfrei in Haushaltsklarsichtfolie oder eine Aktenschutzhülle eingeschlagen
 - In der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm in einen Expositionskasten legen
 - Je nach Leuchtintensität der Blotfolie 30 Sekunden bis 35 Minuten exponieren
- Der belichtete Film wird im Anschluß entwickelt, fixiert, gewässert und getrocknet. Die Ergebnisauswertung der Filme erfolgt nach dem Einscannen (ImageMaster[®], Pharmacia Biotech).

6. Der Northern-Blot

6.1. Kurzbeschreibung der Methodik

Zur Untersuchung von Nukleinsäuren wurden zwei Transfer- und Detektionstechniken entwickelt, der Southern-Blot zur Identifikation von DNA-Fragmenten (nach E. M. Southern) und der Northern-Blot zur RNA-Analytik. Im letzteren wird ein zuvor aus Zellen isoliertes Nukleinsäure-Gemisch elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die RNA möglichst denaturiert d. h. nur in ihrer Primärstruktur vorliegen sollte. Im Anschluß erfolgen eine dauerhafte Übertragung (Blotting) auf eine feste Trägermatrix (z.B. Nitrozellulose) sowie nach Zugabe einer radioaktiv oder chemolumineszent markierten kongruenten RNA-Sonde Sichtbarmachen (Schwärzung der Filmplatte) und Auswertung

6.2. Vorbereitung der Zellen

6.2.1. Zellkultur

Für die RNA-Versuche werden Endothelzellen wie beschrieben in 10 cm Kulturschalen bis zur Konfluenz angezogen.

6.2.2. Vorbehandlung und Inkubation der Zellen

Die Zellen werden zuerst mit 8 ml Inkubationsmedium für 2 Stunden depriviert, und anschließend für 30 Minuten entweder mit 10 U/ml TNF (Tumor-Nekrosefaktor) oder 10 nM PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) inkubiert. Diese Stoffe werden eingesetzt, um eine deutliche Aktivierung („Stressreaktion“) der Zellen zu

induzieren. Das proinflammatorische Zytokin TNF aktiviert den Transkriptionsfaktor NF κ B ("nukleärer Faktor"), PMA wirkt über Aktivierungsschritte der Proteinkinase C und Ras. Im Anschluß an die Vorbehandlung, nach Absaugen des Aktivatorhaltigen Mediums, erfolgt eine 30-minütige Inkubation mit 8 ml Rotwein- oder Ethanollösung (auf 1‰ mit PBS verdünnt). Als Kontrolle werden Zellen mit 8 ml Rotwein- oder Ethanollösung (auf 1‰ mit PBS verdünnt) für 15, 30 oder 45 Minuten inkubiert - allerdings ohne Vorbehandlung mit TNF oder PMA.

6.3. RNA-Isolierung

Alle Arbeitsschritte erfolgen auf Eis.

- Nach Ablauf der Inkubationszeit Zellsamples mit jeweils 600 μ l Cell-Lysis-Solution versetzen
- Nach 5 Minuten unter vorsichtigem Schwenken wird das Zellysate zusammengeschabt und in 1.5 ml Beckman-Ultrazentrifugationsgefäße überführt
- Zugabe von 200 μ l Protein-DNA-Präzipitationslösung (dabei jedes Gefäß sofort mehrmals umdrehen und schütteln)
- Nach 5 Minuten Gefäße bei 80000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführen und je 600 μ l Isopropanol zugeben
- etwa 50 mal invertieren, für 3 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugieren und Überstand abpipettieren
- Pellet mit 1 ml 70% Ethanol waschen
- Überstand verwerfen und Pellet kurz in der Speedvac trocknen
- Anschließend Pellet in 100 μ l DEPC-Wasser oder RNA-Hydrationslösung lösen (dabei gut mischen bzw. 'vortexen', damit möglichst viel RNA in Lösung geht) und sofort wieder auf Eis lagern
- für 10 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugieren
- 90 μ l Überstand abnehmen, in ein verschraubbares Eppendorf-Gefäß geben und auf Eis lagern (in den verbleibenden 10 μ l am Boden befindet sich nicht in Lösung gegangene RNA).

6.4. Quantitätsbestimmung am UV-Spektrophotometer

Als Anhaltspunkt für das weitere Procedere wird der RNA-Gehalt der einzelnen Gefäße nach photometrischer Messung der OD bei 260 nm bestimmt.

- Berechnung des RNA-Gehaltes:

$$\text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung (100)} \times \text{RNA-Faktor (40)} = \text{Menge RNA in } \mu\text{g/ml}$$

RNA-Menge pro eingesetztes Eppendorf-Gefäß (Probenvolumen 80 μ l):

$$\text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \times 100 \times 40 \times 0,08 = \text{RNA-Menge in } \mu\text{g pro } 80 \mu\text{l Probe}$$

Der kleinste errechnete Wert dient als Basis. An ihm kann abgeschätzt werden, ob die gewonnene RNA-Menge ausreicht, um eine Hybridisierung durchzuführen. Die RNA-Menge pro Ansatz sollte auf eine Mindestkonzentration von 10 μ g/20 μ l eingestellt werden. Hierfür müssen die RNA-Proben meist mit weiterem DEPC-Wasser verdünnt werden.

Berechnungshilfe:

$$\begin{aligned} 10 \mu\text{g} &\approx 20 \mu\text{l} \\ y \mu\text{g RNA-Einsatz} &\approx x \mu\text{l} \end{aligned}$$

6.5. Pufferherstellung und Gießen des RNA-Agarosegels

Da die RNA bei der Elektrophorese als Einzelstrang vorliegen sollte, benutzt man zur Auftrennung sogenannte denaturierende Gele (Formaldehyd-Agarose, Ethidi-

umbromid-Agarose), die die Ausbildung von Wasserstoffbrücken in Makromolekülen unterbinden.

5.5.1. Pufferherstellung

a) 5% BPB (Bromphenolblau) (10 ml)

500 mg BPB

10 ml *aqua bidest.* (steril)

b) RSB (20 ml):

10 ml Formamid (99%)

3,5 ml Formaldehyd (37%)

2 ml 10 x MOPS

4,5 ml DEPC-H₂O

Mischen und zu 1 ml aliquotieren.

c) RLB (20 ml):

3 g Ficoll (Ficoll 400)

10 ml 10 x MOPS

6 ml DEPC-H₂O

332 µl Ethidiumbromid

2 ml 5% BPB

Ficoll 400 in MOPS und DEPC-H₂O über Nacht lösen, mit DEPC-H₂O auf 18 ml auffüllen. Ethidiumbromid und BPB zugeben, danach 1 ml-Aliquots zügig bei -20°C wegfrieren.

Zusätzlich werden folgende Puffer benötigt:

10 x MOPS (1 l):

41,9 g MOPS

4,1 g Na-Na-Acetat (wasserfrei)

3,7 g EDTA

- Zum Lösen mit sterilem *aqua dest.* zu etwa $\frac{3}{4}$ des Volumens auffüllen

- Mit 10 N NaOH auf pH 7 einstellen und restliches Volumen zugießen.

1 x MOPS (1 l) (erst kurz vor dem Elektrophorese-Lauf frisch herstellen):

100 ml 10 x MOPS

900 ml *aqua bidest.*

6.5.2. Agarosegel-Herstellung (N-Blot-Maxi-Gel 1.2%)

Das Maxigel (1,2 %) enthält, berechnet für 175 ml:

1,75 g Agarose

31,5 ml Formaldehyd (37%)

17,5 ml 10 x MOPS

126,0 ml *aqua bidest.*

- Bis auf Formaldehyd alles im Erlmeyerkolben lösen, Flüssigkeitsstand markieren

- nach Verschließen mit Frischhaltefolie in der Mikrowelle erhitzen (~30 ml *aqua bidest.* als Verdunstungsreserve zusätzlich zugeben).

- zuviel verdunstete Flüssigkeit bis zur Markierung mit *aqua bidest.* nachfüllen

- vorbereitete Gussform mit Klebeband abdichten

- Formaldehyd unter dem Abzug zugeben (tropfenweise über die Glaswand einlaufen lassen und gut vermischen) und das Gel sofort gießen

- Kamm für Sampletaschen einstecken

- ca. 1 Stunde aushärten lassen.

6.6. Probenauftrag

Aufgetragen und aufgetrennt wird jeweils die Gesamt-RNA der Zellprobe, nur etwa 2% davon machen die in unserem Fall eigentlich interessierende mRNA aus. Die RNA muss während der gesamten Verarbeitungsschritte auf Eis gehalten werden.

- 10 µg RNA in Eppendorfgefäß pipettieren und etwa 15 Minuten in der Speedvac eintrocknen lassen.

- Mit 16 µl RSB lösen und nach guter Vermischung 4 µl RLB zugeben.
- danach RNA-Lösung für 15 Minuten bei 60°C inkubieren und anschließend sofort auf Eiswasser abschrecken.
- Nach etwa 2 min kurz herunterzentrifugieren.
- Klebebandabdichtung vom Gel entfernen
- Gel in die Laufkammer einsetzen und ausrichten, Kamm entfernen
- Laufpuffer (1x MOPS) in Gelkammer füllen
- 20 µl der RNA-Samples in die Sammeltaschen pipettieren.
- Kammer schließen und Puffer-Zirkulationspumpe einschalten.
- Stromversorgung und Voltzahl einstellen

6.7. Gellauf

Gellauf entweder

- Am Tage mit ca. 4 Stunden Laufzeit bei 100 V *oder*
- über Nacht bei 28 V

Eine Stromstärke von 60 bis 70 mA sollte jeweils nicht überschritten werden. Wenn die Lauffront die andere Gelseite erreicht hat, wird die Auftrennung beendet.

6.8. Der RNA-Transfer (Vakuum-Blot)

Für die weiteren Untersuchungsschritte erfolgt im Anschluss an die Auftrennung eine Übertragung der RNA auf eine haltbarere und besser zu bearbeitende Trägermatrix, z. B. Nitrozellulosefolie oder Nylonmembran.

6.8.1 Pufferherstellung

Blotting-Puffers 20 x SSC+ NaOH (5 l):

876,5 g NaCl

441,0 g Na-Citrat

in ca. 4 l sterilem *aqua bidest.* lösen, mit 10 N NaOH auf pH 7,0 einstellen und restliches Volumen aufgießen.

5 x SSC+NaOH (2 l) (für den Blotlauf benötigt):

500 ml 20 x SSC

2 ml 10 N NaOH

1498 ml *aqua bidest.*

6.8.2. Vorbereitungen und Lauf

- Gel unter UV-Licht kontrollieren und eventuell photographieren (Blende 8, Belichtungszeit 1 Sekunde - dabei können Bandenverlauf, 18 und 20 s-Bande sowie Auftragsstellen und Probennummern markiert werden)
- Gel mit den Sammeltaschen nach oben über einen dicht abschließenden Maskenrahmen auf die zugeschnittene und zuvor in Blotting-Puffer eingeweichte, neutrale Nylonmembran legen
- mit ca. 1 l 5 x SSC+NaOH bedecken und Unterdruck (Wasserpumpe) anschließen
- Laufdauer etwa 2 bis 3 Stunden bei 50 - 60 mbar.
- Nach Beendigung des Blotvorganges Puffer absaugen (kann mehrfach verwendet werden).
- Im Anschluß Membran mit der anhaftenden RNA auf 3 MM Papier an warmer Stelle kurz trocknen (etwa 1 Minute).
- Bei UV-Gelkontrolle sollten keine fluoreszierenden Stellen mehr auszumachen sein.

- Nach dem Antrocknen Membran für 1 Minute in den UV-Crosslinker geben, danach können unter UV-Licht die 18 und 28 s-Bande, sowie Auftragsstellen und Probennummern markiert werden.
- Nachdem die Folie weiter getrocknet wurde, kann sie bis zur Hybridisierung eingeschweißt und kühl gelagert werden.

6.9. Radioaktive Hybridisierung (Riboprobe-Sonde)

6.9.1. Synthese der 'Riboprobes'

Auf Eis Reagentien in folgender Reihenfolge pipettieren:

4,0 µl 5 x Transkriptionspuffer

2,0 µl 100mM DTT

4,0 µl NTP-Mix

2,5 µl 0.1 mM CTP

Direkt im Radioaktivlabor werden die folgenden Reagentien pipettiert:

1,0 µl linearisierte c-DNA

0,5 µl Rnasin

5,0 µl γ -³²P-CTP

3,0 µl GAPDH

2,0 µl DEPC

1,0 µl T7 RNA-Polymerase (für MCP-1)

- kurz anzentrifugieren
- bei 37 °C für 1 Std. inkubieren

Zugabe von:

5,0 µl 10 x DNase I-Puffer

24 µl DEPC-H₂O

1,0 µl RNase-freie DNase I

- Mischen und kurz anzentrifugieren
- für 15 Minuten bei 37 °C inkubieren
- Säulen (Push-columns) vorbereiten: einspannen und zwei Eppendorf-Gefäße übereinander stellen
- 70 µl 1 x STE auf die Säule pipettieren, mit einer 20 ml Spritze durchdrücken und Probengefäß Nr. 2 in den Sockel stellen
- Nach der zweiten Inkubation Probe mit 10 µl Markierungsfarbstoff mischen, 60 µl Reaktionsgemisch in die Säule pipettieren und wieder mit 20 ml Spritze durchdrücken
- Im Anschluss noch einmal mit 70 µl 1 x STE nachspülen und durchdrücken
- Alles in Eppendorf-Gefäß auffangen (das Volumen beträgt jetzt etwa 100 µl) und von diesem Schritt an in Plexiglasbox aufbewahren (Strahlenschutz)

Zum Messen der Counts/µl nach dem Einbau mischt man 1 µl der Probe mit einem Hub Szintillationsflüssigkeit und gibt sie in ein Szintillationszählergefäß (pro ml Hybridisierungslösung sollten 1-2 Mio. Counts eingesetzt werden).

6.9.2. Hybridisierung

- Röhrchen bereitstellen und mit Hi-Salt-Lösung füllen
- Membran vom unteren Ende (der dem Probenauftrag gegenüberliegende Seite) her aufrollen und in ein Röhrchen geben. Röhrchen ganz auffüllen, verschließen und drehen, bis Membran der Innenwand ohne Luftblasen anliegt
- Hi-Salt-Lösung ausgießen (kann mehrfach verwendet werden) und etwa 8 ml Hybridisierungslösung in das Röhrchen füllen

- Dicht verschließen und für 2 Stunden bei ca. 65°C prehybridisieren (unpezifische Bindungsstellen werden abgedeckt).
- Nach dem Prehybridisieren Riboprobe mit Hybridisierungslösung versetzen (auf gemessene 1-2 Mio. Counts wird ein ml Hybridisierungslösung eingesetzt), gut mischen und in das Probenröhrchen geben.
- Hybridisierung der Sonde über Nacht (ca. 12 Std.) bei 65°C.

Waschschritte mit 20 x SSC und 20 X SSPE:

- Röhrchen aus dem Ofen holen
- Boxen mit ca. 250 ml Waschlösung füllen.
- 50 ml Waschlösung in das Röhrchen geben, verschließen, drehen und wieder öffnen, dann Membran herausholen und in die bereitgestellte Box geben.
- Box für 45 Minuten bei 65°C im Wasserbad bei leichtem Schütteln inkubieren
- Waschvorgang auf gleiche Weise 2 mal für jeweils 30 Minuten wiederholen
- abschließend Membran auf 3MM-Papier trocknen lassen

6.10. Filmexposition

Die Expositionspappe der Expositionskassette wird mit Autoradiogramm-Markern gekennzeichnet. Nach dem Trocknen der radioaktiven Membran werden entweder die Filme eingeschweisst oder die Expositionspappe nach Aufkleben der Membran in Klarsichtfolie eingepackt. Die Filmexposition erfolgt in der Expositionskassette bei -70°C mit Lichtverstärkerfolie für 5 bis 30 Stunden (abhängig von der Membranstrahlung).

6.11. Entwicklung und Auswertung

Film direkt aus dem Kühlschrank nehmen, in Entwicklerbad einlegen, anschließend fixieren und gründlich wässern. Die Bandenauswertung erfolgt nach dem Trocknen im Gegenlicht beziehungsweise densitometrisch.

7. Chromatographische Verfahren

Bei den möglicherweise wirksamen Rotweininhaltsstoffen kann es sich um Flavone, Hydroxyflavone, Chromane, Anthocyane und Tannine (Gerbstoffe) handeln. Dies sind - mit Ausnahme der aromatischen Carbonsäure Gallussäure und ihren Glykosiden, den Tanninen - überwiegend heterocyclische organische Verbindungen, sogenannte benzokondensierte Ringsysteme des 1-Pyrans. Die Anthocyane besitzen dabei Flaven als Ringgrundskelett, die übrigen werden zur Gruppe der Chromane gezählt. Auch diese beiden Stoffgruppen liegen in der Natur häufig als Glykoside vor, also einem Zuckeranteil und der entsprechenden Farbstoffkomponente (Aglykon). Durch Chromatographieverfahren können unterschiedliche Substanzen aus der Rotweinflösung präparativ dargestellt und somit der Versuch gemacht werden, aufgefundene Stoffe anhand ihrer chemischen Charakteristiken einzuordnen. Weiterhin lässt sich die Wirksamkeit verschiedener, durch Auftrennungsverfahren oder pH-abhängige Ausschüttelungen gewonnener Fraktionen des Weins im Zellversuch testen.

7.1. Kurzbeschreibung der Säulen- und Dünnschichtchromatographie

Bei der Säulenchromatographie kommt es zur Auftrennung aufgrund verschiedener Wanderungsgeschwindigkeiten von den im Lösungsmittel (bewegliche Phase) gelösten Stoffen bei ihrem Weg durch ein in einer Kartusche befindliches Adsorptionsmittel (stationäre Phase). Zwischen beiden Phasen entwickelt sich für jede Substanz ein typisches Gleichgewicht zwischen der Stoffkonzentration im Lösungs-

mittel und am Adsorptionsmedium. Als Adsorbentien dienen häufig AlOH oder Silicagel. Nach dieser groben mechanisch - chemischen Trennung versucht man, die einzelnen Substanzen abhängig von ihren Eigenschaften mit geeigneten Lösungsmitteln (wässrig oder hydrophob) aus der Bindung in der Matrixsäule herauszulösen. Die aufgefangenen Eluate enthalten aufgetrennte Stoffe in relativ großer Reinheit und abhängig vom Lösungsmittel, mit verschiedenen stofftypischen chemischen Charakteristika.

Bei der Dünnschichtchromatographie (DC/TLC) wird als Trennmatrix Kieselgel (Silicagel) oder AlOH in einer etwa 250 µm dicken Schicht auf eine Glasplatte oder Metallfolie aufgebracht. Am unteren Rand wird etwas von der zu trennenden Lösung aufpipettiert. Der Auftrennprozess findet in einer verschließbaren Trennkammer statt, die 0,5 - 1 cm hoch mit einem Laufmittel gefüllt ist. Die Laufzeit beträgt, abhängig vom Fließmittel zwischen 5 und 70 Minuten. Anschließend versucht man, Stoffe durch spezifische Färbe- und Detektionsreagentien oder gegebenenfalls unter Zuhilfenahme von UV-Licht sichtbar zu machen und zu identifizieren.

7.2. Vorbereitende Maßnahmen

Für die pH-abhängige Ether-Extraktion von Stoffen aus der wässrigen Phase muss der handelsübliche Ether durch Reduktion, Destillation und Entfernung von möglicherweise entstandenem Peroxid gebrauchsfertig gemacht werden. Peroxid kann zum einen an der Entstehung unerwünschter artifizierender Substanzen beteiligt sein, zum anderen besteht bei Aufkonzentration Explosionsgefahr. 1 l Ether wird mit 2,5 g FeSO₄, 0,5 g CaO und 150 ml *aqua dest.* ausgeschüttelt, dabei wird das grüne Fe(II) zu braunem Fe(III) oxidiert. Anschließend erfolgt die Destillation (Siedepunkt des Ethers 39° C) im Wasserbad in einer Destillierkolonne mit absteigendem Wasserkühler und Sammelgefäß im Eisbad (*cave Siedeverzug*). Stöpsel und Verbindungen sollten hierfür nur mit Wasser, nie mit Fett gängig gemacht werden. Die letzten ca. 150 ml im Kolben enthalten überwiegend schwersiedende Bestandteile und Verunreinigungen und werden verworfen.

7.3. Fraktionieren der Rotweinprobe

Die Auftrennung des Weines wurde in unserem Fall mit einer Sephadex LH 20-Säule ("lipophile Gelpermeationschromatographie") und mit C18-Kartuschen ausprobiert, wobei sich durch die Verwendung von Aceton als Eluator große Schwierigkeiten in der Handhabung der Sephadex-Säule ergaben.

7.3.1. Säulengelpermeationschromatographie an einer Sephadex LH 20-Matrix:

- Trockene, lipophile Sephadex-LH20-Matrix (Pharmacia, Uppsala) eine Stunde in Methanol vorquellen lassen
- anschließend im Wasserstrahlvakuum entgasen
- Eine Säule gießen (Kunststoffsäule), den unteren Abschluss bildet Watte gut mit Methanol spülen
- 1,5 ml Rotweinprobe auf die Säule aufpipettieren
- Nachdem die aufgetragene Testsubstanz in die Säulenmatrix eingezogen ist, mit Methanol und im Anschluss mit Aceton eluieren
- die unten austropfenden Fraktionen einzeln aufnehmen (u. a. an verschiedener Eluatfärbung erkennbar)

Hier ergaben sich Schwierigkeiten, weil die Kunststoffsäule und die Schichtung der Trennmatrix vom Aceton stark angegriffen wurden. Die Methode wurde aus diesem Grund verlassen.

7.3.2. Festphasenextraktion an einer C18-Kartusche

- Die vorgefertigte Säule gut mit Methanol spülen mit *aqua dest.* nachwaschen
- Nachdem das Wasser in die Kartuschenmatrix eingezogen ist, Probenauftrag (4,5 ml Rotwein)
- Nach Adsorption der Substanz wird zuerst die wässrige Phase (PBS als Fließmittel), anschließend die lipophile Phase (Fließmittel Aceton) eluiert und aufgefangen.
- Aceton im Rotationsverdampfer eindampfen
- Probe mit 10 %igem Ethanol aufnehmen.

Sowohl mit der lipophilen als auch mit der wässrigen Fraktion können Untersuchungen bzw. Expositionsversuche mit Lebendzellen gemacht werden.

7.4. pH-abhängige Ether-Ausschüttelungen

Bei der Fraktionierung an der C18-Kartusche erhielten wir jeweils 9 ml wässrige (in PBS) und lipophile Phase. Der lipophile Ansatz wird mit gleicher Menge Ether ausgeschüttelt, die wässrige Phase jeweils abgelassen, die Etherphase gesammelt (Wiederholung 3x). Die Ansätze werden dazu auf pH 8 und auf pH 1 (c. HCl) gebracht; ein dritter Ansatz wird (c. NaOH) auf pH 14 eingestellt (30 min bei 40°C), anschließend auf pH 1 abgesenkt und ebenfalls ausgeschüttelt. Hierbei wird bei glykosidischen Verbindungen der hydrophile Zuckeranteil abgespalten und das lipophile Aglykon kann im Ether extrahiert werden. Die so erhaltenen organischen Etherphasen werden über Nacht bei etwa 8°C über Na₂SO₄ getrocknet. Die Proben werden eingedampft und in 9 ml Aceton aufgenommen. Ein 20 µl Aliquot wird entnommen, im Rotationsverdampfer eingetrocknet, mit 10 ml 10% Ethanol (in PBS) aufgenommen und im Anschluss eine Zellinkubation wie vorbeschrieben durchgeführt.

Eine Ausschüttelung von Proben bei pH-Werten von 1 bis 9 erfolgt nach dem Einstellen (wie vorbeschrieben) sinngemäß.

7.5. Dünnschichtchromatographie (DC/TLC) oder Reversed-Phase-Kieselgel-Chromatographie (RP)

7.5.1. Vorbereitung

Die vorbeschichtete Glasplatte wird mit einem Glasschneider auf die geeignete Größe gebracht und zuerst mit Aceton, oder bei Laufmittelgemischen auch mit einem der Bestandteile, gewaschen und gut getrocknet.

7.5.2. Probenauftrag

Die mit Bleistift markierte Probenauftragsregion sollte etwa 1 cm oberhalb des Unterrandes liegen, auch zum Rand der Glasplatte sollte mindestens 1 cm Abstand gewahrt werden. Es werden vorsichtig jeweils zwischen 2 und 20 µl Substanzlösung in kleinen Portionen auf die Kieselgelmatrix aufpipettiert. Vor jedem Nachpipettieren Flüssigkeitsspotts antrocknen lassen (Föhn). Anschließend die Platte in eine verschließbare Laufkammer stellen (Lösungsmittelgesättigte Atmosphäre), deren Boden etwa 0,5 cm hoch mit Laufmittel gefüllt ist.

7.5.3. Laufmittel

Die Laufmittel (Monosubstanzen oder Gemische) unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Polarität und Laufgeschwindigkeit und können abhängig von der Zusammensetzung zur Analyse bestimmter Stoffgruppen benutzt werden: Essigsäureethylester-Methanol-H₂O (100:13,5:10) oder H₂O-Methanol/HCl (50:50) für polare Komponenten/Glycoside, oder Toluol-Essigsäureethylester (93:7) für lipo-

phile Substanzen. Folgende Laufmittel wurden bei unseren Untersuchungen ausprobiert:

- Aceton und Dichlormethan-Methanol (50:50): -> ungeeignet
- Methanol (relativ unpolar): -> schlecht geeignet
- Methanol-Eisessig und Methanol/HCl (100:1): -> mäßig geeignet
- H₂O-Methanol/HCl (50:50): -> gut geeignet

7.6. Einsatz verschiedener Sprühreagentien

Nach Beendigung des Laufes, wenn die Laufmittelfront kurz vor der Oberkante der Glasplatte steht, wird diese aus der Kammer genommen. Platte unter den Abzug stellen bis alle Laufmittelreste verdampft sind. Anschließend werden schlecht sichtbare oder mit bloßem Auge unsichtbare Spots mit Hilfe unterschiedlicher spezifischer Sprüh- oder Tauchreagentien und eventuell Betrachtung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

7.6.1. Verwendete Reagentien

a) Anisaldehyd-H₂SO₄-Reagenz (AS): besonders für Terpenoide, Bitterstoffe und Saponine.

Rezept: 0,5 ml Anisaldehyd mit 10 ml Eisessig mischen, dann 85 ml Methanol und 5 ml konz. H₂SO₄ zugeben. Die Platte unter dem Abzug mit etwa 10 ml besprühen und anschließend 7 Minuten bei ~100°C inkubieren. Bei Tageslicht oder UV_{365 nm} auswerten.

b) Fast Blue B Salt-Reagenz (FSB): für phenolische Komponenten.

Rezept: 0,5 g 3,3'-Dimethoxybiphenyl-4,4'-bis(diazonium)-dichlorid (= Fast blue B) in 100 ml *aqua dest.* lösen. Platte mit 6 - 8 ml besprühen, trocknen lassen und unter Tageslicht betrachten. Eventuell mit 10%iger ethanolischer NaOH nachsprühen.

c) KOH/Bornträger-Reagenz: für Anthrachinone (rot), Anthrone (UV_{365 nm}: gelb) und Cumarine (UV_{365 nm}: blau).

Rezept: Die Platte mit 10%igem ethanolischem KOH besprühen und nach kurzem Erwärmen unter Tageslicht oder UV_{365 nm} auswerten.

d) Millon's Reagenz (ML): für Phenylglykoside und Arbutin.

Rezept: 3 ml Quecksilber in 27 ml rauchender Salpetersäure lösen und die Lösung dann mit gleichem Volumen H₂O verdünnen. Die Platte vorsichtig besprühen und bei Tageslicht auswerten.

e) Natural-Products-Polyethylenglycol-Reagenz (NP/PEG oder NEU-Reagenz): für Flavonoide, Aloin.

Rezept: Die Platte zuerst mit 10 ml 1 %igem methanolischem Diphenyl-Borsäure-9-ethylaminoester (= Diphenylboryloxyethylamin, NP), und anschließend mit 8 ml 5%igem ethanolischem Polyethylenglykol-4000 (PEG) besprühen. Auswertung bei Tageslicht oder UV_{365 nm} (meist intensives Fluoreszenzverhalten).

f) Ninhydrin-Reagenz: für Aminosäuren, biogene Amine und Ephedrine.

Rezept: 30 mg Ninhydrin (1,2,3-Indantrion-hydrat) in 10 ml n-Butanol lösen, dann 0,3 ml 98% Essigsäure zugeben. Platte mit 8-10 ml besprühen, für 5-10 Minuten unter Beobachtung erwärmen und bei Tageslicht auswerten.

g) Vanillin-H₂SO₄ (VS): für sogenannte "essential oils" (Terpenoide, Phenylpropanoide).

Rezept: Lösung I: 1%iges ethanolisches Vanillin; Lösung II: 10%ige ethanolische H₂SO₄. Die Platte zuerst mit 10 ml Lösung I und anschließend sofort mit 10 ml Lösung II besprühen. Unter Beobachtung bei 110°C für 5-10 Minuten erwärmen und auswerten.

8. Im Zellexperiment verwendete Verbindungen und Lösungsmittel

8.1. Lösungsmittel

Die folgende Stoffe wurden zur Lösung von im Zellexperiment benutzten Feststoffen bzw. zur Herstellung der Verdünnungslösungen vor Zugabe zu den Zellkulturen verwendet.

8.1.1. DMSO (Dimethylsulfoxid)

Molekulargewicht 78,13; Molekülformel: (H₃C)₂SO. Dimethylsulfoxid ist eine farblose, hygroskopische Flüssigkeit (Sdp. 189°C), gut mischbar mit Wasser, Alkoholen, Benzol, Chloroform und Aceton. Es dient in der chemischen Industrie unter anderem als Lösungsmittel für PVC, Perlon, Polyacrylnitril und Polyurethane. Aufgrund seiner nukleophilen Eigenschaften solvatisiert es Kationen sehr viel besser als Anionen, so dass diese in DMSO besonders reaktiv sind. In der Dermatologie findet DMSO außerdem als sogenannte "Schleppersubstanz" zur besseren Aufnahme von Wirkstoffen durch die Hautbarriere Verwendung.

8.1.2. Ethanol

Synonym: Ethylalkohol. Molekülformel: C₂H₅OH.

Ethanol ist eine wasserähnliche Flüssigkeit (Sdp. 78,4°C) mit charakteristischem Geruch und verbrennt mit blassblauer Flamme bis zu einer Verdünnung von etwa 50 % mit Wasser.

8.1.3. PBS

"Phosphated buffered saline" ist ein physiologischer Elektolyt-Phosphat-Puffer zur universellen Anwendung in Labor und Zellkultur, beispielsweise zum Lösen, Waschen oder Verdünnen.

8.2. Blutplasma

8.2.1. Gewinnung

Das für die Plasma-Kontrollversuche benötigte Blutplasma wurde von freiwilligen Spendern mit Hilfe handelsüblicher Heparin-Monovetten® nach Punktion der Cubitalvene gewonnen. Im Anschluss wurden die Blutproben zentrifugiert, der Überstand gesammelt und vermischt ('gepoolt') und anschließend in Aliquots bei -20°C tiefgefroren.

8.2.3. 10 %iges Plasma

Um 10 %iges Plasma zu erhalten, wurden 10 ml Aliquots aus 1 ml gepooltem Plasma und 9 ml PBS-Puffer gemischt und bei -20°C tiefgefroren.

8.3. Hemmstoffe der Signaltransduktionsproteine

Um die Identität der gefundenen Proteinbande einzukreisen, wurden vor Rotweinxposition der Zellen Hemmstoffe verschiedener Signaltransduktionswege zum jeweiligen Versuchsansatz zugegeben. Die verwendeten Konzentrationen sind Orientierungswerte vorliegender Versuchsprotokolle bzw. Herstellerempfehlungen.

8.3.1. Src-Kinase-Hemmstoffe

Hierzu zählen unter anderem Calphostin C, Geldanamycin, Herbimicin A, PP1, Tyrphostin A23 und Genistein. Herbimicin und Genistein beispielsweise hemmen auf mikroskopisch sichtbarer Ebene die Stressfaserbildung in Endothelzellen.

8.3.1.1. Genistein

Synonym: 4',5,7-Trihydroxyisoflavon;

gelber, kristalliner Feststoff, löslich in DMSO. Diese Verbindung kommt in der Sojabohne (*Glycine max*) vor und soll canceroprotektive Eigenschaften besitzen. Sie wirkt als Hemmstoff der Tyrosin-Protein-Kinase und der Topoisomerase II-Aktivität *in vitro*, sowie als kompetitiver Inhibitor von ATP in anderen Protein-Kinase-Reaktionen.

8.3.1.2. PP1

Synonym: {4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo [3,4-d] pyrimidin}; hellbrauner Feststoff, löslich in DMSO. Die Verbindung ist ein potenter, membranpermeabler Inhibitor der src-Tyrosinkinase-Familie.

8.3.1.3. Herbimicin A

Molekulargewicht: 574,7; Molekülformel: $C_{23}H_{32}N_2O_9$; gelbbrauner Feststoff, löslich in DMSO. Die Verbindung ist ein Stoffwechselprodukt von *Streptomyces hygroscopicus*. Sie ist membranpermeabel und ein potenter Inhibitor sowohl der Tyrosin-Kinase als auch der PDGF-induzierten Phospholipase D-Aktivierung. Hemmende Wirkung auf Tumorwachstum und Angiogenese ist nachgewiesen. Vermutete Wirkungsweise: Die Inaktivierung beispielsweise der Phosphotyrosin-Kinase-Aktivität von pp60src (Onkogen bei Rous-Sarkoma-Virus-transformierten Zellen) kommt durch Interaktion der Sulfhydrylreste des Proteins mit der p-Benzochinongruppe von Herbimicin A zustande.

8.3.1.4. Tyrphostin A23

Synonyme: AG 18; 9-cyano-(3,4-dihydroxy)cinnamonitril oder [3,4-Dihydroxybenzylidene]malononitril; weißer Feststoff, löslich in DMSO und Ethanol. Die Verbindung inhibiert die Protein-Tyrosinkinase, die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und die GTPase-Aktivität von Transducin.

8.3.2. Rho-Kinase-Hemmstoffe

8.3.2.1. C3-Transferase

Feststoff

8.3.2.2. Y-27632

Synonym:(+)-(R)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexancarboxamid-dihydrochlorid-monohydrat; Molekulargewicht: 338,3; Molekülformel: $C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl \cdot H_2O$; weißes, kristallines Pulver, löslich in Wasser.

8.3.3. MAP-Kinase-Hemmstoffe

8.3.3.1. PD 98059

Synonyme:2'-Amino-3'-Methoxyflavon,2-[2-Amino-3-methoxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-on; Molekulargewicht 267,3; Molekülformel $C_{16}H_{13}O_3$; blaßgelber Feststoff, löslich in DMSO. PD 98059 blockt selektiv die Aktivität der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK/ERK-Kinase/MEK) durch eine Hemmung der MAP-Kinase-Aktivierung und somit der nachfolgenden Phosphorylierung von MAP-Kinase-Substraten (sowohl *in vitro*, als auch in natürlich wachsenden Zellen). Diese Hemmung wird wahrscheinlich durch die Bindung der Substanz an eine Stelle des MAPKK-Moleküls verursacht, die den Zugang zu Aktivierungsenzymen blockiert.

8.3.4. IP3-Kinase-Hemmstoffe

8.3.4.1. Y-27632

Synonym: (+)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexancarboxamid-dihydrochlorid-Monohydrat; Molekulargewicht: 338,3; Molekülformel $C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl \cdot H_2O$; weißer kristalliner Feststoff.

8.3.4.2. Wortmannin

Synonyme: KY 12420, Antibiotikum SL-2052;

Molekulargewicht 428,4; Molekülformel $C_{23}H_{24}O_8$; weißer Feststoff, löslich in DMSO oder Ethanol. Die Verbindung ist ein Pilzmetabolit (*Penicillus fumiculosus*), der als potenter, selektiver, zellpermeabler und irreversibler Inhibitor der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Kinase (IP3-Kinase) sowohl in gereinigten Zellpräparationen als auch in Cytosolfractionen wirkt.

8.3.5. Chelatoren intrazellulären Calciums

8.3.5.1. EGTA

Synonyme: 1,2-Bis(2-aminoethoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure oder 3,6-Dioxaoctan-1,8-diamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure; Molekulargewicht: 380,35.

8.3.5.2. BAPTA/AM

Synonym: 1,2-Bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-tetra(acetoxymethyl)ester;

hellgelber Feststoff, löslich in DMSO. Diese Verbindung ist die membranpermeable Form von BAPTA und kann von einer Vielzahl Zellen aufgenommen werden. Sie wird von cytosolständigen Esterasen hydrolysiert und so als aktivierter Ca^{2+} -Chelator BAPTA intrazellulär angereichert. Beschrieben ist u. a. eine Inaktivierung der Proteinkinase C.

8.4. Ausgewählte Rotweinhaltstoffe mit möglicher pharmakologischer Wirkung

Folgende Inhaltsstoffe des Rotweins (lediglich drei von hunderten) sind wegen möglicher pharmakologischer Wirksamkeit und protektiven Eigenschaften im Gespräch. Die Untersuchung und Validierung eines möglichen Einflusses auf Endothelzellen sollte in der vorliegenden Arbeit unternommen werden.

8.4.1. Quercetin

Synonym: 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon;

grünlichgelber Feststoff, löslich in Ethanol, Essigsäure oder DMSO.

Ein Stoff aus der Gruppe der Hxdroxyflavone/Chromane. Er ist einer der wichtigsten Pflanzenfarbstoffe dieser Gruppe und kommt unter anderem als L-Rhamnosid in Eichenholz und frei oder glykosidisch gebunden in den Blüten von Goldlack, Rose, Stiefmütterchen sowie in Tee, Hopfen und Traubenschalen vor. Durch gezielte Lagerung von Wein oder bestimmten Branntweinen in jungen Eichenholzfässern ('Barrique-Ausbau') könnte es durchaus zu einer Anreicherung dieser Substanz kommen. Quercetin wird als Inhibitor von IP3-Kinase, Phospholipase A2, mitochondrialer ATPase, Phosphodiesterasen sowie Proteinkinase C beschrieben und soll des weiteren Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* induzieren können.

8.4.2. Myricetin

Synonyme: Cannabiscetin; 3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavon;

weißlicher Feststoff, löslich in Ethanol.

Diese Substanz, ebenfalls aus der Gruppe der Hydroxyflavone, kommt in etlichen Pflanzen und deren Früchten oder Fruchtschalen vor.

8.4.3. Resveratol

Synonym: Trans-3,4',5'-Trihydroxystilben;
weißlicher Feststoff, löslich in Ethanol oder DMSO.

Eine phenolische Verbindung mit Pilzwachstum-hemmenden, antitumorösen bzw. proapoptotischen und antioxidativen Eigenschaften, die unter anderem in Traubenschalen und Wein vorkommt. Resveratol ist vor allem als Antioxidans und "Krebschutzmittel" im Gespräch. Die Substanz wird beschrieben als spezifischer Hemmstoff für Cyclooxygenase-1 (Cox-1) und deren Hydroxyperoxidase-Aktivität. Ferner soll sie eine Phorbol-ester-induzierte freie Radikalbildung in HL-60-Zellen unterdrücken und bei DMBA-vorbehandelten TM 677-Zellen antimutagen wirken.

C. ERGEBNISSE

1. Zellmorphologie: Aktin-Fluoreszenz-Färbung

Zum Sichtbarmachen von Veränderungen in Bereich des Cytoskeletts wurden die Zellen mit Phalloidin-Rhodamin gefärbt und anschließend im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

1.1. Naive Zellen

Unbehandelte gesunde konfluente und adhärenente Endothelzellen zeigen eine unauffällige Morphe ohne mikroskopisch sichtbare Veränderungen von Zellmembran und intrazellulärer Aktinfaserstruktur.

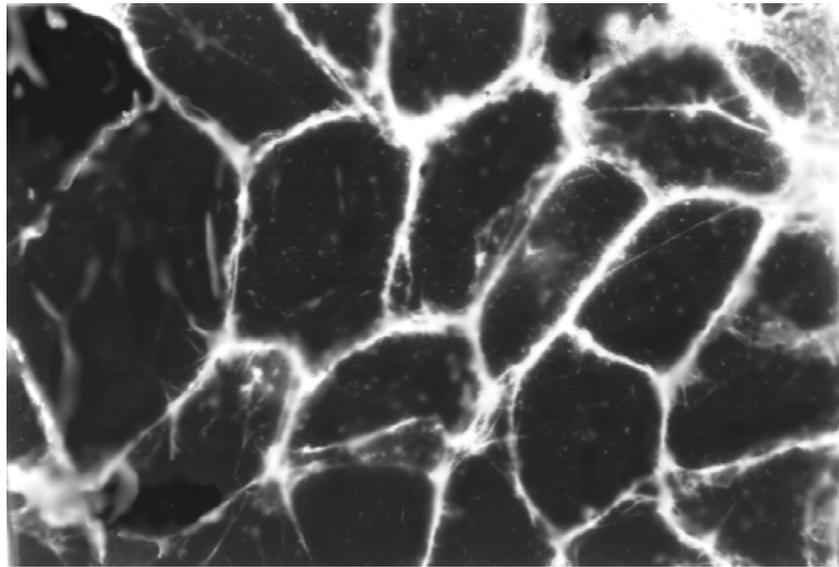
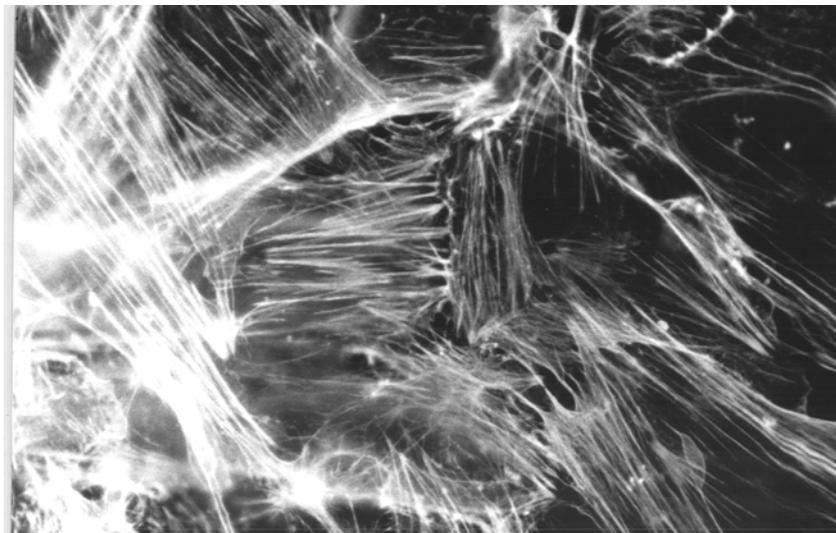


Abb. 20: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (x 1000) naiver konfluente Endothelzellen (HUVEC)

1.2. Ausbildung von Stressfasern nach Inkubation mit Rotwein

Gesunde konfluente und adhärenente Endothelzellen zeigen nach 35-minütiger Inkubation mit Rotweinslösung (1‰ in PBS) Veränderungen an Zellmembran und intrazellulärer Aktinstruktur (Stressfasern, Roughes und Spikes).



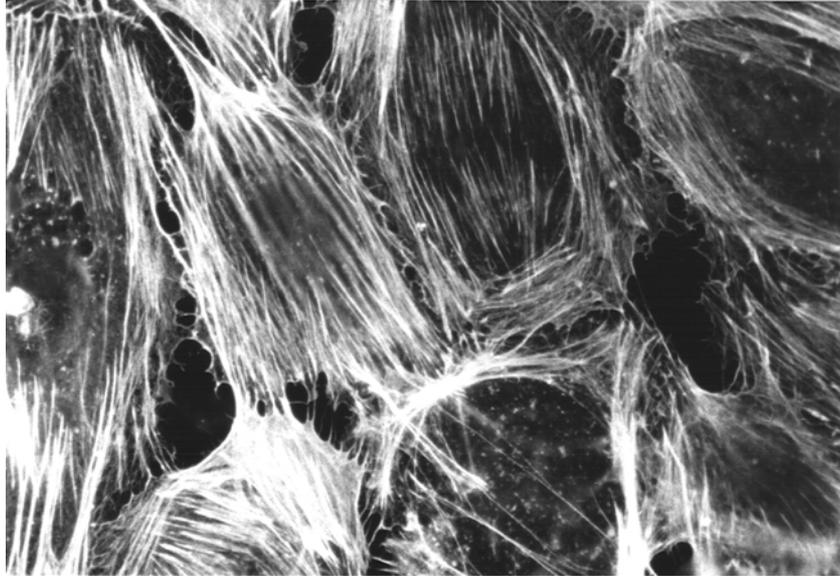


Abb. 21a und b: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (x 1000) von Veränderungen an Zellmembran und Cytoskelett von Endothelzellen (HUVEC) nach 35-minütiger Inkubation mit Rotweinslösung (PBS-Verdünnung zu 1‰)

1.3 Inhibierender Einfluß von src-Kinase-Inhibitoren

Die Ausbildung von Stressfasern ist durch die src-Kinase-Inhibitoren Herbimycin A und Genistein teilweise zu beeinträchtigen.

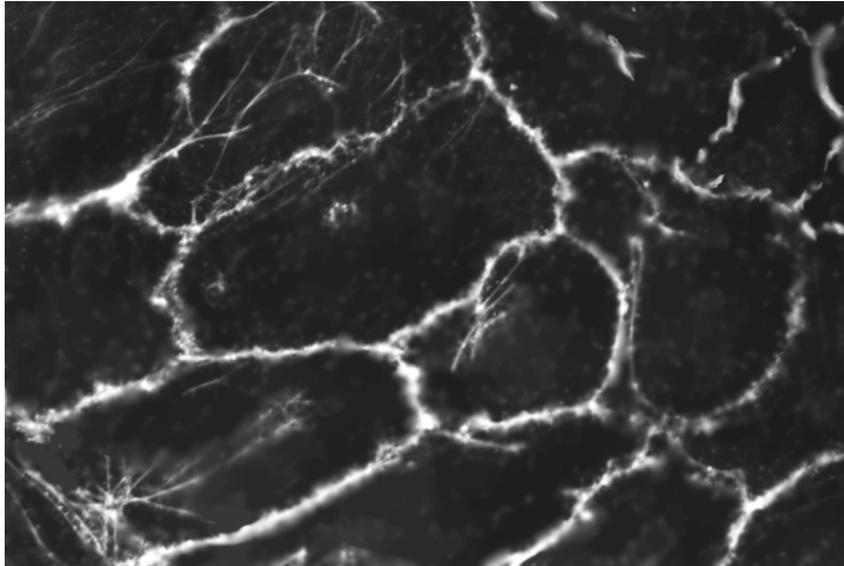


Abb. 22: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (x 1000): Inkubation konfluenter Endothelzellen (HUVEC) mit Herbimycin vor 15-minütiger Inkubation mit Rotweinslösung (zu 0.5‰ in PBS) schränkt die Ausbildung von Stressfasern ein

2. Protein-Analyse: Western-Blot

2.1. Rotwein-induzierte Tyrosinphosphorylierung

Nach Exposition von gesunden konfluenten Endothelien mit Rotweinelutionen von 0,5‰, 1‰ und 2,5‰ in PBS wird im Western-Blot Assay eine spezifische Phosphotyrosin-Bande mit einem Molekülgewicht von 85 kd sichtbar.

Bei einem geringen Prozentsatz der Blots tritt zusätzlich mit der 85 kd-Bande eine schmale Bande im 210 kd-Bereich und/oder eine Doppelbande bei etwa 190 kd auf.

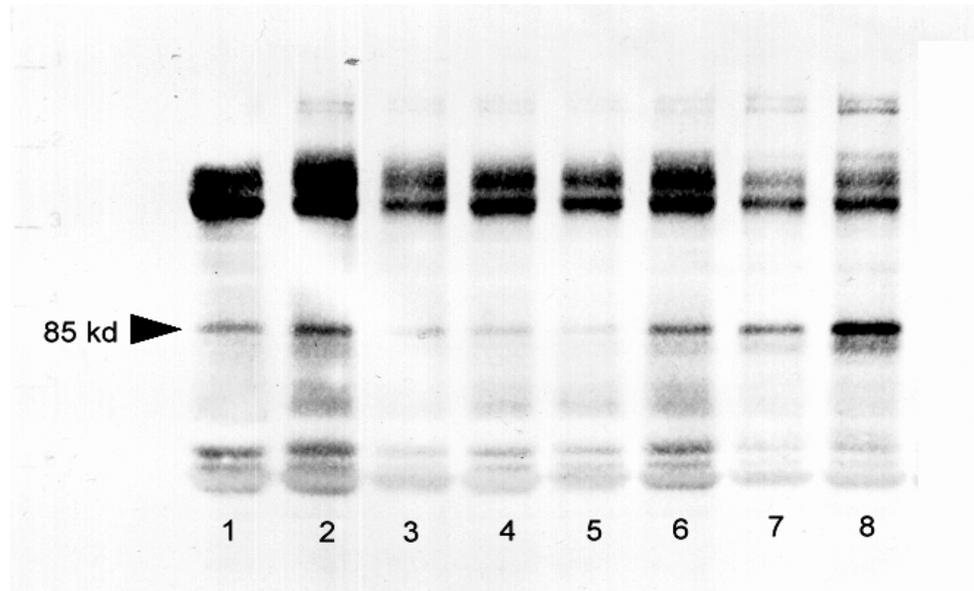


Abb. 23: Die 85 kd-Bande bei Rotweinverdünnungen von 0,5‰, 1‰ und 2,5‰ in PBS (n=3)

- (1) Mediumkontrolle, (2) PBS-Kontrolle,
 - (3) Ethanol (PBS-Verdünnung zu 1‰), 30-minütige Zellinkubation;
 - (4) Ethanol (PBS-Verdünnung zu 2,5‰), 30-minütige Zellinkubation;
 - (5) Ethanol (PBS-Verdünnung zu 2,5‰), 60-minütige Zellinkubation;
 - (6) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 0,5‰), 30-minütige Zellinkubation;
 - (7) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 1‰), 30-minütige Zellinkubation;
 - (8) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 2,5‰), 30-minütige Zellinkubation
- PBS = Porbello's buffered saline

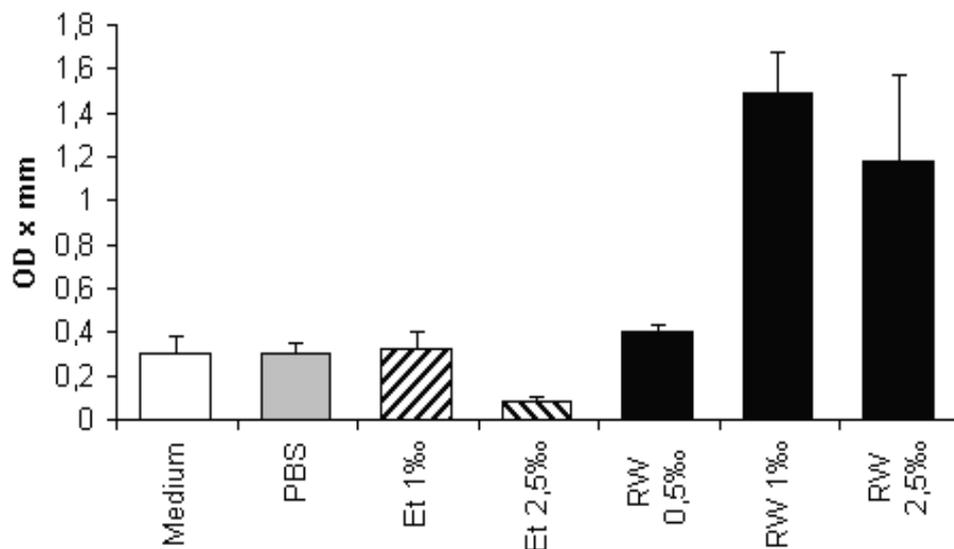


Abb. 24: Effekte verschiedener Rotweinverdünnungsstufen bei 30-minütiger Zell inkubation, mit Kontrollen (MW+SEM), n=4;

PBS = Porbello's buffered saline EtOH = Ethanol, RW = Rotwein

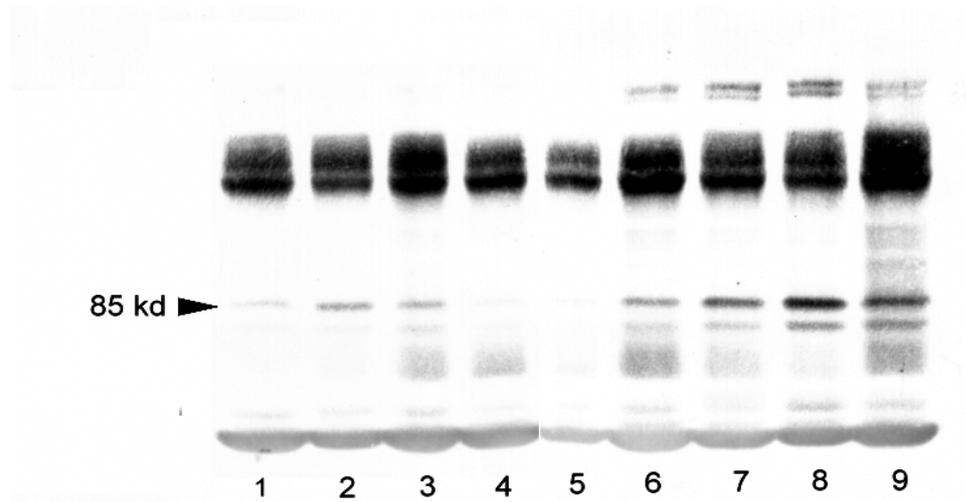


Abb. 25: Zeit-Wirkungs-Abhängigkeit der 85 kd-Bande bei Inkubation gesunder konfluenter Endothelzellen mit Rotwein-Verdünnungen und Kontrollen

- (1) Mediumkontrolle; (2) PBS-Kontrolle;
- (3) Ethanol (PBS-Verdünnung zu 1‰), 30-minütige Zellinkubation;
- (4) Ethanol (PBS-Verdünnung zu 2,5‰), 30-minütige Zellinkubation;
- (5) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 1‰), 1-minütige Zellinkubation;
- (6) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 1‰), 5-minütige Zellinkubation;
- (7) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 1‰), 15-minütige Zellinkubation;
- (8) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 1‰), 30-minütige Zellinkubation;
- (9) Rotwein (PBS-Verdünnung zu 1‰), 60-minütige Zellinkubation

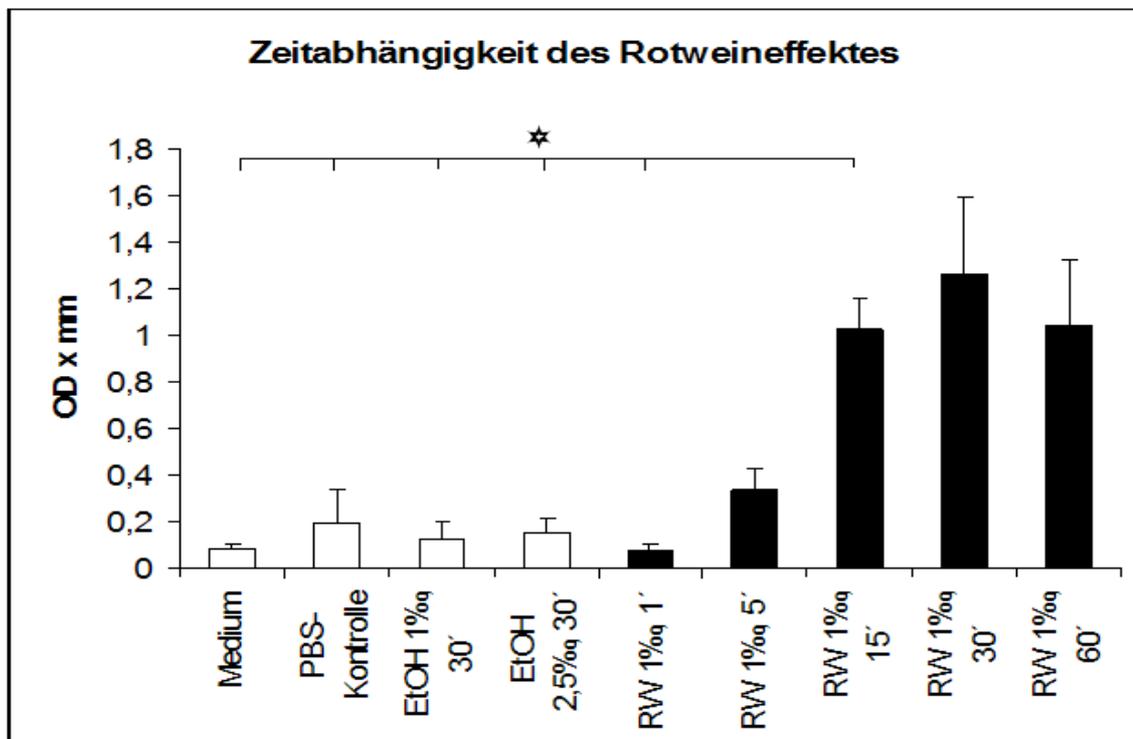


Abb. 26: Rotweineffekt (Zunahme der 85 kd-Bande) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (MW+SEM, * p < 0,05), n = 4;

PBS = Porbello's buffered saline, EtOH = Ethanol, RW = Rotwein

Dies lässt den Schluß zu, dass in den exponierten Zellkulturen ein intrazellulärer Mechanismus - mit dem Ergebnis der Bildung verschiedener Moleküle

wahrscheinlich im Rahmen eines reaktiven Signaltransduktionsprozesses - in Gang gesetzt wird, der ab ca 5 Minuten Inkubationszeit voll zum Tragen kommt und in dessen Verlauf ein Protein unbekannter Funktion mit der Molekülmasse 85 kd gebildet oder freigesetzt wird.

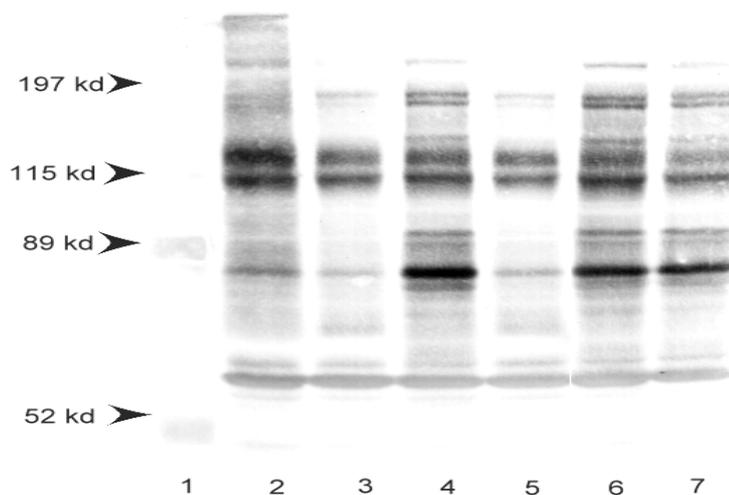


Abb 27: 85 kd-Banden mit zusätzlich sichtbaren Banden in den Bereichen von 210 und 190 kd (die Pfeile zeigen die Marker des Proteinstandards an)

- (1) Proteinstandard; (2) Mediumkontrolle;
- (3) Ethanol (PBS-Lösung zu 1‰), 30-minütige Inkubation;
- (4) Rotwein (PBS-Lösung zu 1‰), 30-minütige Inkubation;
- (5) PBS-Kontrolle;
- (6) Rotwein (PBS-Lösung zu 1‰), 30-minütige Inkubation;
- (7) Rotwein (PBS-Lösung zu 1‰), 30-minütige Inkubation

2.2. Auswaschversuche mit PBS-Puffer

Anschließend an eine 30-minütige Inkubation mit der Rotwein-Pufferlösung wurden die Versuchsansätze mit auf 37° C vorgewärmten Lösungspuffer über unterschiedlich lange Zeitabschnitte (1 Sekunde bis 60 Minuten) im Überschuss gespült, um zu überprüfen, ob die Tyrosinphosphorylierungsreaktion der Zellen als Antwort auf Rotweinexposition konstant und unumkehrbar ist oder ob eventuell beteiligte Agentien oder Zellprodukte abdiffundieren können oder ausgewaschen werden. Das Auftreten der Bande ist durch anschließende Spülbehandlung mit PBS in einem Zeitbereich von 1 Sekunde bis zu 30 Minuten nicht wesentlich abzuschwächen. Bei längerer Einwirkzeit (>45 Minuten) des Puffers wird die Bande langsam aber stetig schwächer.

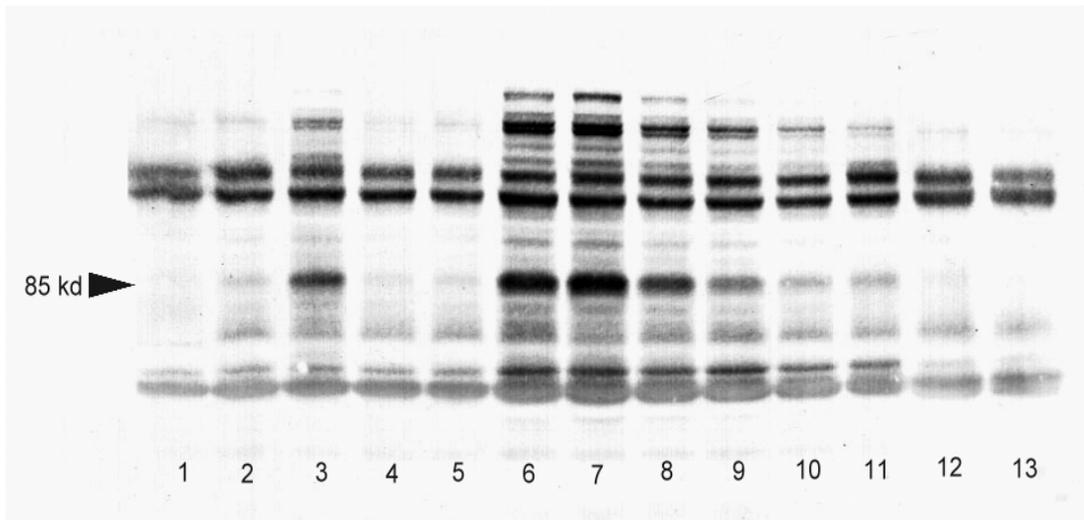


Abb. 28: Ausspüleeffekt durch PBS in Abhängigkeit von der Einwirkzeit
 (1) Mediumkontrolle; (2) Ethanol (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation;
 (3) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation;
 (4) Weißwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation;
 (5) Ethanol (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 15-minütige PBS-Spülung;
 (6) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 1-minütige PBS-Spülung;
 (7) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 5-minütige PBS-Spülung;
 (8) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 15-minütige PBS-Spülung;
 (9) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 30-minütige PBS-Spülung;
 (10) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 45-minütige PBS-Spülung;
 (11) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 60-minütige PBS-Spülung;
 (12) Weißwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 1-minütige PBS-Spülung;
 (13) Weißwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30' Inkubation, anschließend 15-minütige PBS-Spülung;

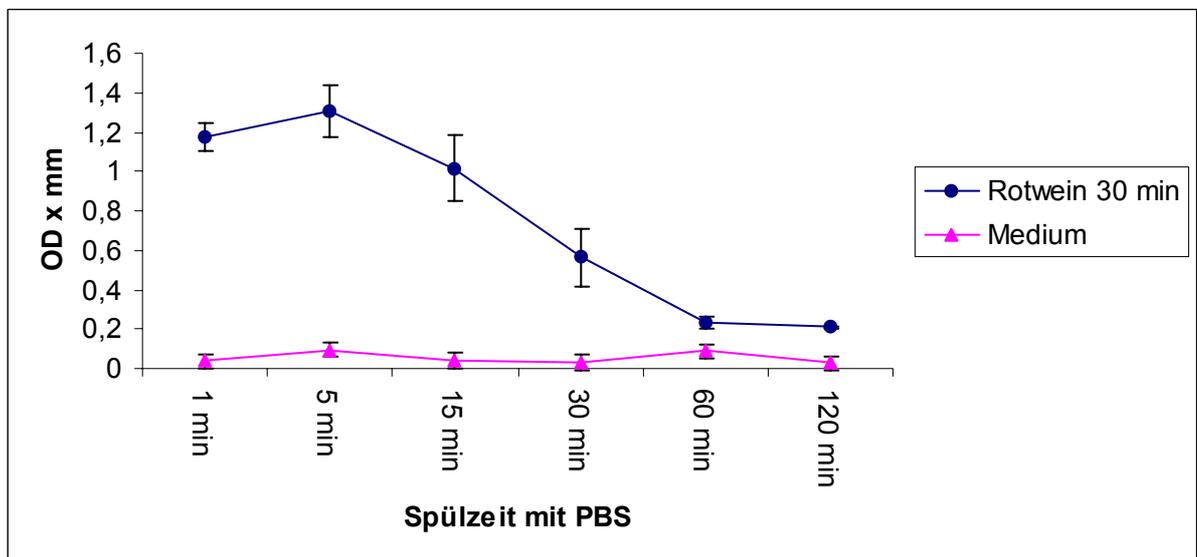


Abb. 29: Zeitverlaufdiagramm des von PBS-verursachten Auswasch-Effektes auf die nach 30 minütiger Inkubation in den Endothelzellen induzierte Rotweinwirkung (Ausbildung der 85 kD Bande) *in vitro*, (MW \pm SEM); n = 3

2.3. Zeit-Wirkungs-Kinetik für den Bandeneffekt der Rotweilösungen

Das Auftreten der 85 kd-Bande zeigt reproduzierbar eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Eine Zellreaktion mit dem Effekt der Bandenbildung tritt sowohl bei Rotweinverdünnungen von 0,5‰, 1‰ als auch 2,5 ‰ auf, und scheint damit relativ unabhängig von der eingesetzten Verdünnungskonzentration zu sein. Eine deutliche Zellreaktion tritt nach etwa 15 Minuten ein. Der Zeitbereich der stärksten Zellreaktion liegt zwischen 15 und 45 Minuten Exposition, wobei die längste Inkubationszeit in den hier beschriebenen Versuchsansätzen 60 Minuten war. Danach wird das Zellverhalten inkohärent. In der folgenden Blot-Abbildung wird das Ergebnis exemplarisch verdeutlicht:

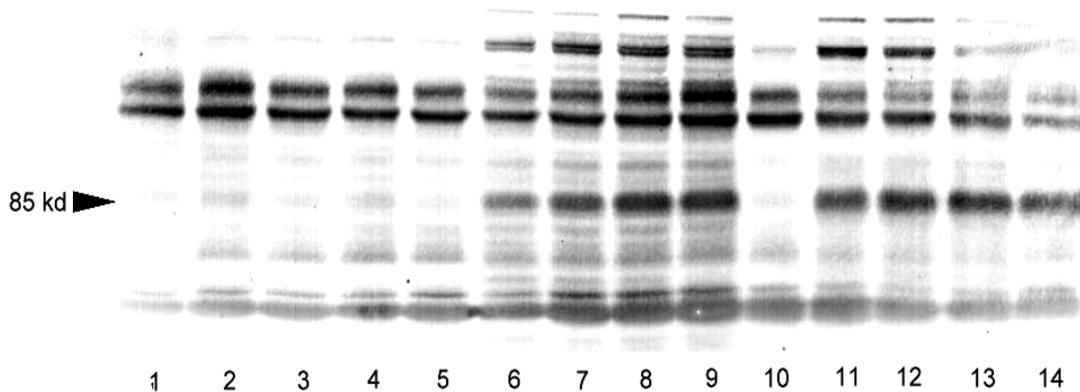


Abb. 30: Blotphoto der Zeit-Wirkungs-Kinetik zweier PBS-Rotweinverdünnungen
(1) Mediumkontrolle; (2) PBS-Kontrolle; (3) Ethanol (1 ‰ in PBS), 15-minütige Exposition;
(4) Ethanol (1 ‰ in PBS), 30-minütige Exposition;
(5) Rotwein (1 ‰ in PBS), 1-minütige Exposition;
(6) Rotwein (1 ‰ in PBS), 5-minütige Exposition;
(7) Rotwein (1 ‰ in PBS), 15-minütige Exposition;
(8) Rotwein (1 ‰ in PBS), 30-minütige Exposition;
(9) Rotwein (1 ‰ in PBS), 60-minütige Exposition;
(10) Rotwein (2,5 ‰ in PBS), 1-minütige Exposition;
(11) Rotwein (2,5 ‰ in PBS), 5-minütige Exposition;
(12) Rotwein (2,5 ‰ in PBS), 15-minütige Exposition;
(13) Rotwein (2,5 ‰ in PBS), 30-minütige Exposition;
(14) Rotwein (2,5 ‰ in PBS), 60-minütige Exposition;

2.4. Weißweinkontrollen

Der oben angeführte Bandeneffekt tritt für Weißwein sehr stark abgeschwächt auf und bewegt sich in etwa auf Höhe der Werte für Medium- und PBS-Kontrolle.

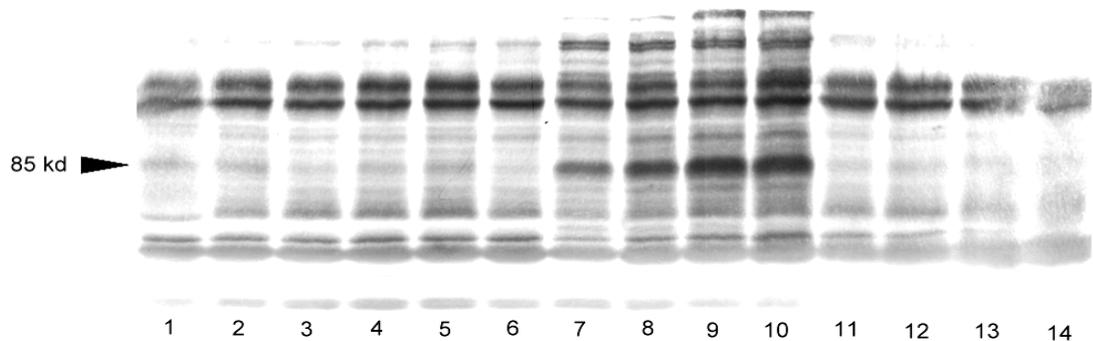


Abb. 31: Zeit-Wirkungs-Kinetik für verschiedene Rot- und Weißweinverdünnungen

- (1) Mediumkontrolle; (2) PBS-Kontrolle; (3) Ethanol (PBS-Lösung zu 1 ‰), 5 Minuten Inkubation;
- (4) Ethanol (PBS-Lösung zu 1 ‰), 15-minütige Inkubation;
- (5) Ethanol (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30-minütige Inkubation;
- (6) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 1-minütige Inkubation;
- (7) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 5-minütige Inkubation;
- (8) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 15-minütige Inkubation;
- (9) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30-minütige Inkubation;
- (10) Rotwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 60-minütige Inkubation;
- (11) Weißwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 5-minütige Inkubation;
- (12) Weißwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 15-minütige Inkubation;
- (13) Weißwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 30-minütige Inkubation;
- (14) Weißwein (PBS-Lösung zu 1 ‰), 60-minütige Inkubation

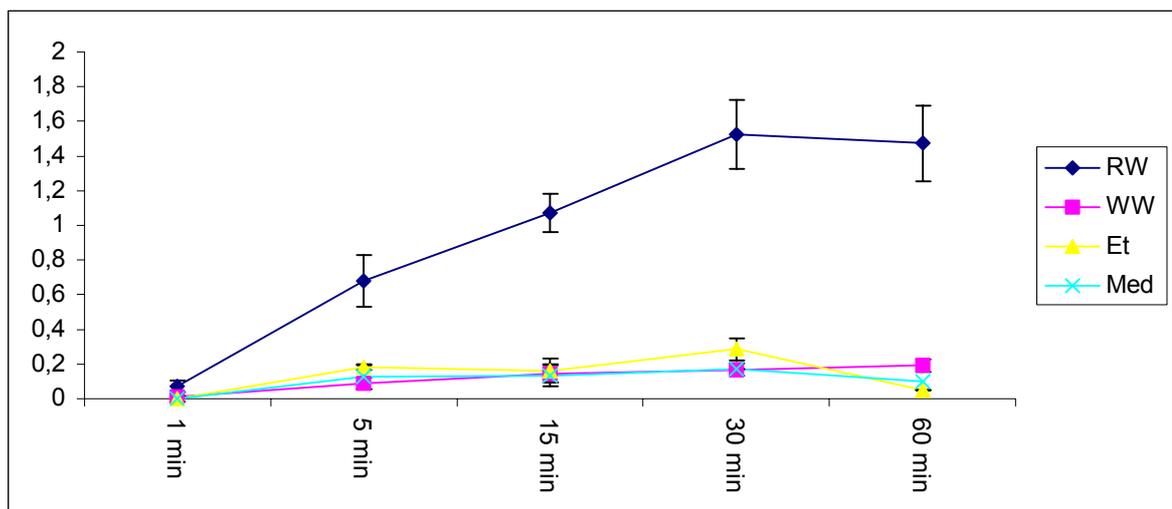


Abb. 32: Zeit-Wirkungs-Diagramm der Endothelzell-Reaktion *in vitro*.

Inkubation mit Rotwein- und Weißweinproben sowie Kontrollen; RW = Rotwein, WW = Weißwein, Et = Ethanol, Med = Mediumkontrolle (MW ± SEM), n = 4

2.5. Die Wirkung von unterschiedlichen Rotweine und Kontrollsubstanzen

Die Induktion der 85 kd-Bande tritt bei Inkubation mit Lösungen aller nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Rotweine der unteren und mittleren Preisklasse unter-

schiedlicher Rebsorten und Anbauggebiete auf. Die Bande erscheint nicht oder nur viel schwächer bei Weißwein (0,5‰ ige, 1‰ ige und 2,5‰ige Verdünnung in PBS), Ethanol (PBS-Lösungen zu 0,5‰, 1‰ und 2,5‰), dunklem Bier, grünem Tee und der Vektorsubstanz DMSO (jeweils auf 1‰ in PBS verdünnt). Die relativ deutlichste Bande aller Kontrollsubstanzen verursacht die Inkubation der Endothelzellkulturen mit rotem Traubensaft-Fertigprodukt (1‰ige Verdünnung in PBS).

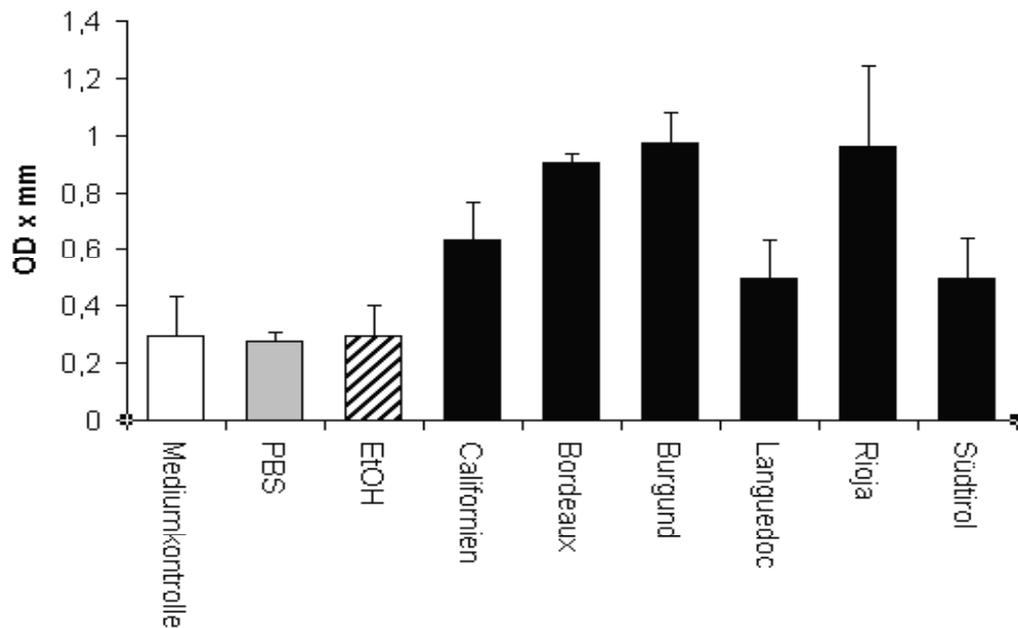


Abb. 33: Darstellung des Bandeneffektes bei jeweils 30-minütiger Inkubation mit den PBS-Lösungen verschiedener Rotweine (1‰) unterschiedlicher Lage und Rebsorte mit Kontrollen: Californien/USA; Bordeaux/F; Burgund/F; Languedoc/F; Rioja/E; Südtirol/I
 PBS = Porbello's buffered saline, EtOH = Ethanol (MW + SEM), n = 5

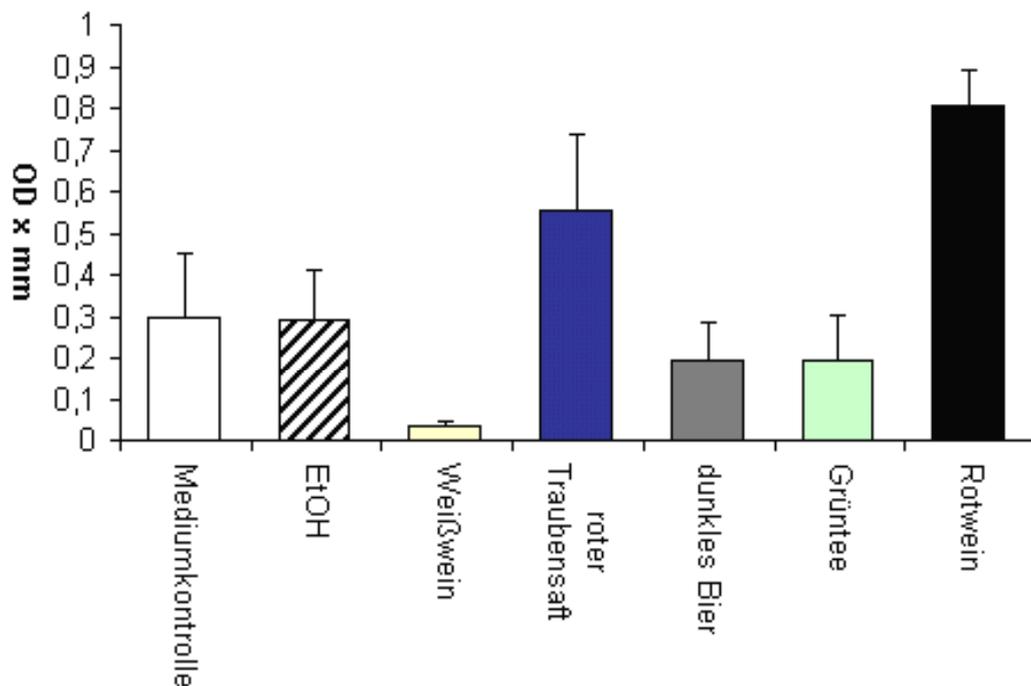


Abb. 34: Darstellung des Bandeneffektes verschiedener Rotweine im Vergleich zu unterschiedlichen Kontrollsubstanzen (jeweils 30-minütige Inkubation mit PBS-Lösungen zu 1%), (MW + SEM); n = 4

2.6. Versuchsansätze in 10%igem Plasma und Vollplasma

Um auch *in vitro* physiologischere Bedingungen zu erzeugen und die Zellreaktion auf Rotweinexposition unter diesen Voraussetzungen zu überprüfen, wurde gepooltes humanes 10%iges Plasma (in PBS) beziehungsweise humanes Vollplasma anstelle von PBS als Lösungspuffer verwendet. Die Ansätze und die Durchführung waren ansonsten identisch mit den unter Punkt 2.1 bis 2.5, 3 und 4 beschriebenen Versuchen. Die gewonnenen Ergebnisse lassen sowohl bei den Versuchen mit der 10%igen Plasmaverdünnung als auch beim Vollplasma keine eindeutigen Aussagen zu. Die 85 kd-Banden erscheinen entweder insgesamt stark abgeschwächt oder unregelmäßiger und ohne deutliche und reproduzierbare Zeit- oder Konzentrationabhängigkeit. Erschwert wird die Beurteilung dieser Versuche durch inkohärente, unruhige Blots mit starken Hintergrundstörungen.

3. Identifikationsversuch der auftretenden Proteinbande durch gezielte Hemmung verschiedener Signaltransduktionsproteine der Zelle

In einem nächsten Schritt wurden 10 unterschiedliche biologische Hemmstoffe eingesetzt, die durch ihren spezifischen Eingriffsort in den Signaltransduktionskaskaden einen möglichen Hinweis auf die Identität des tyrosinphosphorylierten 85 kd-Proteins liefern sollten.

3.1. Src-Kinase-Hemmstoffe

Bei der ersten Wirkstoffgruppe, den Src-Kinase-Hemmstoffen wurden folgende Ergebnisse beobachtet:

3.1.1. Genistein

Die vorherige Behandlung der Endothelzellen mit Genistein verursacht keine Hemmung der 85 kd-Bande.

3.1.2. Herbimicin A

Nach vorheriger Behandlung der Zellen mit diesem Pilzprodukt zeigt sich eine deutliche Hemmung der Bande.

3.1.3. Tyrphostin A23

Keine Hemmung der betreffenden Bande nach Vorbehandlung mit Tyrphostin A23.

3.1.4. PP1

Eine Vorbehandlung der Endothelzellen mit PP1, einem potenten Hemmstoff der src-Tyrosin-Kinase, verursacht eine Beeinträchtigung der Bandendicke im gesuchten Bereich.

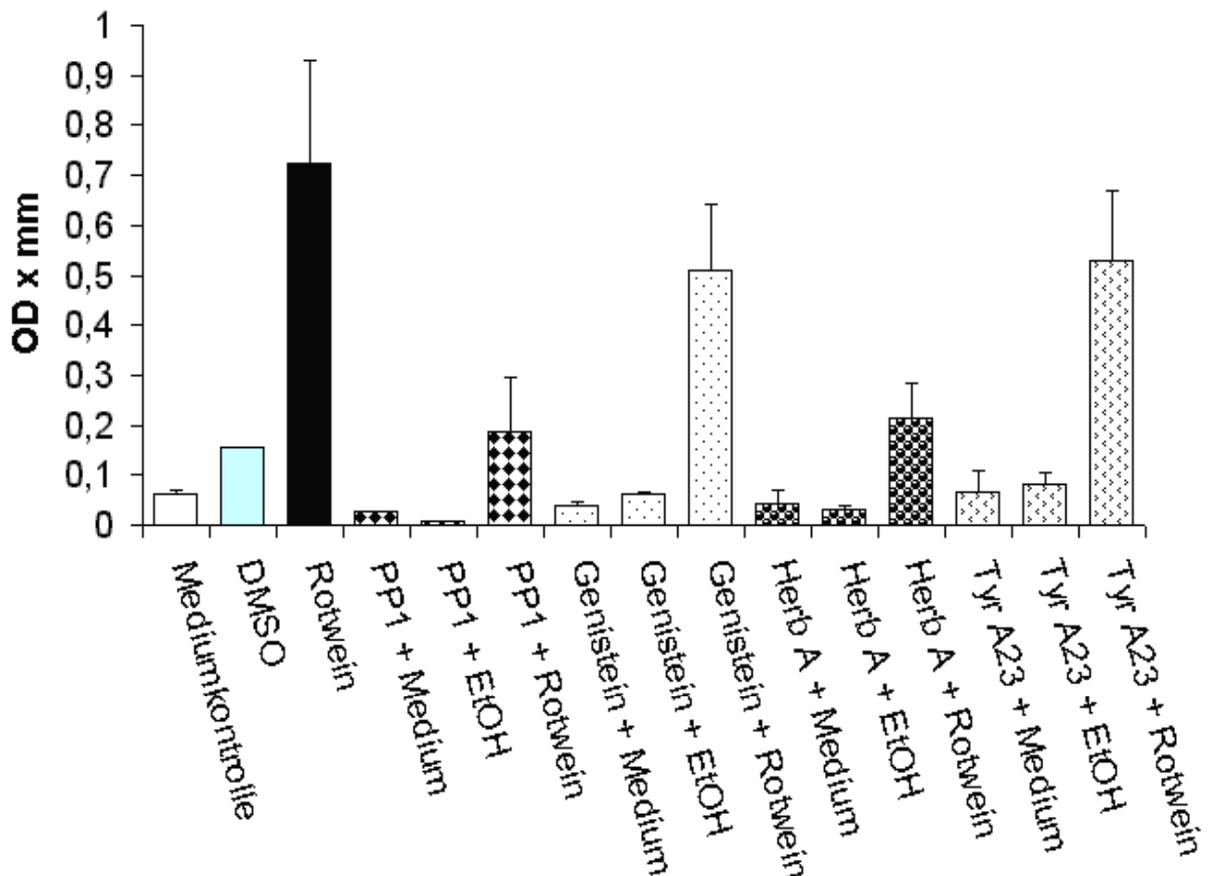


Abb. 35: Beeinflussung der Zellreaktion bei Rotwein-Inkubation durch Zugabe der Src-Kinase-Hemmstoffe PP1, Genistein, Herbimicin A und Tyrphostin A23
Rotwein bzw. Ethanol liegen jeweils zu 1‰ in PBS gelöst vor, die Inkubationszeit betrug jeweils 30 Minuten; EtOH = Ethanol; (MW + SEM); n = 4

3.2. Rho-Kinase-Hemmstoffe

Die beiden getesteten Rho-Kinase-Hemmstoffe C3-Transferase und Y-27632 zeigen keine Wirkung hinsichtlich der untersuchten Bande.

3.3. MAP-Kinase-Hemmstoffe

Die Versuche mit dem MAP-Kinase-Hemmstoff PD 98059 verursachen keine Hemmung der betreffenden Bande nach Vorbehandlung der Zellen.

3.4. PI3-Kinase-Hemmstoffe

Der PI3-Kinase-Hemmstoff Wortmannin verursacht keine Hemmung der betreffenden Bande.

3.5. Kalzium-Chelatoren

Vorbehandlung der Endothelzellen mit EGTA beeinflusst die Entstehung der untersuchten Bande nicht. Durch den intrazellulären Kalzium-Chelator BAPTA/AM wird die Entstehung der 85 kd-Bande jedoch gehemmt, wobei sich eine Konzentrations-Wirkungs-Kinetik darstellen lässt.

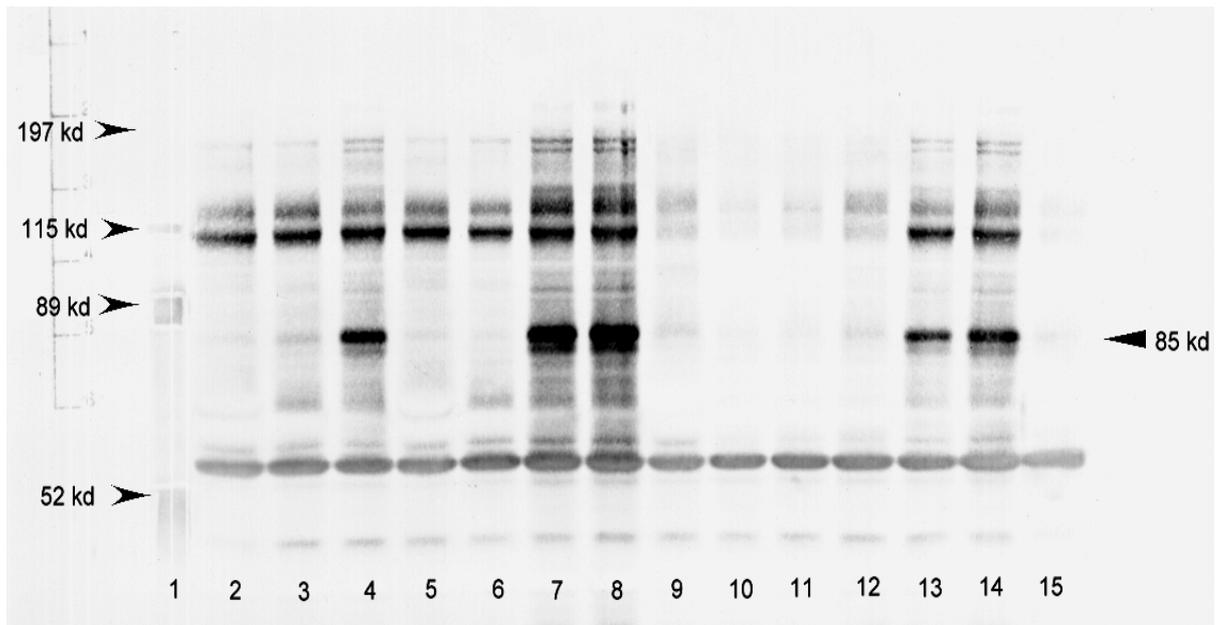


Abb. 36: Einfluss der Kalzium-Chelatoren EGTA und BAPTA/AM auf die Zellreaktion unter Rotwein-Inkubation

(1) Proteinstandard; (2) Mediumkontrolle; (3) Ethanol (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition; (4) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition; (5) frisches Medium nach EGTA-Vorbehandlung; (6) Ethanol (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach EGTA-Vorbehandlung; (7) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach EGTA-Vorbehandlung; (8) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach EGTA-Vorbehandlung; (9) frisches Medium nach BAPTA/AM-Vorbehandlung; (10) Ethanol (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach BAPTA/AM-Vorbehandlung; (11) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach BAPTA/AM-Vorbehandlung; (12) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach BAPTA/AM-Vorbehandlung; (13) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition; (14) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach EGTA-Vorbehandlung; (15) Rotwein (zu 1‰ in PBS), 30-minütige Exposition nach BAPTA/AM-Vorbehandlung;

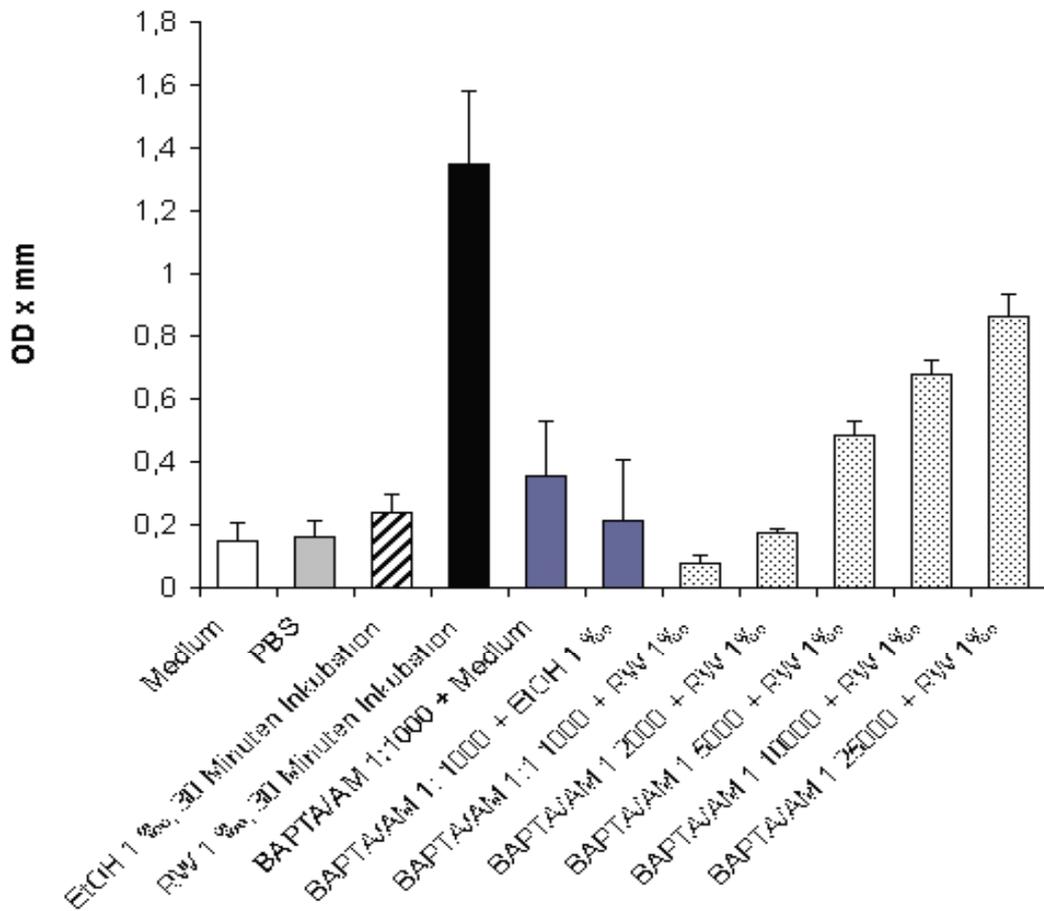


Abb. 37: Konzentrations-Wirkungs-Kinetik des Kalzium-Chelators BAPTA/AM: Einfluss einer 30-minütigen Inkubation mit dem Kalzium-Chelator (verschiedene Verdünnungsstufen, mit Kontrollen) auf die Zellreaktion bei Rotwein-Exposition (MW + SEM); n = 3; PBS = Porbello's buffered saline, EtOH = Ethanol, RW = Rotwein

4. RNA-Analyse: Northern-Blot

4.1. Induktion des Chemokins MCP-1

Bei gesunden adhären Endothelzellen kommt es in der ersten Inkubationsphase (bis etwa 30 Minuten) nach Inkubation mit Rotwein und Ethanol zu einem Anstieg des mRNA-Expressionslevels für MCP-1, einem 'immediate early-gene'. Auch nach Vorstimulation mit PMA zeigt sich ein vergleichbarer Effekt. Anschließende Rotwein-Inkubation scheint diesen Effekt leicht abzuschwächen. Die Wirkung einer Zellinkubation mit TNF erscheint hier überraschenderweise relativ gering. Rotwein-Inkubation der Zellen nach Vorstimulation mit TNF zeigt in dieser Versuchsreihe den stärksten Effekt. MCP-1 lockt in inflammatorischen Regionen Makrophagen an, kann also bei atherosklerotischen Prozessen die Einwanderung von Entzündungszellen und somit die Entstehung von Schaumzellen triggern bzw. einen entzündlichen Prozess in der Gefäßwand unterhalten helfen.

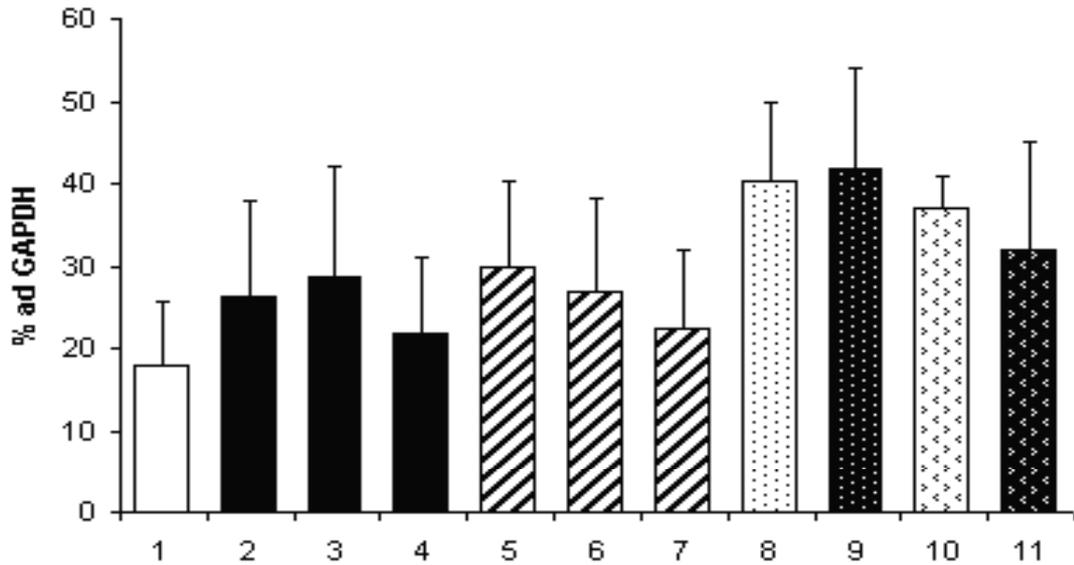


Abb. 38: Northern-Blot- Analyse MCP-1-spezifischer Messenger-RNA (MCP-1 mRNA): Expression des Chemokins MCP-1 bei Zellinkubation unter verschiedenen Bedingungen mit und ohne vorhergehende Zellstimulation; (MW + SEM); n = 4

Legende:

1: Mediumkontrolle; 2: Rotwein 1%, 10-minütige Inkubation; 3: Rotwein 1%, 30-minütige Inkubation; 4: Rotwein 1%, 45-minütige Inkubation; 5: Ethanol 1%, 10-minütige Inkubation; 6: Ethanol 1%, 30-minütige Inkubation; 7: Ethanol 1%, 45-minütige Inkubation; 8: TNF; 9: Rotwein 1%, 30-minütige Inkubation nach Vorbehandlung mit TNF; 10: PMA; 11: Rotwein 1%, 30-minütige Inkubation nach Vorbehandlung mit PMA

5. Chemische Auftrennungen und Chromatographie

Um eine orientierende Aussage über das Wesen der an der Bandenentstehung beteiligten Rotweininhaltsstoffe machen zu können, wurden Fraktionierung, Dünnschichtchromatographie und zur Kontrolle die Phosphotyrosinbanden-Detektion mittels Western-Blot angewandt.

5.1. Untersuchung lipophiler und hydrophiler Fraktionen

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung der Rotweinprobe an der C18 Kartusche wurden eine hydrophile und eine lipophile Phase gewonnen. In zwei Zellexpositionsversuchen mit anschließendem Western-Blot erwies sich die lipophile Phase als die Fraktion, die weiterhin in der Lage ist, die 85 kd-Bande zu induzieren.

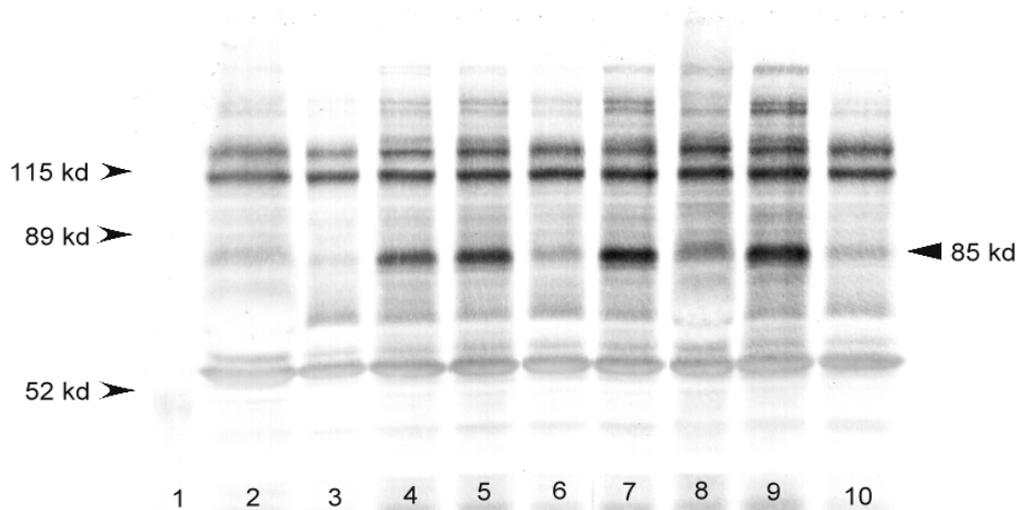


Abb. 39: Effekt der lipophilen und hydrophilen Extraktionsphasen in Zusammenhang mit der Bandenentstehung (mit Kontrollen)
 1: Proteinstandard; 2: Mediumkontrolle; 3: Ethanol (1‰ in PBS), 30-minütige Exposition; 4: Rotwein (1‰ in PBS), 30-minütige Exposition; 5: lipophile Extraktionsphase; 6: hydrophile Extraktionsphase; 7: lipophile + hydrophile Extraktionsphase; 8: Mediumkontrolle; 9: Rotwein (1‰ in PBS), 30-minütige Exposition; 10: Ethanol (1‰ in PBS), 30-minütige Exposition

5.2. Ausschüttelung von Rotweinproben der pH-Werte 1-9 in Ether

Die zugrundeliegende Überlegung hierbei ist, dass unpolare Substanzen in die organische Etherphase übergehen.

Die Bande zeigt sich in den Bahnen der Zellextrakte, die zuvor mit Etherausschüttelungen bei pH 3 und pH 6 inkubiert worden waren. Eine oder mehrere im Rotwein enthaltene, mit der Bandenentstehung in Zusammenhang stehende Substanzen liegen bei pH 3 und 6 offenbar in Neutralform vor.

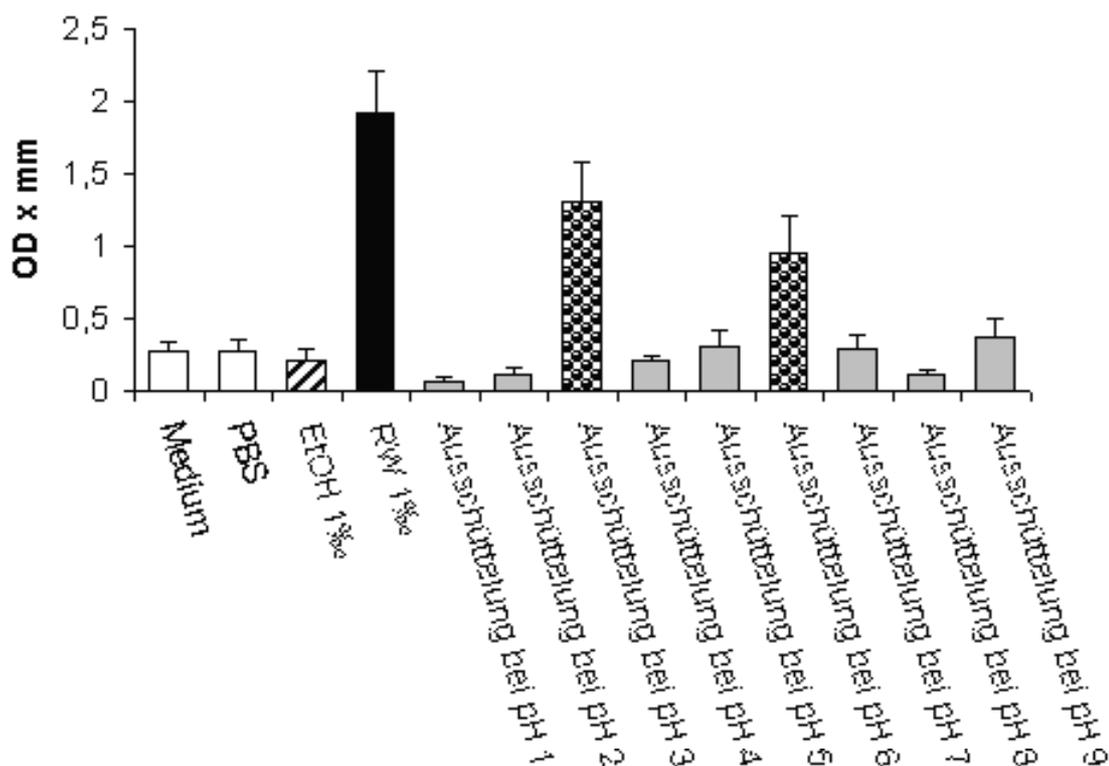


Abb. 40: Wirkungen von pH-abhängiger Etherausschüttelungen ("Rechallenge" von Endothelzell-Kulturen mit den einzelnen Fraktionen); (MW + SEM); n = 3
 PBS = Porbello's buffered saline, EtOH = Ethanol; RW = Rotwein

5.3. Reversed Phase-SiOH-TLC von Rotwein und wässriger Restphase der Etherausschüttelung bei pH 8

Diese orientierende Untersuchung von Rotwein und wässriger Restphase mit verschiedenen Detektionsreagentien sollte einen Überblick über eventuell darin vorhandene chemische Stoffklassen geben und so Hinweise auf in Frage kommende Einzelstoffe zulassen. Als beste Laufmittel in den Vorversuchen erwiesen sich Methanol/HCl:H₂O (1:1) und Methanol/HCl:H₂O (2:1). Es färbten sich Spots an, die phenolischen Gruppen, Flavonoiden, Carbonsäuren, sowie vom Lauf- und Färbverhalten Zuckern, Vanillinsäureverwandten und kleinen Carbonsäuren wie dem Referenzstoff Hydroxybenzoesäure zuzuordnen waren. Alle diese Stoffe gehören zu den als mögliche Effektoren vermuteten Substanzgruppen.

5.4. Untersuchung eines Effekts der Phytophenole Resveratrol, Quercetin und Myricetin

Getestet wurden jeweils drei Konzentrationen (8, 15 und 25 µM) im Zellversuch. Die Blots, ob im PBS- oder Plasmasystem, sind allesamt schwierig zu beurteilen: die entstehenden Banden sind allesamt schwach und unregelmäßig, es zeigen sich überall starke Hintergrundstörungen.

Es scheint sich für Resveratrol eine gleichbleibend schwache Bandenentwicklungstendenz zu zeigen, während es sich bei Quercetin eher um eine mit steigender Konzentration leicht ansteigende (bei 25 µM erscheint hier die Bande jeweils am relativ kräftigsten) und bei Myricetin eine leicht abfallende Wirkungskinetik (stärkste Bande bei 8 µM) zu handeln scheint. Die Banden gehen aber in keinem Fall über den Größenbereich der Kontrollen hinaus (- eine Versuchsreihe mit n = 2 ist

natürlich von eingeschränkter statistische Aussagekraft, und wurde in diesem Rahmen lediglich zur Abschätzung der Phytofenol-Effekte herangezogen).

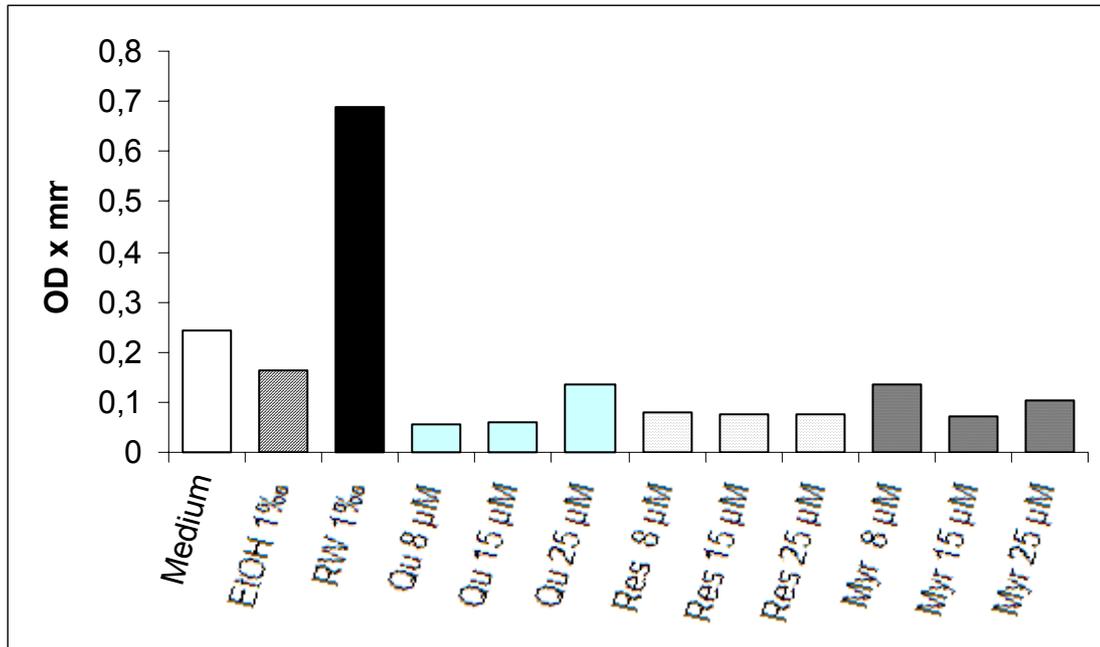


Abb. 41: Auswirkung verschiedener Verdünnungsstufen (8 µM, 15 µM und 25µM) der pflanzlichen Flavonoide Quercetin, Resveratrol und Myricetin auf den Bandeneffekt (mit Kontrollen, jeweils 30 minütige Endothelzell-Inkubation); nur MW angegeben (n = 2)
EtOH = Ethanol, RW = Rotwein, Qu = Quercetin, Res = Resveratrol, Myr = Myricetin

D. DISKUSSION

1. Methodendiskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Rotweininhaltsstoffe, mutmaßlich Polyphenole/Flavonoide, an der postulierten protektiven Wirkung von Rotwein in Bezug auf koronare Herzerkrankung einen Anteil haben. Dazu wurde mit Endothelzellen in einem *in vitro*-Modell im Hinblick auf Hinweise einer wie auch immer gearteten Zellreaktion experimentiert [4]. Beobachtet wurden zum einen morphologische Veränderungen im Aktin-Zytoskelett, zum anderen, auf molekularer Ebene, das Auftreten von tyrosinphosphorylierten Proteinen [241] und die Expression von mRNA des Chemokins MCP-1, das eng mit inflammatorischen Prozessen und Atheroskleroseentstehung [60; 298; 420] in Verbindung steht. Zusätzlich konnten mit Hilfe einfacher chemischer Auftrennungen und Chromatographieverfahren kombiniert mit Zellinkubationen orientierende Aussagen über mutmaßlich aktive Rotweininhaltsstoffe gemacht werden.

1.1. Der Wein

Bei der Bewertung von Ergebnissen in dieser Arbeit und auch von anderen Arbeiten, die sich mit den Auswirkungen von Rotweininhaltsstoffen beschäftigen, ist zu bedenken, dass Wein keine einheitliche, inerte Substanz ist, sondern vor allem in Bezug auf die Zusammensetzung seiner Inhaltsstoffe eine - selbst bei identischer Rebsorte und Reifungszeit - von Winzer zu Winzer und von Jahrgang zu Jahrgang, wahrscheinlich sogar von Faß zu Faß unterschiedliche und nicht reproduzierbare Zusammensetzung hat. Alle Versuche der vorliegenden Arbeit wurden (wenn nicht explizit anders erwähnt) mit Aliquots von drei Flaschen 'Château de Panigon (Cru Bourgeois)', 1995 Haut-Médoc (anteilige Traubensorten: Cabernet Sauvignon, Merlot und Petit Verdot) durchgeführt. Der Wein und die entsprechenden Flaschen selbst wurden im Zufallsverfahren ausgewählt, in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20° C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

1.2. *In vitro*-Versuche mit HUVEC

Für alle Versuche wurden humane Nabelvenen-Endothelzellen in einem *in vitro* Kulturmodell verwendet, d. h. es kamen keine Zellkulturen von Carotis- oder Koronarendothelzellen, keine Operationspräparate und keine Gefäßpräparate aus dem Tiermodell zum Einsatz. Es wäre möglich, dass solche Zellen, beispielsweise aufgrund anderer Enzymausstattung und physiologischer Ausgangssituation unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen veränderte Reaktionen zeigen. Auch wären Ergebnisse aus einem *ex vivo* Tiermodell womöglich aussagekräftiger, da sie direkteren Einblick über die Wirkungen unter den komplexen physiologischen Bedingungen gewähren würden. Schwierig ist im Nachhinein die Abschätzung, welche Wirkungen im Blutgefäß *in vivo* durch die *in vitro* beobachteten Ergebnisse ausgelöst oder verändert würden. Hier könnten eventuell auch vergleichende Versuche unter identischen Bedingungen am lebenden Gefäßpräparat von Interesse sein.

1.3. PBS-System

Bei der Zellbehandlung und -inkubation wurde ein künstliches quasi-physiologisches System, basierend auf PBS-Puffer verwendet. Nachdem damit reproduzierbare Ergebnisse erzielbar waren, wurden zusätzliche Versuche mit Humanplasma bzw. 10%igem humanem Plasma als Inkubationsmedium gestartet, um die Befunde auf das System 'menschlicher Körper' übertragen zu können. Aus der sich daraus ergebenden veränderten, nicht sauber reproduzierbaren Ergebnislage ist – wie

erwartet - zu folgern, dass im Körper komplexere Prozesse und Interaktionen ablaufen als in diesem vereinfachten System (z. B. Wegfall von Immunzellen, Serumproteinen und aktiven Enzymen) und dass somit die im PBS-System gewonnenen Ergebnisse nicht zwangsläufig auch unter den im Körper vorliegenden Bedingungen gelten müssen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchs- und Methodenaussagen zu bekommen, wurde bis auf die genannten Plasma-Versuche durchgehend im PBS-System gearbeitet.

1.4. Die Methoden

1.4.1. Phalloidin-Rhodamin-Färbung

Hierbei handelt es sich um eine zytologische Färbetechnik, die Aussagen über die Konformation des Aktin-Anteils zulässt und eine phototechnische Reproduktion der Mikroskopbefunde erlaubt. Aussagen über andere Anteile des Zytoskeletts sind nicht möglich.

1.4.2. Phosphotyrosin-Westernblot

- zum Blocken der Nitrocelluloseacetatfolie benutzten wir aufgrund besserer Ergebnisse statt BSA fertige Blocking-Milch, und behielten dies aus Gründen der Konsistenz auch bei, als wir bei den Plasma-Versuchen stärkeres Hintergrundrauschen und sehr schlechte Reproduzierbarkeit feststellen mussten;
- nach Zellernte bzw. vor dem Auftrag auf das Laufgel wurde keine Proteingehaltsbestimmung der Proben (z. B. nach Bradford) durchgeführt, sondern vereinfachend davon ausgegangen, dass bei Aussaat vergleichbarer Zellmengen und identischer Behandlung bis zur Konfluenz vergleichbare Mengen an Zellen und Protein vorliegen;
- da von den verwendeten Primärantikörpern der Antikörperklon p99 (Santa Cruz) bessere Ergebnisse bei der Bandenfärbung lieferte, wurde er etwa ab der Halbzzeit der Westernblotversuche anstatt der vorher benutzten Kombination der Klone py 20B und 4G10 verwendet.
- die Blots der Versuche im Plasmasystem waren sehr schwierig zu beurteilen. Die auftretenden Banden zeigten eine nicht reproduzierbare Verteilung, die einzelnen Blotbilder wiesen zudem sehr starke Hintergrundstörungen auf. Es wäre interessant in einer Nachfolgearbeit zu überprüfen, ob diese Störungen beispielsweise durch Einsatz anderer Blocking-Systeme oder Antikörper-Klon-Kombinationen zu verringern wären.

1.4.3. Northern Blot

- Bei den Northern Blots wurde die im Labor etablierte Hybridisierungsmethode mit Isotopeneinbau angewandt. Dennoch traten mehrmals Schwierigkeiten bei den Hybridisierungsschritten auf, so dass von mehreren Versuchsansätzen nur vier ausgewertet werden konnten.
- Bei einem vorgeschalteten 'real-time PCR'-Schritt hätten sich eventuell noch exaktere quantitative Aussagen bezüglich des mRNA-Gehalts der untersuchten Samples treffen lassen. Ein solcher Schritt wäre aber von Logistik und Kosten zur Zeit der Durchführung der Versuche um einiges aufwändiger gewesen.

1.4.4. Chromatographie

- Bei Laufbedingungen in der Sephadex-Säule mit Aceton als Eluator ergaben sich Probleme, da sowohl die Matrixsubstanz als auch die Plastiksäule stark angegriffen wurde und somit eine saubere Auftrennung nicht zu gewährleisten war. Statt dessen wurde zur Methode der C18-Fraktionierung übergegangen.
- Die durchgeführten chromatographischen Untersuchungen sind Basistechniken. Wir ermittelten in Versuchsreihen lediglich die für die Fragestellungen günstigsten

Laufmittel und Färbereagentien. Weiterführende Untersuchungen mittels HPLC konnten aus technischen Gründen nicht mehr wie geplant durchgeführt werden.

1.5. Blutabnahme und Plasmagewinnung

Zur Gewinnung des verwendeten Blutplasmas wurde 5 freiwilligen Spendern und 17 Patienten einer internistischen Allgemeinstation nach deren ausdrücklichen mündlichen Zustimmung eine Blutprobe durch Punktion der Cubitalvene im Rahmen der durchgeführten Tagesroutine entnommen (handelsübliche Citrat-Gerinungs-Monovette®). Die Blutproben wurde anschließend verarbeitet, gepoolt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Während die 5 freiwilligen Spender gesund waren und eine Alkohol- und Medikamenteneinnahme in den letzten Wochen vor Blutabnahme ausschlossen, greift dieses Kriterium für die Krankenhauspatienten nicht. Diese wurden aber miteinbezogen, um eine ausreichende Menge an Blutplasma für die geplanten Versuche zu erhalten. Dadurch entstehende Unwägbarkeiten in Bezug auf enthaltene Medikamente oder Interaktionen könnten ein Grund für die schwer zu reproduzierenden Ergebnisse der Plasma-Samples sein. Eine unzureichende Entfernung der Serumproteine führt beispielsweise bei der klinisch-chemischen Routineelektrophorese von Hämoglobin zur Darstellung von Artefakt-Banden anodenwärts oder anoden- und kathodenwärts der Referenzbanden [426]. Gleichsinniges ist daher auch für die Elektrophorese anderer Proteine im Serum als möglich anzunehmen.

Zusätzlich wurde bei den Patientenproben keine Hitzeinaktivierung vor Pooling bzw. Aliquotierung durchgeführt, was unter Umständen eine Alteration der Zellen durch Complementfaktoren oder Immunkomplexe bzw. nicht definierbare enzymatische Reaktionen in den einzelnen Versuchsansätzen zur Folge haben könnte. Ebenso ist eine mögliche Schädigung der Endothelzellen durch so eingebrachte Fremdkörper, Immunzellen oder pharmakologische Interaktionen nicht gänzlich auszuschließen.

1.6. Versuchssubstanzen und Probenbehandlung

Die in den Versuche verwendeten Weiß- und Rotweine waren zufällig ausgewählte Produkte unterschiedlicher Rebsorten und Anbaugebiete vom Weinhändler, Supermarkt bzw. vom Winzer (untere und mittlere Preisklasse); bei den übrigen Substanzen (Bier, roter Traubensaft) handelte es sich ebenfalls um abgepackte Produkte aus dem Supermarkt. Der grüne Tee (Standardprodukt im Beutel) wurde vor dem Versuch zubereitet (sechs Minuten Ziehzeit) und dann auf Zimmertemperatur abgekühlt eingesetzt bzw. bei -18°C eingefroren. Bei Festlegung der Promill-Verdünnungsstufen wurden physiologisch verträgliche Alkoholkonzentrationen angestrebt.

1.7. Statistik

Die Werte wurden in der Regel als Mittelwert-Säulendiagramme (MW) angezeigt, die Abweichungen innerhalb der einzelnen Wertegruppen wurden als Standard Error of Means ausgewiesen. Statistische Signifikanz wurde, wenn angegeben, für $p \leq 0,05$ angenommen (verbundener t-Test bzw. Wilcoxon-Test).

2. Ergebnisdiskussion

2.1. Ausbildung von Stressfasern

Während bei unbehandelten Endothelzellen lediglich unauffällige Zellmembranen und Zytoskelette zu sehen sind, erscheinen nach Rotweinexposition sogenannte Stressfasern, Roughes und Spikes in den Zellen. Dies zeigt eine deutliche Reaktion auf den Kontakt mit Rotwein-Pufferlösung an und steht wahrscheinlich mit einer möglichen reaktiven Konformationsänderung der Zellen in Zusammenhang, was wiederum mit dem Anspringen einer Vielzahl verschiedener Signaltransduktionswege in den Zellen in Zusammenhang steht [69; 75; 76]. Unklar bleibt der Grund dieser zellmorphologischen Veränderungen. Diese wurden allerdings nur im PBS-System untersucht, daher ist keine Aussage möglich, ob es sich wirklich um eine physiologische, rotweininduzierte Endothelreaktion handelt oder ob sie in den *in vitro* Versuchsbedingungen zu suchen ist. Dazu wären Aussagen aus einem *ex vivo* Modell sicherlich aufschlussreich.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse schwerlich zu beurteilen, ob die beobachtete morphologische Veränderung der Endothelzellen und damit eine wahrscheinliche Konformationsänderung der Oberfläche im Gefäßlumen als eine Schutzreaktion, eventuell in Verbindung mit einer Gefäßabdichtung oder aber als Reaktion zur Steigerung der Durchlässigkeit oder erhöhten Reaktivität der Intima zu interpretieren sind. Möglich wäre allerdings auch die Ausbildung von Stressfasern als Reaktion der *in vitro* exponierten Zellen auf eine direkte toxische Wirkung der applizierten Versuchslösungen.

2.2. Die 85 kd Phosphotyrosinbande

Nach Exposition von gesunden konfluenten Endothelien mit Rotweinelutionen von 0,5‰, 1‰ und 2,5‰ in PBS wird im Westernblot-Assay eine spezifische Phosphotyrosin-Bande sichtbar. Das bedeutet, es kommt zur Entstehung eines Proteins, das durch Rotweinkontakt der Zellen an mindestens einem Tyrosinrest phosphoryliert und dadurch vermutlich aktiviert wird. Nach Auswertung der Banden im Vergleich mit mitgelaufenen 'high range- Proteinstandards' ergab sich ein Molekulargewicht von rund 85 kd für das beobachtete Protein. Bei einem geringen Prozentsatz der Blots trat zusätzlich zur 85 kd-Bande eine schmale Bande im 210 kd-Bereich und/oder eine schmale Doppelbande bei etwa 190 kd auf. Möglicherweise könnte es sich hierbei um unprozessierte Prekursoren handeln. 'p85' könnte aber auch ein Degradationsprodukt besagter Proteine mit höherem Molekulargewicht sein. Gegen diese Thesen spricht allerdings, dass die beobachteten schwereren Banden nicht regelmäßig und bei allen Blots nachzuweisen waren.

Überlegungen zur Identität der gefundenen 85 kd-Phosphotyrosinbande:

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI₃K), insbesondere die Klasse 1A PI 3-Kinase ein Heterodimer aus einer 110 und einer 85 kd-Proteinuntereinheit darstellen [192, 466]. Dieses 85 kd Protein ist die regulatorische Untereinheit, die über die Bindung von tyrosinphosphorylierten Proteinen an seine SH2-Domäne für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist [231; 431; 441]. Da die PI₃K mittlerweile als wichtiges intrazelluläres Signal 'strom-aufwärts' wichtiger Prozesse wie Insulin-stimulierter Glucoseaufnahme [179], Membran-Ruffling [456], Superoxidproduktion [16] aber auch Zellteilung, Apoptose und Aktin-Reorganisation [65] angesehen wird, ist es durchaus denkbar, dass die im Versuch beobachtete 85 kd-Bande mit der an ihrer SH2-Domäne tyrosinphosphorylierten p85 Untereinheit der PI₃K identisch ist. Auch das gemeinsame Auftreten mit der Ausbildung von Aktin-Stressfasern würde für einen solchen Zusammenhang

sprechen. Der HMG CoA-Reduktaseinhibitor Lovastatin scheint einen hemmenden Einfluss auf die Stimulation der PI₃K-Aktivität im allgemeinen und speziell auf die Anlagerung der p85 Untereinheit an tyrosinphosphorylierte PDGF-Rezeptoren zu haben [275], ebenso wie der Einsatz von Stoffklassen, die wie ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Inhibitoren durch Modulation verschiedener Signaltransduktionsprozesse Angiotensin II-vermittelte Prozesse beeinflussen kann, die mit Bluthochdruck und Atherosklerose in Verbindung stehen. Es wäre daher interessant, in weiterführenden Versuchsreihen auch diese Spur pharmakologisch zu überprüfen. Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der p85-Untereinheit der IP₃K in diesem Zusammenhang könnte sein, dass die experimentelle Zugabe von Angiotensin II die Tyrosinphosphorylierung dieser p85-Untereinheit und folglich die PI₃K-Aktivität in Schweinekoronargefäßen [376], nicht aber die DNA-Synthese [380] zu stimulieren vermag. Es konnte aber ebenso gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit 50 µM Resveratrol diese Tyrosinphosphorylierung der p85-Untereinheit, ebenso wie eine Vorbehandlung mit dem spezifischen IP₃K-Inhibitor Wortmannin, *in vitro* deutlich einschränken kann [170]. Dies läßt immerhin vermuten, dass ein identifizierter Rotweinbestandteil - Resveratrol - als hemmendes Agens über den PI₃K-Signalweg Einfluß auf Zellreaktionen zu nehmen vermag, widerspricht letztlich aber den in der vorliegenden Arbeit gemachten Befunden, dass nach Rotwein-Exposition eine 85 kD-Proteinbande verstärkt auftritt, die auch durch die Zugabe von Wortmannin (siehe weiter unten) nicht wesentlich gehemmt werden konnte. Hier hätte im vorliegenden Versuchsaufbau vielleicht eine weiterer, selektiver Inkubationsschritt mit einem der drei Test-Flavonole (Resveratrol/Quercetin/Myricetin) nach erfolgter Rotwein-Exposition neue Erkenntnisse bringen können.

Ein weiterer möglicher Kandidat für die beobachtete Bande wäre ein p85-Fragment der Poly (ADP-Ribose) Polymerase (*PARP*) [304; 400]. Dieses Enzym, das als „nick-Sensor“ im Rahmen von DNA-Reparaturmechanismen fungiert, wird im Rahmen der Apoptose schon in der Frühphase [51] von den Proteasen Caspase-3 und -7 [159] in ein p24-Fragment, welches die DNA-Bindungsstelle trägt und ein katalytisch wirksames p85-Fragment gespalten, das auch kurz darauf im Cytosol nachweisbar ist [400]. Die Zellen könnten durch die *in vitro* Rotwein-Stimulation unter PBS-Bedingungen möglicherweise stärker geschädigt werden als *a priori* angenommen und dann absterben. Somit wäre auch ein Nachweis dieses *PARP*-Fragments denkbar. Es fanden sich in der Literatur allerdings keine Hinweise auf eine Tyrosinphosphorylierung dieses Proteins, was die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um das fragliche bandenerzeugende Protein handeln könnte, senkt.

Ein weiterer Literaturhinweis auf das Vorhandensein einer p85-Einheit fand sich in einer Arbeit von Blomberg und Mitarbeitern [35]. Hier wird von einem 85000 dalton-Polypeptid (‘P85’) mit tyrosinspezifischer Protein-Kinase-Aktivität berichtet, das in Zellen exprimiert wird, die nichtproduktiv mit einer Variante des Snyder-Theilen-Stammes des Katzen-Sarkom-Virus (FeSV) transformiert wurden. Dieses Proteins weist eine einzelne Tyrosin-Akzeptor-Region auf, die wohl für die Enzymaktivität verantwortlich ist. Diese Akzeptorregion liegt in den transformierten Zellen phosphoryliert vor (da keine weiteren Merkmale als die tyrosinspezifische Tyrosin-Kinase-Aktivität des Proteins beschrieben sind, ist diese Publikation bei der Lösungsfindung jedoch nicht weiter hilfreich).

Das Auftreten der p85-Bande ist auch durch anschließende Spülbehandlung mit 37° C warmem PBS im Überschuss (‘Auswaschversuch’) in einem Zeitbereich von 1 Sekunde bis zu 30 Minuten nicht wesentlich abzuschwächen. Dies lässt schließen, dass eine einmalige anfängliche Induktion der Zellen eine unumkehrbare Re-

aktion im Rahmen einer Signaltransduktionskette zur Folge hat, und dass außerdem weder das mutmaßliche Agens noch das tyrosinphosphorylierte Protein von der Zelle abdiffundieren, ausgewaschen, ausgeschieden oder sehr schnell verstoffwechselt werden. Lediglich bei längerer Einwirkzeit des Puffers (> 55 Minuten) wird die Bande stetig schwächer, ein Effekt, der mit einem Abebben des ausgelösten Signaltransduktionsprozesses, beginnender Zellirritation durch Depletion oder auch mit einem nach dieser Einwirkzeit auftretenden Verdünnungseffekt ("Spülartefakt") zu erklären sein kann.

Die Bandenentstehung zeigt eindeutige Zeitabhängigkeit. Eine erste deutliche Zellreaktion tritt nach etwa 15 Minuten ein. Der Zeitbereich der stärksten Bandendichte liegt zwischen 15 und 45 Minuten Zellexposition, wobei die Einwirkzeit bei unseren Versuchsreihen 60 Minuten nicht überschritt. Das tyrosinphosphorylierte Protein, kann bei Inkubation mit 0,5%iger, 1%iger und 2,5%iger Rotweinslösung beobachtet werden, scheint daher von den eingesetzten Verdünnungskonzentrationen unabhängig zu sein. Der Bandeneffekt tritt deutlich und reproduzierbar bei Inkubation mit Rotwein unterschiedlicher Anbaugeländer und Rebsorten auf, für Weißwein ist er jedoch sehr stark abgeschwächt und bewegt sich etwa auf Höhe der Werte für Medium- und PBS-Kontrollen. Auch die Kontrollen Ethanol, dunkles Bier, grüner Tee sowie die pharmakologische Vektorsubstanz DMSO konnten die Bande nicht in vergleichbarem Maße induzieren. Die deutlichste Bande unter den Kontrollsubstanzen erzeugte mit roter Traubensaft (1%ige Verdünnung in PBS), der ja auch aus ganzen Trauben gepresst, dann aber gefiltert wird. Es sind daher Stoffe für diese Zellreaktion verantwortlich, die weder in den Kontrollen noch im Weißwein vorkommen, also vermutlich aufgrund der Behandlung des Rotweins bei Produktion und Lagerung entstehen oder sich anreichern. Die Rotwein-Maische wird mit Schalen, Kernen und Stielen gekeltert und angesetzt, daher treten während der längeren Verweilzeit mehr organische Verbindungen/sekundäre Pflanzenstoffe über. Auch bei längerer Holzfaßreifung können Verbindungen herausgelöst werden und in den Wein übertreten. Es ist daher anzunehmen, dass einer oder mehrere dieser unbekannteren Stoffe die beobachteten Prozesse induziert.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die gleiche Reaktion nicht nur im artifiziellen System auszulösen ist, sondern auch unter 'pseudo-physiologischen' Bedingungen. Daher wurden 10%iges humanes Plasma (verdünnt mit PBS) und humanes Vollplasma anstelle von PBS als Lösungspuffer für die Samples eingesetzt. Das Blutplasma wurde aus den Blutproben von 21 freiwilligen Spendern gepoolt. Die in diesen Versuchsansätzen gewonnenen Blots lassen aber keine eindeutigen Aussagen zu. Die 85 kd-Bande erscheint entweder viel schwächer oder auch ohne die deutliche und reproduzierbare Zeit- oder Konzentrationsabhängigkeit des PBS-Systems. Erschwert wird die Beurteilung dieser Versuche zusätzlich durch insgesamt inkohärentere und unruhigere Blots mit starken Hintergrundstörungen, was möglicherweise auf die Vielzahl zusätzlich vorhandener Proteine zurückzuführen sein kann.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass *in vivo*, bei sicher komplexeren Bedingungen als im verwendeten Humanplasma-System, noch andere Mechanismen und Reaktionen zum Tragen kommen. Möglicherweise puffern im Blut vorhandene Verbindungen die Wirkung der mutmaßlich proteininduzierenden Stoffe durch Bindung oder andere Interaktion ab oder beeinflussen deren Wirkungen hemmend. Auch eine Modulation durch direkte Interaktion mit Endothelzellen selbst und somit Einfluß auf deren Reaktion ist denkbar. Um zu dieser Thematik mehr Klarheit zu er-

langen, sind weitere Versuchsreihen, eventuell ergänzt durch *ex vivo*-Trinkversuche oder Versuche im Tiermodell notwendig.

Als nächstes wurden 10 biologische Hemmstoffe (Genistein, Herbimicin A, Tyrostatin A23, PP1, C3-Transferase, Wortmannin, PD 98059, Y-27632, EGTA und BAPTA/AM) eingesetzt, die durch ihre spezifischen Angriffsorte in Signaltransduktionsprozessen indirekt einen möglichen Hinweis auf die Identität der beobachteten 85 kd Phosphotyrosinbande liefern sollten. Die Entstehung der 85 kd-Bande wird durch Zugabe von Herbimicin A, PP1 sowie und BAPTA/AM gehemmt oder zumindest beeinträchtigt. Da erstens die beiden wirksamsten Hemmstoffe, Herbimicin A und PP1, beide zur Gruppe der src-Kinase-Inhibitoren gehören, könnte das gefundene Phosphotyrosin-Protein also eine src-Kinase oder ein zur src-Kinasen-Kaskade gehörendes Protein sein. Dieser Befund spricht eher für die Hypothese, dass es sich hierbei um die 85 kd-Untereinheit der Klasse 1A IP₃Kinase (IP₃K), die ja auch eine src-Homology 2-Domäne trägt, handelt [231; 404]. Gegen diese These sprechen allerdings Arbeiten die berichten, dass die Verbindung Wortmannin, die in den durchgeführten Versuchen keine Wirkung zeigte, ein potenter Inhibitor der IP₃K-Aktivierung sein soll [431; 456]. Allerdings muss die Hemmung der IP₃K-Aktivität nicht zwangsläufig auch einen Nachweis von tyrosinphosphorylierten Untereinheiten der IP₃K völlig verhindern. Vielleicht waren aber auch die hier eingesetzte Wortmanninkonzentration und/oder Präinkubationszeit für diese spezielle Fragestellung zu niedrig angesetzt. Da aber auch der intrazelluläre Calciumchelator BAPTA/AM einen hemmenden Einfluss zeigt, wird das Auftreten der Bande von modulierter intrazellulärer Calciumfreisetzung positiv beeinflusst, d.h. das sukzessive Auftreten eines bestimmten, an mindestens einem Tyrosinrest phosphorylierten Proteins steht ebenfalls sehr wahrscheinlich mit einer - vermutlich im Rahmen weiterer übermittelter Signaltransduktionsprozesse - entstehenden Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Zusammenhang.

Eine genauere Aussage über Wesen und Funktion des gefundenen Proteins, bzw. die Klärung der Spekulation, ob es sich eventuell doch um die p85-Untereinheit der heterodimeren Klasse 1A IP₃K handelt, ist letztendlich nur durch Sequenzieren des Aminosäurebauplans möglich. Dann wäre auch eine einfachere quantitative Proteinmengen-Bestimmung in Zell-Lysaten z. B. mittels ELISA möglich. Das hier *in vitro* beobachtete Anschalten eines Signaltransduktionsweges mit wahrscheinlicher Beteiligung von src-Kinasen bei rotweinbehandelten Endothelzellen spricht auf den ersten Blick allerdings nicht für die zu Versuchsbeginn angenommene protektive Einflussnahme auf atherosklerotische Prozesse *via* Endothel. Es bleibt ungeklärt, ob das in Frage kommende Protein selbst eine src-Kinase ist oder im Rahmen einer Signalkaskade von der src-Tyr-Kinase phosphoryliert und somit in seiner Aktivität verändert wird.

Zusammenfassung:

Eine 85 kD-Phosphotyrosinbande tritt als Zeichen für intrazelluläre Reaktionen der Endothelzellen auf gewisse Stoffe nach Gabe von 0,5, 1 und 2,5 %iger Rotwein-in-PBS-Pufferlösung auf, Konzentrationen also, wie sie nach Resorption im Darm ebenfalls im Körper auftreten könnten. Diese Bande tritt bei verschiedenen, im Zufallsprinzip ausgewählten Rotweinen auf. Da sie so gut wie nicht bei Ethanol- und Weißwein-Pufferlösungen gleicher Konzentration auftritt, kann zum einen die Hypothese der alkoholischen Komponente als alleinige Ursache der Reaktion verworfen werden, zum anderen kann man postulieren, dass Substanzen beteiligt sind, die zwar im roten, nicht aber im weißen Wein enthalten sind (Inhaltsstoffe von Kernen oder Traubenschalen, die beim Pressen/Keltern in Lösung gehen). Bei den im PBS-

Puffersystem getesteten Kontrollsubstanzen trat eine schwache 85 kd-Bande nur bei Traubensaft (1‰ -Lösung) auf, bei Zugabe von dunklem Bier, Grüntee und DMSO, jeweils 1‰ -Lösung, war die Reaktion negativ.

Das Auftreten der Bande ist von der Einwirkzeit des Rotweins auf die Zellen abhängig, die erste schwache Bande als Zeichen einer Zellreaktion erscheint nach knapp einer Minute, ein Maximum der Zellreaktion ist nach 30 bis 60 Minuten zu sehen. Die eingesetzten Rotweinkonzentration (ob 0,5‰ige, 1‰ige oder 2,5 ‰ige Rotwein-Pufferlösung) waren hierbei zweitrangig.

Für die Versuche mit 10%igem Plasma und Vollplasma sehen die Ergebnisse anders aus: hier lässt sich keine eindeutige Wirkung zuschreiben. Das Auftreten der Banden ist unregelmäßig und scheint auch nicht reproduzierbar vom Rotwein abzuhängen. Eine Erklärungsmöglichkeit für diesen Sachverhalt wäre, dass Stoffe im Plasma die mutmaßlichen Rotweinmediatoren binden oder deren Wirkung auf die Zellen hemmend beeinflussen oder direkt die Zellreaktion mit Phosphorylierung der Tyrosinreste in Signaltransduktionsproteinen - und damit die erwartete Bandenbildung bei 85 kd - modulieren. Die Blots waren schwierig zu interpretieren, und erschienen, wohl durch die zusätzliche Vielzahl von Plasmaproteinen als Störgröße, mit starken Hintergrundeffekten und inkonsistenter, schwächer und von der Rotweinexposition unabhängiger Veränderungen im Bandenmuster.

2.3. Expression von mRNA des Chemokins MCP-1

Die Aktivierung des immediate early genes MCP-1 als Antwort der Endothelzellen sowohl nach Behandlung mit Rotwein und Ethanol als auch mit TNF bzw. PMA und anschließend Rotwein-PBS-Lösung war, da ja von einem mutmaßlich primär protektiven Effekt ausgegangen wurde, eher überraschend. Das proinflammatorische CC-Chemokin MCP-1 wird - unter anderem - von Endothelzellen an deren Oberfläche exprimiert, um Monozyten anzulocken und nach 'Rolling' und Adhäsion deren Einwanderung in subendotheliale Zonen und somit eine immunologische Antwort und die Perpetuation eines Entzündungsvorganges zu steuern.

Die mit den Stimulantien vorbehandelten Zellen zeigten nur bei PMA eine höhere Expression als die Mediumkontrolle, hielten sich aber in der ungefähren Größenordnung von Rotwein und Ethanol. Zwar scheint Rotwein nach vorhergegangener PMA-Stimulation die mRNA-Expression leicht zu hemmen, es ist allerdings erstaunlich, dass sich unter Rotweinkubation nach Vorbehandlung mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF ein Trend zu verstärkter MCP-1- Expression zeigt (es muss bei diesen Beobachtungen jedoch in Betracht gezogen werden, dass die Anzahl von n = 4 auswertbaren Versuchen statistisch von relativ schwacher Aussagekraft ist). Die hier gemachte *in vitro* Beobachtung 'Aktivierung von MCP-1' sowohl durch Rotwein und Ethanol, als auch durch Kombination von Rotwein mit TNF bzw. PMA lässt nicht auf einen primär atheroprotektiven Effekt einer Rotwein-PBS-Lösung zumindest im Hinblick auf entzündliches Geschehen und Makrophageneinwanderung, sondern eher auf eine Schutz- oder Alarmantwort schließen – entweder auf die möglicherweise für die Zellen toxisch wirkende Inkubationslösung, oder einen durch den Rotwein angestoßenen, die Zellen beeinflussenden Mechanismus.

2.4. Chemische Auftrennungen und Chromatographie

2.4.1. Säulenchromatographie

In der Literatur gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit den Wirkungen von Rotwein auf Endothelien beschäftigen. Daher gibt es auch so gut wie keine Aussagen über enthaltene Substanzen, die auf Endothelzellen Einfluss nehmen können bzw. die für die während dieser Arbeit aufgetretene Fragestellung 'Induktion der 85 kd-Bande' in Frage kommen können. Um hierzu orientierende Aussagen treffen zu können, war es nötig, Rotwein mit analytischen Trennverfahren zu fraktionieren

und dann zu untersuchen, in welchen Fraktionen die zellinduktive Aktivität wiederzufinden ist.

Die Lipophilität von Verbindungen kann je nach zugrundeliegender chemischer Struktur in diesen Trennsystemen vom pH-Wert des eingesetzten Elutionsmittels abhängig sein. Es gibt neben dauerhaft lipophilen Verbindungen wie den Kohlenwasserstoffen und permanent hydrophilen Substanzen wie Zuckern und Salzen auch solche, die abhängig vom pH der umgebenden Lösung protoniert oder deprotoniert vorliegen können und so auch ihre Lipophilität ändern. Der untersuchte Rotwein hatte einen pH von knapp über 4. Bei diesem pH sind ambivalente funktionelle Gruppen wie Carboxyl-Gruppen organischer Säuren oder OH-Gruppen von phenolischen Verbindungen in der Regel protoniert. Moleküle, die solche Verbindungen tragen, sind somit bei pH 4 eher lipophil und binden an die C18-Ketten der Kartusche. Bei pH 7 ('physiologisches System') lägen dieselben Substanzen wahrscheinlich deprotoniert und somit aufgrund ihrer Ladung hydrophil vor. Bei den gesuchten mutmaßlichen Effektoren könnte es sich auch um ähnlich aktive funktionelle Gruppen handeln, die sich beispielsweise durch eine unterschiedliche Art und Anzahl gebundener Zucker- oder Aminosäurereste in Polarität und Trennverhalten auf der Säule unterscheiden.

Eine Möglichkeit zur initialen Auftrennung ist die Fraktionierung nach Polarität der untersuchten Stoffe an einer C18-Kartusche. Dies ermöglicht eine grobe Unterteilung der Rotweininhaltsstoffe in hydrophile und hydrophobe Verbindungen. Das Funktionsprinzip einer solchen Kartusche ist eine Kieselgelmatrix, an die eine große Zahl von Kohlenwasserstoffketten mit 18 Kohlenstoffatomen chemisch stabil gebunden werden. Die so entstandene C18-Matrix erhält einen deutlich lipophilen Charakter. Gibt man nun wässrige Lösungen wie Rotwein auf eine solche Kartusche, werden lipophile Substanzen an der Matrix zurückgehalten, während eher hydrophile Verbindungen (z. B. kleine Carbonsäuren wie Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure u.a.) mit einem wässrigen Eluenten aus der Kartusche ausgespült werden. Im anschließenden Zellversuch erwies sich die lipophile Phase als die Fraktion, die weiterhin in der Lage ist, die 85 kd-Bande zu induzieren. Dies deutet darauf hin, dass der (beziehungsweise ein) Effektor unter den Rotweininhaltsstoffen im leicht sauren Milieu des Weins (etwa pH 4,2, Selbstmessung) lipophil ist, also in elektrisch neutraler Form vorliegt. Die im Wein enthaltenen Zucker und die kleinen Carbonsäuren kommen - von dieser Seite betrachtet - für den beobachteten Effekt nicht in Frage.

Statt in einem zweiten Schritt den pH-Wert zu verändern, um beispielsweise phenolische, nicht aber lipophile Substanzen aus der Säule zu eluieren, wurde der Weg gewählt, nach einer Stickstofftrocknung die Kartusche mit dem stark lipophilen Lösungsmittel Aceton zu eluieren, da die weitere Bearbeitung und eine eventuelle spätere Strukturaufklärung leichter durchzuführen sind, wenn die untersuchten Verbindungen nicht in wässriger sondern organischer Lösung vorliegen [465]. Das Aceton wurde anschließend eingedampft und die Probe mit 10 % Ethanol aufgenommen. Sowohl mit lipophiler als auch mit wässriger Fraktion wurden erste Versuche zum Effekt auf Endothelzellen gemacht.

2.4.2. pH-abhängige Ether-Ausschüttelungen

Mit der C18-Kartusche erhielten wir jeweils 9 ml wässrige (in PBS) und lipophile Fraktion. Die lipophile Fraktion wurde mit gleicher Menge Ether ausgeschüttelt, die wässrige Phase in jedem Schritt abgelassen, die Etherphase gesammelt (dreimalige Wiederholung). Die Ansätze werden dazu auf pH 8 und auf pH 1 (c. HCl) gebracht; ein dritter Ansatz wurde c. NaOH auf pH 14 eingestellt (30 min bei 40°C), anschließend auf pH 1 gebracht und ebenfalls ausgeschüttelt. Dadurch sollte bei glykosidischen Verbindungen der hydrophile Zuckeranteil abgespalten werden, das

verbleibende, eventuell lipophile Aglykon kann dann im Ether extrahiert werden. Die so erhaltenen organischen Etherphasen werden über Nacht bei 7°C über Na₂SO₄ getrocknet. Die Proben wurden im Anschluß eingedampft und mit Aceton aufgenommen. Ein Aliquot von 20 µl wird abpipettiert, im Rotationsverdampfer eingetrocknet und mit 10 ml 10% Ethanol aufgenommen. Gewonnen wurden durch die Etherausschüttelung der lipophilen Phase bei pH 8 eine sogenannte Etherphase und eine wässrige Restphase (etwa pH 7). Letztere konnte weiterhin die Bande bei Endothelzellen induzieren, d. h. der oder die in Frage kommenden Rotweininhaltsstoffe verhalten sich hydrophil. Wären sie elektrisch neutral bzw. unpolar, hätten sie sich im Ether gelöst.

2.4.3. Reversed Phase-Dünnschicht-Chromatographie (RPTLC)

Um diese hydrophilen Stoffe etwas genauer zu charakterisieren wurden Reversed Phase-SiOH-Dünnschicht-Chromatographien von Rotwein und der wässrigen Restphase der Etherausschüttelung bei pH 8 durchgeführt. Diese orientierende Untersuchung von Rotwein und wässriger Restphase mit verschiedenen Detektionsreagentien sollte einen Überblick über vorhandene chemische Stoffklassen geben und möglicherweise Hinweise auf in Frage kommende Einzelstoffe zulassen. Als praktikabelste aus einer Vielzahl Laufmittel erwiesen sich nach einer Erprobungsphase Methanol/HCl : H₂O (1:1) und Methanol/HCl : H₂O (2:1).

Es färbten sich Spots an, die phenolischen Gruppen, Flavonoiden, Carbonsäuren, sowie weiterhin - von Lauf- und Färbeverhalten - Zuckern, Vanillinsäurederivaten und kleinen Carbonsäuren wie dem Referenzstoff Hydroxybenzoesäure zuzuordnen waren.

2.4.4. pH-abhängige Ausschüttelungen

Als letzter Schritt im Rahmen der Analyseversuche wurden Ausschüttelungen von Rotweinproben der pH-Werte 1-9 in Ether vorgenommen. Der Grundprinzip ist, dass nur elektrisch neutrale Stoffe in die Etherphase übergehen. Die Weinproben wurden auf den jeweiligen Test-pH-Wert eingestellt und in Ether ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen und Etherphasen wurden gesammelt, letztere über Nacht getrocknet, eingedampft, in Aceton aufgenommen, ein 20 µl Aliquot entnommen, im Rotationsverdampfer eingetrocknet und mit 10 ml 10% Ethanol aufgenommen. Im anschließenden Zellversuch eingesetzt wurden sowohl die Etherphasenextrakte als auch die wässrigen Phasen. Die Bande zeigte sich bei den Bahnen der wässrigen Phasen der Ausschüttelungen bei pH 3 und 6. Eine oder mehrere im Rotwein enthaltene, für die Bandenentstehung wichtige Substanzen scheinen also bei pH 3 und 6 in Neutralform vorzuliegen. Die Intensität der Bandendicke liegt bei pH 3 zu pH 6 etwa im Verhältnis 2/3 zu 1/3. Eine mögliche, wenn auch hypothetische Erklärung für die etwas dicker erscheinende Bande im Bereich von pH 3 wäre, dass bei pH 3 entweder mehr wirksame Moleküle verschiedener Stoffgruppen neutral vorliegen als in höheren pH-Bereichen, oder die Moleküle nur eines, etwas höher konzentrierten Stoffes gerade in diesem pH-Bereich elektroneutral sind.

2.4.5. Zusammenfassung

Die orientierenden Beobachtungen bezüglich des chemischen Verhaltens unter verschiedenen pH- und Löslichkeitsbedingungen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den mutmaßlich bandenerzeugenden Rotweininhaltsstoffen um zwei stoffchemisch unterschiedliche Substanzgruppen handelt.

Als erste Gruppe kommen Carbonsäuren bzw. Phenolcarbonsäuren in Frage, deren pK_a-Wert oftmals um 4,75 liegt. Sie reagieren in stärker sauren pH-Bereichen lipophil, da sie dann protoniert und somit elektroneutral vorliegen, während sie in

pH-Bereichen von 6 bis 7 als deprotoniertes Ion hydrophil reagieren und somit bei einer Etherausschüttelung in wässriger Lösung verbleiben.

Die zweite Stoffgruppe könnte dem chemischen Verhalten nach zwei funktionell verschiedene chemische Reste tragen: eine dieser funktionellen Gruppen ist möglicherweise eine Hydroxyl- oder Carboxylgruppe, die zweite könnte einen protonierbaren Stickstoff tragen. Es könnte sich hierbei also beispielsweise um eine Aminogruppe handeln. Im sauren pH-Bereich wäre eine Carboxylgruppe elektroneutral, ein Aminostickstoff jedoch protoniert, das Molekül folglich nicht neutral. Im neutralen bzw. leicht alkalischen Bereich wären beide Gruppen deprotoniert, was Neutralität am Aminoende und negative Ladung an der hypothetischen Carboxylgruppe zur Folge hätte - das Molekül wäre hydrophil und verbliebe in der wässrigen Phase. Außerdem ist mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass die fragliche Substanz ein Neutralstoff ist, da ein solcher aufgrund seiner Ladungsverhältnisse immer in die Etherphase übergehen würde.

Bei der Induktion des 85 kd-Proteins sind also unterschiedliche Substanzen aus vermutlich mindestens zwei unterschiedlichen chemischen Stoffklassen beteiligt. Bei einer handelt es sich wahrscheinlich um eine Carbonsäure oder Phenolcarbonsäure, bei einer zweiten ist am ehesten von einem Aminophenol, einer Aminosäure oder einem Alkaloid auszugehen. Weitergehende Aussagen sind ohne speziellere pharmakologisch-analytische Methoden und HPLC nicht möglich.

2.5. Effekte der pflanzlichen Polyphenole Resveratrol, Quercetin und Myricetin

Um Anhaltspunkte zu möglichst sinnvoller Stoffkonzentration der Flavonoide im Zellexperiment zu haben, verglichen wir zuerst auftretende TLC-Spots der Rotweinbahnen mit denen der Einzelsubstanzen und versuchten anschließend durch Größenvergleiche mit Einzelstoffspots verschiedener Konzentrationen, die im Wein enthaltene Menge grob einzuordnen. Die so abgeschätzten Werte lagen im Bereich zwischen 20 und 40 μM . Zusätzlich orientierten wir uns an Literaturangaben [25; 162; 190; 225] und an finalen Stoffkonzentrationen für eine halbmaximale Hemmung der Thrombozytenaggregation (ED_{50}), die in der Arbeitsgruppe zu einem anderen Projekt ermittelt worden waren, nämlich für Myricetin 6,25 μM , Quercetin 12,5 μM und Resveratrol 20 μM . In der vorliegenden Arbeit wurden daher jeweils drei gestaffelte Konzentrationen der oben genannten Flavonoide, 8, 15 und 25 μM im Zellversuch verwendet. Die Blots, sowohl im PBS- als auch im Plasmasystem, waren allesamt schwierig zu beurteilen, die Banden waren recht schwach. Für Resveratrol zeigt sich eine gleichbleibend schwache Tendenz zur Bandenentwicklung, während es sich bei Quercetin eher um eine mit steigender Konzentration leicht ansteigende (bei 25 μM erscheint hier die Bande jeweils am relativ kräftigsten) und bei Myricetin eine leicht abfallende Wirkungskinetik (stärkste Bande bei 8 μM) zu handeln scheint. Die Banden gehen aber in keinem Fall über den Größenbereich der Kontrollen hinaus. Da $n = 2$ ist, ist hieraus aber nicht mehr als ein Trend abzuleiten. Möglicherweise waren auch die für den Thrombozyten-Shape-Change ermittelten wirksamen Stoffkonzentrationen, die als Orientierung benutzt wurden, für die spezielle Fragestellung an Endothelzellen zu niedrig angesetzt.

Quercetin, Myricetin und Resveratrol kommen aufgrund der wenig überzeugenden Wirkung von allen hier getesteten Konzentrationen und Expositionszeiten für den 85 kd-Bandeneffekt, also eine reaktive Aktivierung eines src-Kinase-Weges, nicht in Frage. Das bedeutet, dass diese Flavonoide im künstlichen Versuchssystem wohl

keine reaktiven Zellveränderungen bzw. potentiell zellschädigenden Folgen verursachen - über ihre womöglich vorhandene, in der Literatur beschriebene protektive Potenz lässt sich anhand der vorliegenden Endothel-Ergebnisse keine Aussage machen. Bei diesen drei Flavonoiden ist - zumindest anhand der gemachten Experimente - keine schädigende Wirkung anzunehmen.

Für Resveratrol und Quercetin ist in der Literatur eine Inhibition der IP₃-Kinase beschrieben. Letztendlich ergäbe sich durch diese Unterbindung einer src-Kinase gesteuerten Zellformveränderung die bzw. eine protektive Funktion dieser Moleküle. Auch hier wären weiterführende Versuche, u. a. *ex vivo* und Flavonoid-Gabe vor/nach Rotwein- oder Zellaktivatoren-Exposition interessant, vielleicht unter der Einbeziehung weiterer mittlerweile identifizierter Rotweinhaltstoffe wie Delphinidin, Cyanidin, Phloretin, Veratrol, Oenidin und anderen.

3. Effekte von Alkohol und pflanzlichen Flavonoiden auf Herz-Kreislauf-System, Endothelium und kardiovaskuläre Erkrankungen

In etlichen - vor allem epidemisch ausgerichteten - Studien war in den letzten drei Jahrzehnten wiederholt gezeigt worden, dass zwischen mäßigem aber regelmäßigem Konsum geringer Mengen von alkoholischen Getränken und der Inzidenz für kardio- und cerebrovaskuläre Erkrankungen eine inverse Korrelation zu bestehen scheint [113; 149, 226, 293; 355]. In einer Untersuchung an über 49000 Personen wurde außerdem gezeigt, dass bei Probanden mit moderatem Alkoholkonsum gegenüber der abstinenten Vergleichsgruppe ein niedrigeres Risiko für koronare Herzerkrankung besteht [427].

Die postulierte eher protektive Wirkung lässt sich nicht nur durch epidemiologische Untersuchungen, sondern auch durch Studien über die Effekte von Alkohol bzw. alkoholischen Getränken wie Rotwein auf den Organismus stützen. Neben der durch Alkohol induzierten Erhöhung der HDL-Plasmakonzentration [63; 156; 389], einer *in vitro* nachgewiesenen Hemmung der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF in Monozyten/Makrophagen durch Ethanol [15] und der beobachteten negativen Korrelation von Alkoholkonsum und myokardialen Reinfarkten [156] wird immer wieder eine günstige Wirkung von Rotwein auf Entstehung und Progression arteriosklerotischer Erkrankungen angeführt [170, 343; 344]. Wie schon ausgeführt ist Rotwein besonders reich an sekundären Pflanzenstoffen, besonders Polyphenolen/Flavonoiden. So haben mehrere Arbeitsgruppen in den letzten fünfzehn Jahren diesen Sachverhalt aufgegriffen und in epidemiologischen Studien gezeigt, dass die Menge der täglich mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole eine negative Korrelation mit der Inzidenz für Apoplex und koronare Sterblichkeit aufweist [189, 191; 219, 227]. Es werden für Rotwein einige Mechanismen diskutiert, die über eine reine Ethanolwirkung hinausgehen und welche die protektiven Effekte - zumindest partiell - erklären können:

1) Antioxidative Eigenschaften

Reaktive Sauerstoffmoleküle werden als Ursache für die Entstehung einer ganzen Reihe von Erkrankungen, inklusive Alterungsprozesse und Gefäßerkrankungen gesehen, wobei oxidativer Stress einer der Hauptmechanismen zu sein scheint, der endothelialer Dysfunktion zugrunde liegt [124]. So werden Epithelzellschäden, ausgelöst beispielsweise über NFκB-Aktivierung durch oxidativen Stress unter anderem als initiale Auslöser für atherosklerotische Prozesse diskutiert [14]. Daher können rotweinvermittelte antioxidative Effekte, besonders eine Hemmung der LDL-Oxidation [1; 96; 146, 247, 407] und die Fähigkeit, Ra-

dikale abzufangen [390], protektiv wirken. Es bleibt jedoch letztlich unklar, welche phenolische Substanz im Wein überwiegend für die antioxidativen Wirkungen verantwortlich ist. Wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, zeigen nämlich nicht nur Polyphenole, sondern auch andere im Rotwein vorhandenen phenolischen Substanzen wie Zimtsäurederivate (Kaffeinsäure), Cumarinsäure oder Protocatechusäure einen hemmenden Einfluss auf die Oxidation von LDL [1]. Die Wichtigkeit dieser Eigenschaft wird durch Arbeiten unterstrichen, die eine Veränderung im Gehalt oder Oxidation und Bindung von antioxidativen Systemen wie Aminothiolen besonders bei arteriosklerotischen Erkrankungsprozessen beschreiben [282]. Auch im Bier sind solche Polyphenole (Isoflavonoide) enthalten, die ebenfalls über ihre antioxidative Potenz einen möglichen Schutz vor kardiovaskulären und eventuell neoplastischen Erkrankungen bieten könnten [240; 328]. So wurde in einer prospektiven Studie mit 2000 Personen in Süddeutschland auch bei überwiegendem Bierkonsum ein abgesenktes Risiko für die Erkrankung an einer KHK und deren Folgen gegenüber der abstinenten Vergleichsgruppe nachgewiesen [217].

2) Antithrombotischer Effekt durch Hemmung des Thrombozytengestaltwandels (shape change) und Senkung der Aggregationsneigung [28; 299; 308; 309; 321; 338; 339].

3) Modifikationen der Eicosanoid-Biosynthese [163; 260; 386].

4) Direkte Einflüsse auf Gefäßebene

Polyphenolische Verbindungen haben die Fähigkeit, im Experiment präkontrahierte glatte Muskulatur intakter präparierter Aortenringe zu relaxieren, einige können wohl sogar 'entendothelialisierte' Aortenringe relaxieren [10; 12; 134]. Verschiedene Aspekte die für diese wichtige Eigenschaft eine Rolle spielen könnten sind im Folgenden diskutiert:

a) Modifikation von Endothelzell-Funktionen

- Es konnte eine Verringerung der tissue-factor (TF)-Expression in arteriosklerotisch vorgeschädigten Endothelzellen durch das im Rotwein enthaltene Polyphenol Resveratrol festgestellt werden [324]. TF ist ein primärer Initiator der Gerinnungskaskade und hat somit auch einen entscheidenden Einfluss auf Entstehung und Progression eines Thrombus [259; 422].
- Ein weiterer Punkt ist die Einflussnahme auf die Produktion von Endothelin-1, einem starken Vasokonstriktor. Es wurde (neben der Hemmung von phosphorylierenden Enzymen der Tyrosinkinase-Familie) eine starke Hemmung der Produktion dieses von den Gefäßendothelzellen gebildeten Mediators durch Rotwein-Phenole beschrieben [88]. Diese erfolgt wahrscheinlich über eine Blockierung der Translation [88]. In glatten Gefäßmuskulaturzellen der Koronararterien soll Resveratrol anderen Autoren zufolge die MAPK-Aktivität und die nukleäre Translokation hemmen und so den stimulatorischen Effekten von Endothelin-1 entgegenwirken [119]. Eine Hemmung der Bildung dieser Substanz oder eine Inhibition der von ihr gesteuerten Signaltransduktionswege soll dabei die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur unterstützen, die Lipideinlagerung in die Gefäßwände vermindern und bei bereits vorbestehender Atherosklerose das Infarktisiko senken [88; 134].

b) Beeinflussung von Tonus und Proliferationsverhalten glatter Gefäßmuskulaturzellen

- direkt antiproliferative Effekte auf glatte Muskelzellen:

Der Wiedereintritt von Gefäßzellen in den Zellzyklus und dessen Fortschreiten wird als Schlüsselereignis von proliferativen Gefäßerkrankungen wie

Atherosklerose sowie postangioplastischer Restenosierung angesehen [44; 207]. Einige Stoffe wie das polyphenolische Stilbenderivat *trans*-Resveratrol sollen bei glatten Gefäßmuskelzellen einen reversiblen Stopp in der frühen S-Phase und damit eine Hemmung der Proliferation induzieren [171]. Dabei senkt *trans*-Resveratrol u. a. die zellulären Spiegel der Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} und hemmt zusätzlich in geringem Maße die Phosphorylierung von Erk 1/2, der Protein-Kinase B/akt und der p70^{S6} Kinase.

Die Angiotensin II-induzierte Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen scheint grundsätzlich ein entscheidender Schritt bei Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein. So konnte an isolierten glatten Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta gezeigt werden, dass das auch im Rotwein vorkommende pflanzliche Polyphenol Tanninsäure konzentrationsabhängig die durch Angiotensin II verursachte Steigerungsrate der DNA-Synthese der betreffenden Zellen zu hemmen vermag [136; 137]. Bei Nichtvorhandensein anderer Wachstumsfaktoren induziert Angiotensin II über den G-Protein-gekoppelten Angiotensin Typ I (AT₁)-Rezeptor zwar Hypertrophie der glatten Muskelzellen (aber wohl keine Hyperplasie) [158; 45]. Die Bedeutung von Angiotensin II in der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen wird weiterhin deutlich durch die Wirksamkeit von ACE-Inhibitoren und Angiotensin II Rezeptor-Blockern bei der Pharmakotherapie von Hypertension und Atherosklerose. Die Stimulation von AT₁-Rezeptoren in den glatten Muskelzellen führt zur Aktivierung einer Vielzahl von Proteinkinase-Signalwegen. Die MAP-Kinasen 'extracellular signal-regulated kinase' (ERK) 1/2 und p38 MAPK spielen dabei wohl die Hauptrolle bei der Antwort der glatten Muskelzellen auf Angiotensin II [423; 424]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Serin/Threonin-Kinase Akt/Proteinkinase B in glatten Gefäßmuskelzellen nach Stimulation mit Angiotensin II aktiviert wird [406; 407] und eine wichtige Rolle in der Angiotensin II-vermittelten Hypertrophie der glatten Muskelzellen spielt [193; 423; 424]. Die Aktivierung der in der Signalkette weiter stromabwärts gelegenen 'p70 ribosomale protein S6 Kinase' (p70^{S6} Kinase) schließlich benötigt sogar sowohl die Akt/PKB als auch die ERK Signalkaskade [117; 160]. Aktivierte p70^{S6} Kinase wird zur Regulation der Translation von mRNAs, die ein Oligopyrimidin-Motiv am Transkriptionsstartplatz tragen und die für viele Komponenten des Proteinsyntheseapparates codieren, benötigt [333]. So gesehen haben die MAP Kinasen ERK 1/2 und p38 MAPK, genauso wie p70^{S6} Kinase und die auch als 'Survival-Kinase' bezeichnete Akt/PKB wohl den größten Einfluß bei der durch Angiotensin II-induzierten Proteinsynthese-Steigerung und Hypertrophie vaskulärer glatter Gefäßmuskelzellen. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass der Rotweinhaltstoff Resveratrol dosisabhängig die Phosphorylierung von Akt/PKB und - wenn auch in geringerem Ausmaße - ERK 1/2 zu hemmen vermag. Auch die p70^{S6} Kinase und der gesamte Akt-Signalweg, der an Angiotensin II-gesteuerten Proteinsynthese-Prozessen beteiligt ist, werden aber ebenso durch Resveratrol beeinträchtigt [170]. Weiter stromaufwärts in der Signalkette scheint Resveratrol ebenfalls Einfluss zu nehmen, allerdings wird der postulierte antihypertrophische Effekt hier wohl eher durch Inhibition der Phosphorylierung der Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI₃K) als durch eine Aktivierung von Phosphatasen vermittelt [170].

Da die Klasse der 1A PI₃K - wie weiter oben schon ausgeführt - heterodimere Proteine bestehend aus einer regulatorischen 85 kD- und einer katalytischen 110 kD-Untereinheit sind, sprächen diese Ergebnisse auch eher

nicht dafür, dass es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten 85 kD-Protein möglicherweise um die regulatorische p85-Einheit der PI₃K handelt. Weiterhin unklar bleibt aber vorläufig, ob die oben beschriebenen Effekte lediglich durch einen einzigen Inhaltsstoff wie das untersuchte polyphenolische Stilbenderivat Resveratrol, oder vielleicht eben doch durch eine ganze Gruppe von Rotweinphenolen oder anderen Stoffgruppen verursacht werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den beschriebenen antihyperproliferativen Effekt von Resveratrol (und evtl. auch anderen Rotweinhaltstoffen) auf die glatten Gefäßmuskelzellen könnte die postulierte Östrogenartigkeit des Stilben-Derivates [157; 276; 337; 369] sein: glatte Gefäßmuskelzellen sollen nämlich Östrogen mit großer Affinität zu binden vermögen, und Östrogen wiederum hemmt direkt die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen *in vitro* [276].

- Beeinflussung der NO-Produktion und der Gefäßrelaxation:

Stickoxid (NO) scheint in physiologischen Konzentrationen ein Molekül mit überwiegend vasoprotektiven Eigenschaften zu sein:

So nimmt es u. a. Einfluss auf die Regulation der Hämostase [143; 311], auf Thrombenentstehung [460] und Gefäßtonus [10; 134;]. Zuerst wurde eine direkte Vermittlung endothelabhängiger Gefäßrelaxation [134; 136; 137], wahrscheinlich über eine Steigerung der NO-Syntheserate [10; 202] diskutiert. Hierzu konnte u. a. direkt an menschlichen Koronararterienringen gezeigt werden, dass Bordeauxweine vasorelaxierend wirken (dieser Effekt war aber von der Integrität des Gefäßendothels abhängig und konnte durch Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthese aufgehoben werden). Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass Rotwein über eine gesteigerte Freisetzung von NO, einer anschließenden Aktivierung der Guanylatzyklase und der vermehrten Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) eine vasorelaxierende Wirkung vermittelt [137]. Zusätzlich zu seiner nachgewiesenen vasodilatierenden Wirkung scheint NO weitere Vorgänge im Rahmen der Atheroskleroseentstehung wie die Thrombozytenaggregation [460], die Leukozytenadhäsion, die Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Expression von Genen, die an der Atherogenese beteiligt sind, hemmend beeinflussen zu können [255]. Die NO-Bildung verläuft entweder über die sog. 'inducible nitric oxide synthase' (iNOS) oder aber direkt in den Endothelzellen von der 'endothelial nitric oxide synthase' (eNOS) gebildet und dann freigesetzt. Das Enzym eNOS wird überwiegend auf posttranskriptionaler Ebene reguliert, kann aber auch auf Transkriptionsebene beeinflusst werden [145]. Obwohl einige Studien eher auf eine kurzzeitige Aktivierung der eNOS bzw. auf einen akuten NO-abhängigen Effekt in Aorten nach Rotweinkontakt hinweisen [412], wurde aber auch beschrieben, dass eine längerfristige Inkubation (~20 h) von humanen Endothelzellen mit alkoholfreiem Rotwein-Polyphenolextrakt die NO-Freisetzung, eNOS-Aktivität sowie eNOS-Expression stark und über einen längeren Zeitraum hinweg steigern kann [250]. Zumindest die beobachteten kurzfristigen Effekte auf eNOS-Produktion und Vasorelaxation scheinen calciumabhängig zu sein [412] (auch in der vorliegenden Arbeit konnte ja gezeigt werden, dass Behandlung mit dem intrazellulären Calciumchelator BAPTA/AM vor Rotweinexposition (15-60 min) einen hemmenden Einfluss auf die gefundene Bande und damit auch auf die mit ihr verknüpften zellulären Prozesse hat). Der Ca²⁺-Influx bzw. der Ca²⁺-Spiegel in den Endothelzellen scheint damit vermutlich auf mehreren Ebenen von Atherogenese bzw. antisklerotischen Prozessen Einfluss zu haben.

- direkt antihypertensive Effekte

Sie hängen wohl hauptsächlich mit den oben diskutierten Fähigkeiten der Polyphenole zusammen, das NO-cGMP-System zu aktivieren. So konnte u. a. im experimentellen Modell L-NAME-induzierter Hochdruck (über Hemmung der NO-Synthase) durch Rotweineextrakt teilweise beeinflusst und gesenkt werden [320]. Die *in vivo*-Gabe von Polyphenol-Extrakten aus Tee oder Wein konnte auch in Tierexperimenten erhöhten Blutdruck in spontan hypertensiven Ratten [180] senken bzw. den Blutdruck und das Insultrisiko bei besonders anfälligen SHRSP-Ratten vermindern [283], aber auch bei Kurzzeit-Gabe den Blutdruck normotensiver Ratten leicht senken [100]. Im angewandt-klinischen Bereich konnte in einer Studie an 78 Herzinsuffizienz-Patienten (Stadium NYHA II) durch Therapie mit flavonoidhaltigem *Crataegus*-Extrakt sowohl die Parameter Blutdruck als auch Herzfrequenz positiv beeinflusst werden [381].

5) Antiischämische Effekte

Die protektive Rolle von Flavonoiden in Bezug auf kardiale Ischämien hängt vermutlich hauptsächlich mit ihrer Fähigkeit zusammen freie Sauerstoffradikale abzufangen [374], eine bestimmte NO-Konzentration aufrecht zu erhalten [10; 272] und die Mastzell-Sekretion zu inhibieren [350]. Sowohl alkoholfreier Rotweineextrakt als auch *trans*-Resveratrol schützten im Experiment die Herzen vor Ischämie/Reperfusionsschäden (belegt durch verbesserte postischämische Ventrikelfunktion und reduzierte myokardiale Infarzierung) [374]. Sowohl der Rotweineextrakt als auch *t*-Resveratrol konnten den oxidativen Stress, gemessen über reduzierte Malonyldialdehyd-Bildung, in den Herzen reduzieren. Ebenso fingen diese Stoffe auch hocheffektiv freie Peroxyl-Radikale ab. Eine direkte Herzperfusion mit reinem Ethanol scheint im Gegensatz dazu oxidativen Stress zu verursachen indem sie völlig andere Effekte hervorruft [368]. Auch wurde ein milderer Verlauf von induzierter akuter myokardialer Ischämie in isolierten Herzpräparaten durch Flavonoidwirkung berichtet [368]. Auch soll unter Flavongabe eine erhöhte funktionelle Erholung in reperfundierten Herzen nach kurzzeitig induzierter globaler Ischämie zu beobachten sein [301]. Von einigen Autoren wird diese verbesserte postischämische Erholung unter Flavongabe der Stimulation des Cytochrom P₄₅₀-Systems (CYP₄₅₀) zugeschrieben. Es wird vermutet, dass Flavone als allosterische Effektoren der CYP₄₅₀-Reduktase wirken, was wiederum deren katalytische Effektivität erhöhen und die Produktion freier Radikale vermindern soll. Quercetin beispielsweise soll seinen protektiven Effekt über Verhinderung eines Abfalles des Xanthindehydrogenase/-oxidase-Quotienten vermitteln, der sonst im Tierexperiment während Ischämie-Reperfusionen auftrat [372]. Inhibitorische Eigenschaften von Flavonoiden gegenüber der Xanthinoxidase sind gesondert beschrieben [203]. Außerdem werden Flavonoiden von anderen Autoren zusätzlich positiv chronotrope und antiarrhythmische Eigenschaften sowie die Fähigkeit zur Verminderung mitochondrialer Ischämie-Reperfusion-Defekte zugeschrieben [442]. Da während Ischämie und Reperfusion bei Ratten auch Veränderungen in der NO-Konzentration festgestellt wurden [324], scheinen die Effekte von Rotwein-Polyphenolen (Erhöhung der NO-Molekülstabilität und -bildung) auch von dieser Seite betrachtet von zentraler Bedeutung bei der Ischämie-Prävention zu sein (siehe auch Punkt 4b dieses Kapitels). Einige Studien beschreiben daher auch eine Steigerung der NO-Synthaseaktivität nach Gabe von Rotwein-Polyphenolen am Herzen [320] und in der Aorta [12; 320]. Die protektiven Effekte der Flavonoide hängen aber wohl auch mit der Fähigkeit zusammen, die Mastzellsekretion zu inhibieren, die bei kardiovaskulären Inflammationsprozessen eine Rolle spielen kann und als ein möglicher

zusätzlicher Schlüsselfaktor bei der KHK gesehen wird [350]. So konnte gezeigt werden, dass Quercetin und einige andere Flavonoide im Tierexperiment die Histaminfreisetzung aus Mastzellen konzentrationsabhängig hemmen [172; 273].

Abschließend zusammengefasst konnten die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen zur Auswirkung von Rotwein (bzw. den im Rotwein unabhängig vom Alkoholgehalt enthaltenen organischen Inhaltsstoffe primär pflanzlichen Ursprungs) auf humane Nabelendothelzellen (HUVEC) *in vitro* keinen wirklichen weiteren Erkenntnisgewinn in der Aufklärung der beteiligten Wirkmechanismen hinsichtlich des 'french paradox' bringen, es also weder stützen noch widerlegen. Es konnte aber - sowohl morphologisch als auch biochemisch - gezeigt werden, dass im Rotwein enthaltene Stoffe *in vitro* reproduzierbar Reaktionen und Veränderungen in Endothelzellen auslösen konnten. Es hat sich in der vorliegenden Arbeit aber auch gezeigt, dass es schwierig ist *in vitro* gewonnene Aussagen auf die komplexen Bedingungen eines lebenden Organismus zu übertragen. Dazu müssen eine ganze Reihe weiterer wichtiger, aber oft unwägbarer oder unbekannter Einflüsse und physiologischer Gegebenheiten wie Verdauung und Absorption, Metabolisierungsprozesse und pharmakologische Interaktionen, Ausscheidungsmechanismen und -kinetiken oder Akkumulierungsprozesse in Körper bzw. in Zellverbänden mitberücksichtigt werden. Wie oben diskutiert können die durch epidemiologische Untersuchungen untermauerten und als 'French paradox' bezeichneten günstigen Auswirkungen alkoholischer Getränke bzw. von Rotwein auf Entstehung und Progression arteriosklerotischer Erkrankungen nicht von der Hand gewiesen werden. Die protektiv wirksamen Substanzen setzen offenbar an mehreren Angriffspunkten und in verschiedenen Ebenen an und können ihre positiven Wirkungen vielleicht gerade durch synergistische Effekte überhaupt zum Greifen bringen bzw. verstärken.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte - sowohl mikromorphologisch als auch biochemisch - gezeigt werden, dass im Rotwein enthaltene Stoffe *in vitro* reproduzierbare Reaktionen und Veränderungen in den behandelten Endothelzellen auszulösen vermögen, die bei Kontrollen mit Ethanol oder auch Weißwein nicht oder nur sehr abgeschwächt zu beobachten waren. Eine kardio- und gefäßprotektive Wirkung von Rotwein über eine Wirkung auf Endothelzellen läßt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit aber weder hinreichend stützen noch widerlegen - dazu fehlt letztlich einfach Wissen über Wesen und Funktion des gefundenen rotweininduzierten "85 kD-Phosphotyrosinproteins", dessen Entstehung durch gewisse src-Kinase-Inhibitoren sowie intrazelluläre Calciumchelatoren gehemmt werden kann. Ob es sich hierbei möglicherweise um die reaktive Untereinheit der Phosphoinositol 3-Kinase handelt, war mit den verwendeten, von der Aussagekraft her begrenzten Methoden nicht herauszufinden. Eine Proteinsequenzierung in einer Folgearbeit könnte hier Klarheit schaffen.

Bei den in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen, nämlich

- a) reaktive Veränderungen an intrazellulärem Aktingerüst und Zellmorphologie,
- b) der Induktion eines tyrosinphosphorylierten, also wahrscheinlich aktivierten, calcium- und src-Kinase-abhängigen Proteins *und*
- c) der Aktivierung (- und nicht wie für eine angenommene protektive Funktion eher erwartet ein Nichtanspringen bzw. eine Inhibition) des Gens MCP-1 für das proinflammatorische Chemokin 'Monocyte chemoattractant protein-1'

ist nicht primär von einer protektiven Funktion durch Rotweinexposition des Endotheliums *in vitro* auszugehen.

Diese Effekte sind eher im Zusammenhang mit Intimaschaden und Atheroskleroseentstehung zu sehen. Die Initiierung von Prozessen des Src-Kinase-Weges mit möglichen grundlegenden Veränderungen von Zellkontakten, Zytoskelett und Intimapermeabilität sowie die Aktivierung von Genen zur Initiation inflammatorischer Prozesse spielen auch beim Fortschreiten atherosklerotischer Schädigungen der Gefäße (subendotheliale Ödemen, Schaumzellbildung) eine bedeutende Rolle. Diese Effekte traten deutlich aber nur im PBS-Puffersystem auf.

Es ist durchaus möglich, dass auch im Rotwein zellschädigende Inhaltsstoffe vorhanden sind. Deren Wirkung scheint aber im Regelfall - nämlich unter den im Körper vorherrschenden Bedingungen - von anderen Stoffen/Blutbestandteilen aufgefangen und sogar von den nachweislich protektiven Substanzen wie Antioxidantien und antithrombogen wirksamen Komponenten wettgemacht zu werden. Die Versuche wurden ausschließlich an humanen Nabelvenen-Endothelzellen, nicht an Endothelien anderer Herkunft durchgeführt. Es wurden weiterhin keine *ex vivo*-Untersuchungen nach Rotweinaufnahme durchgeführt. Andere Endothelzellpopulationen, beispielsweise aus adulten Coronar- oder Carotisgefäßen haben möglicherweise andere Enzymausstattungen und somit auch andere Reaktionsmöglichkeiten zur Verfügung. Um hierüber weitere Informationen zu erhalten wäre es sinnvoll, zusätzliche Untersuchungen auch mit Endothelzellen anderer Herkunft, im Plasma- oder Serummilieu *in vitro*, aus *ex vivo* Trinkversuchen oder im Tiermodell zu machen - vor allem aber das 85 kd-Protein zu isolieren und zu sequenzieren. Damit sollte es möglich sein, die Funktion und damit auch die Folgen seiner Aktivierung in der gesunden, im Zellverband ruhenden Gefäßendothelzelle zu beurteilen. Die ebenfalls interessante Frage der pharmakologischen Beeinflussung des Endo-

thels auf Genom- und Proteomebene durch Polyphenole bzw. Rotweinkontakt sollte für verschiedene bei der Atheroskleroseentstehung relevanten Genorte und an größeren Fallzahlen untersucht werden.

Da der Rotwein, wie schon eingangs erwähnt, mehr als 500 überwiegend nicht-identifizierte Inhaltsstoffe enthält, gehören die als ursächlich ermittelten hypothetischen Stoffgruppen Carbonsäure bzw. Phenolcarbonsäure und Aminophenol/Aminosäure/Alkaloid, die wahrscheinlich für den gefundenen Bandeneffekt in Frage kommen, mit großer Wahrscheinlichkeit zu diesen organischen Rotweinverbindungen. Auch ein Hinweis auf das Vorhandensein in rotem Traubensaft hat sich in der vorliegenden Arbeit ergeben und passt zu dieser Theorie. Die überprüften pflanzlichen Flavonoide Quercetin, Myricetin und Resveratrol, deren antioxidative und protektive Wirkungen in der Literatur diskutiert werden, kommen aufgrund der Ergebnisse für die Entstehung der 85 kd-Bande nicht in Frage, können aber möglicherweise mit ihren in der Literatur beschriebenen Wirkungen ihren Anteil zum französischen Paradoxon beitragen.

Es ist durch mäßigen aber regelmäßigen Rotweingenuß (laut einigen Autoren durch den mäßigen Konsum alkoholischer Getränke ganz allgemein) aufgrund der Herabsetzung der Thrombozyten-Aggregationsfähigkeit, Endothelin-1-Inhibition, antioxidativer Wirkung einiger Inhaltsstoffe, möglicher relaxierender Wirkungen auf die glatte Gefäßmuskulatur sowie möglicherweise auch durch Effekte in Bezug auf die gefäßauskleidenden Endothelzellen wohl ein gewisser Gefäßschutz gegeben. Das sogenannte 'French paradox' ist durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weder bestätigt noch widerlegt. Manche Kritiker behaupten, des Rätsels Lösung liege lediglich in der Zeitverzögerung mit der der Körper auf ungesunde Lebensweise reagiere: vor 30 Jahren (also zu Beginn der ersten epidemiologischen Studien) hätten die Franzosen allgemein einfach mehr Gemüse und weniger Fleisch und Fett gegessen. Neben den naturwissenschaftlichen Einflussgrößen wie pharmakologischen Effekten von Inhaltsstoffen, populationsgenetischen Ansätzen wie einer möglichen besonderen genetischen Konstitution der Population in weiten Teilen Frankreichs (beispielsweise bezüglich Enzymausstattung, Alkoholstoffwechsel oder dem ABCA1-Gen [446]) sollte daher vielleicht auch eher 'unwissenschaftlichen' Einflussfaktoren beim Versuch der Erklärung dieses Paradoxons Beachtung geschenkt werden, nämlich der soziokulturellen Herkunft der untersuchten Personen, und - sicher nicht weniger wichtig - einer womöglicher allgemein etwas entspannteren Lebens- und Arbeitsauffassung bestimmter Bevölkerungsschichten (den Franzosen ja gemeinhin als "savoir vivre" zugeschrieben).

Abschließend eine Bemerkung, die das 'French paradox' zu einem gewissen Grade relativieren mag: während die Franzosen in der europaweiten Klassifizierung in Bezug auf die Lebenserwartung führend sind, nehmen sie paradoxerweise auch hinsichtlich eines vorzeitigen Todes eine führende Position ein. Nach Angaben des nationalen französischen Gesundheitsüberwachungsamtes Institut National de Veille Sanitaire liegt die relative Sterblichkeit der Franzosen unter 65 Jahren heute europaweit mit am höchsten (*Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, No. 30: 'La mortalité évitable liée aux comportements à risques, une priorité de santé publique en France'). So haben im Jahr 1999 beispielsweise 110.470 Personen unter 65 Jahren den Tod gefunden. In über einem Drittel aller Fälle hätte dies vermieden werden können, so das Urteil der Verfasser. Die Todesfälle konnten überwiegend „Risikoverhalten“ (Alkohol; Verkehrsunfälle; Nikotin) aber auch Suizid zugeordnet werden. Nachdenklich stimmt, dass Frauen, die risikoreichem Verhalten und seinen

Folgen in der Regel in geringerem Maße ausgesetzt sind, in dieser Hinsicht europaweit dennoch den Rang 3 einnehmen.

Abseits von Epidemiologie und Theorien zum 'französischen Paradoxon', scheint Rotwein mit Ziel und Maß genossen, durchaus protektive Eigenschaften für den Konsumenten zu haben (zu begründen mit seinen antioxidativen Eigenschaften und dem Flavonoidgehalt).

Auch die positiven Folgen, die der Effekt mit sich bringt, sich also ab und zu etwas Gutes zu tun, sind - neben allen anderen genannten Einflussmöglichkeiten - in diesem Zusammenhang sicherlich nicht ganz von der Hand zu weisen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Abu Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ: Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and LDL oxidation in vitro; identification and mechanisms of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci (Colch)* **1996**; 91(4):449-58
- 2) Adlercreutz H, Mazur W: Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann Med* **1997**; 29(2):95-120
- 3) Agarwal S, Rao AV: Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* **2000**; 163(6):739-44
- 4) Agewall S, Wright S, Doughty RN, Whalley GA, Duxbury M, Sharpe N: Does a glass of red wine improve endothelial function. *Eur Heart J* **2000**; 21(1):74-8
- 5) Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S: Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation* **2003**; 107(4):604-11
- 6) Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsen S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM (1999): Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**; 19(6):1518-25
- 7) Alaejos MS, Diaz Romero FJ, Diaz Romero C: Selenium and cancer: some nutritional aspects. *Nutrition (US)* **2000**; 16(5):336-83
- 8) Altman D, Wilson FD, Benedict JH, Gould F: Biopesticides and resistance. *Science* **1992**; 255(5047):903-4
- 9) Alvarez-Castro E, Campos-Toimil M, Orallo F: (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2004**; 369(5):496-506
- 10) Andriambelison E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R: Nitric oxide production and endothelial-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Brit J Pharmacol* **1997**; 120(6):1053-8
- 11) Andriambelison E, Magnier C, Haan-Archipoff G: Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr* **1998**; 128:2324-33
- 12) Andriambelison E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R: Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* **1999**; 33:248-54
- 13) Antisperger DS, Dirsch VM, Ferrreira D, Su JL, Kuo ML, Vollmar AM: Ajoene-induced cell death in human promyeloleukemic cells does not require JNK but is amplified by the inhibition of ERK. *Oncogene* **2003**; 22(4):582-9
- 14) Aoki M, Nata T, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K: Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF- κ B. Antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension* **2001**; 38(1):48

- 15) Arbabi S, Garcia I, Bauer GJ, Maier RV: Alcohol (ethanol) inhibits IL-8 and TNF: role of p38 pathway. *J Immunol* **1999**; 162:7441-5
- 16) Arcaro A, Wymann MP: Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* **1993**; 296:297-301
- 17) Arora A, Nair MG, Strasberg GM: Structure-activity relationships for antioxidant activities of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med* **1998**; 24(9):1355-63
- 18) Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, Connor WE: Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. *Circulation* **1993**; 88:2771-9
- 19) Aviram M, Fuhrman B: Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherosclerosis. *Atheroscl* **1998**; 137 Suppl:S45-S50
- 20) Äpfelbacher M, Weber PC : Von Radikalen, Bakterien und Toxinen. Neues aus der Atheroskleroseforschung. In : *Einsichten - Forschung an der Ludwig-Maximilians-Universität*. **1997**; Hrsg. EOS Verlag München:10-4
- 21) Babu YS, Bugg CE, Cook WJ : X-ray diffraction structures of calmodulin. *Methods Enzymol* **1987**; 139:632-42
- 22) Babu YS, Bugg CE, Cook WJ: Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol* **1988** ; 204(1):191-204
- 23) Baraona E, Lieber CS: Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res* **1979**; 20:289-315
- 24) Baraona E, Lieber CS: Alcohol and lipids. Review. *Rec Dev Alc* **1998**; 14:97-134
- 25) Belguendouz L, Fremont L, Linarel A: Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine LDL. *Biochem Pharmacol* **1997**; 53(9):1347-55
- 26) Benditt EP, Gown AM: Atheroma: The artery wall and the environment. *Int Rev Exp Pathol* **1980**; 21:55
- 27) Berridge MJ: Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* **1993**; 631:315-25
- 28) Bertelli AA, Giovannini L, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A: Antiplatelet activity of synthetic and natural Resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* **1995**; 17(1):1-3
- 29) Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP: Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- Resveratrol (3,4', 5-Trihydroxystilben) after short term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React (Switz)* **1996**; 18(2-3):67-71
- 30) Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Urien S, Tillement JP, Bertelli A: Kinetics of trans- and cis- Resveratrol (3,4', 5-Trihydroxystilben) after red wine oral administration in rats. *Int J Clin Pharmacol Res (Switz)* **1996**; 16(4-5):77-81
- 31) Bertelli AA, Gozzini A, Stradi R, Stella S, Bertelli A: Stability of Resveratrol over time and the various stages of grape transformation. *Drugs Exp Clin Res* **1998**; 24(4):207-11

- 32) Bertelli AA, Ferrara F, Diana G, Filgenzi A, Cossi M, Ponti W, Ferrero ME, Bertelli A: Resveratrol, a natural stilben in grapes and wine enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a cofactor in antiinflammatory and anticancer chemoprotective activity. *Int J Tissue React (Switz)* **1999**; 21(4):98-104
- 33) Bitzer M, Opitz H, Popp J, Morgalla M, Gruber A, Heiss E, Voigt K: Angiogenesis and brain oedema in intracranial meningiomas: influence of vascular endothelial growth factors. *Acta Neurochir (Wien)* **1998**;140(4):333-40
- 34) Blackburn HG: The low risk coronary male. *Am J Cardiol* **1986**; 58:161
- 35) Blomberg J, Van den Ven WJ, Reynolds FH jr, Nalewaik RP, Stephenson JR: Snyder-Theilen feline sarcoma virus P85 contains a single phosphotyrosine acceptor site recognized by its associated protein kinase. *J Virol* **1981**; 38(3):886-94
- 36) Blood CH, Zetter BR: Tumor interaction with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1990**; 1032:89-118
- 37) Boguski MS, McCormick F: Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **1993**; 366:643-54
- 38) Bokemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ: Multiple intracellular MAP kinase cascades. *Kidney Int* **1996**; 49(5):1187-98
- 39) Bokoch GM, Der CJ: Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. *FASEB J* **1993**; 7:750-9
- 40) Bomser J, Madhavi DC, Singletary K, Smith MA: In vitro anticancer activity of fruit extracts from Vaccinium species. *Planta Med* **1996**; 62(3):212-6
- 41) Borrelli F, Izzo AA: The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res* **2000**; 14(8):581-91
- 42) Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* **1990**; 86:343-55
- 43) Botting R, Vane JR: Vasoactive mediators derived from the endothelium. *Arch Mal Coeur* **1989**; 82:11-4
- 44) Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Dzau VJ: Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* **1998**; 98:82-9
- 45) Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Ziegler A, de Leyen HE, Dzau VJ: A novel role for the cyclin-dependent kinase inhibitor P27 (Kio1) in angiotensin I-stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Clin Invest* **1999**; 104:815-23
- 46) Brieland JK, Flory CM, Jones MC, Miller GR, Remick DG, Warren JL, Fantone JC: Regulation of monocyte chemoattractant protein, gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1995**; 12:104-9
- 47) Brook RD, Bard RL, Glazewski L, Kehrer C, Bodary PF, Eitzman DL, Rajagopalan S: Effect of short-term weight loss on the metabolic syndrome and conduit vascular endothelial function in overweight adults. *Am J Cardiol* **2004**; 93(89):1012-6

- 48) Brouillard R, George R, Fougerousse A: Polyphenols produced during red wine ageing. *Biofactors* **1997**; 6(4):403-10
- 49) Bühling KJ, Lepenies J, Witt K: Allgemeine und Spezielle Pathologie. 2. Aufl.; **1995** Urban&Schwarz; 87
- 50) Burkitt MJ, Duncan J: Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl- radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging, and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys* **2000**; 381(2):257-263
- 51) Bursztajn S, Feng H, Bermann SA, Nanda A: Poly (ADP-ribose) polymerase induction is an early signal of apoptosis in human neuroblastoma. *Brain Res Mol Brain Res* **2000**; 76(2):363-76
- 52) Caccetta RA, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB: Ingestion of red wine increases plasma phenolic acid concentration but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* **2000**; 71(1):67-74
- 53) Calabrese G: Nonalcoholic compounds of wine: The phytoestrogen Resveratrol and moderate red wine consumption during menopause. *Drugs Exp Clin Res* **1999**; 25(2-3):111-4
- 54) Cantley CC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S: Oncogenes and signal transduction. *Cell* **1991**; 64:281-300
- 55) Cao G, Prior RL: Postprandial increase in serum antioxidant capacity in older women. *J Appl Physiol* **2000**; 89(3):877-83
- 56) Cao G, Sofic E, Prior L: Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationship. *Free Radic Biol Med* **1997**; 22(5):749-60
- 57) Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y: Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J* **1999**; 13(15):2195-2202
- 58) Cao Y, Cao R: Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* **1999**; 398(6726):381
- 59) Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanti A, De Caterina R: Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; 23(4):622-9
- 60) Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA: Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **1994**; 91:3652-6
- 61) Casey PJ, Graziano MP, Freissmuth M, Gilman AG: Role of G-protein in transmembrane signalling. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* **1988**; 53 Pt 1:203-8
- 62) Casserly I, Topol E: Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *Lancet* **2004**; 363:1139-46
- 63) Castelli WP, Gordon T, Hjortland MC: Alcohol and blood lipids. *Lancet* **1977**; 2:153-5
- 64) Celetti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD: Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* **2001**; 7:425-9

- 65) Cerboni C, Gismondi A, Palmieri G, Piccoli M, Frati L, Santoni A: CD16-mediated activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) in human NK cells involves tyrosine phosphorylation of Cbl and its association with Grb2, Shc, pp36 and p85 PI-3K subunit. *Eur J Immunol* **1998**; 28(3):1005-15
- 66) Chamley-Campbell JH: Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* **1981**; 89:379
- 67) Chan EC, Pannangpetch P, Woodman OL: Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharm* **2000**; 35:326-33
- 68) Chan WK, Nguyen LT, Miller VP, Harris RZ: Mechanism-based inactivation of human cytochrome. *Life Sci* **1998**; 62(10):135-42
- 69) Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ: C-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biology* **1995**; 130:355-69
- 70) Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG, Parmacek MS, Leiden JM: Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science (Wash DC)* **1995**; 267:518-22
- 71) Chen CK, Pace-Asciak CR: Vasorelaxing activity of Resveratrol and Quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol (Engl)* **1996**; 27(2):363-6
- 72) Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL: Role of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol* **1996**; 157:4602-8
- 73) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M: Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA* **2003**; 290(4):486-94
- 74) Christiansen C: Sex steroids and the cardiovascular system. *Osteoporos Int* **1997**; 1:8-11
- 75) Chrzanowska-Wodnicka M; Burridge K: Rho, rac, and the actin cytoskeleton. *Bioessays* **1992**, 14(11):777-8
- 76) Chrzanowska-Wodnicka M; Burridge K: Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibres and focal adhesions. *J Cell Biol* **1996**; 133(6):1403-15
- 77) Cishek MB, Galloway MT, Karim M, German JB, Kappagoda CT: Effect of red wine on endothelium-dependent relaxation in rabbits. *Clin Sci (Colch)* **1997**; 93(6):507-11
- 78) Cleophas TJ, Tuinenberg E, van der Meulen J, Zwiderman KH: Wine consumption and other dietary variables in males under 60 before and after acute myocard infarction. *Angiology* **1996**; 47(8): 789-96
- 79) Cleophas TJ, Hornstra N, van Hoogstraten B, van der Meulen J: Homocysteine, a risk factor for coronar artery disease as noted in a meta-analysis. *Am J Cardiol* **2000**; 86(9):1005-9
- 80) Cohen P, Klee CB (Hrsg.): *Calmodulin*. **1988**: Amsterdam (Elsevier)

- 81) Cohen S, Savage CR jr: Recent studies on the chemistry and biology of epidermal growth factor. *Recent Prog Horm Res* **1974**; 30:551-74
- 82) Colditz GA, Branch LG, Lipnick RJ: Moderate alcohol and decreased cardiovascular mortality in an elderly cohort. *Am Heart J* **1985**; 109:886-9
- 83) Collins JH, Potter JD, Horn MS, Wilshire G, Sackmann N: The amino acid sequence of rabbit skeleton muscle troponin C: gene replication and homology with calcium-binding proteins from carp and hake muscle. *FEBS Lett* **1973**; 36(3):268-72
- 84) Constant J: Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Clin Cardiol* **1997**; 20(5):420-4
- 85) Cook NC, Samman S: Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* **1996**; 7:66-76
- 86) Cook SJ, Balmanno K, Garner A, Millar T, Taverner C, Todd D: Regulative of cell cycle re-entry by growth, survival and stress signaling pathways. *Biochem Soc Trans* **2000**; 28(2):233-40
- 87) Cooper DM, Jagus R, Somers RL: Cholera toxin modifies diverse GTP-modulated regulatory proteins. *Biochem Biophys Res Commun (US)* **1981**; 101(4):1179-85
- 88) Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ: Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* **2001**; 414(6866):863-4
- 89) Coultate TP: Food: The chemistry of its components. The Royal Society of Chemistry; 2nd ed. **1990**:137-49
- 90) Criqui MH, Ringel BL: Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet* **1994**; 344:1719-23
- 91) Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Iribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D: A high-fat diet enduces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids* **2000**; 35(2):143-8
- 92) Das DK, Sato M, Ray PS, Manlik G, Engelmann RM, Bertelli AA, Bertelli A: Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp Clin Res* **1999**; 25(2-3):115-20
- 93) Day A, Stansbie D: Cardioprotective effect of red wine may be mediated by urate. *Clin Chem* **1995**; 41(9):1319-20
- 94) de la Torre JC: Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* **2002**; 33:1152-62
- 95) de Rijke YB, Demacker PN, Assen NA, Sloots LM, Katan MB, Stalenhoef AP: Red wine does not affect oxidizability of low-density lipoprotein in volunteers. *Am J Clin Nutr* **1996**; 63(3):329-34
- 96) de Whalley, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS: Flavonoids inhibit the oxidative modification of low-density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* **1990**; 39:1743-1750
- 97) Delrieu I: The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett* **2000**; 468(1):6-10

- 98) Demrow HS, Slane PR, Folts JD: Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* **1995**; 91:1182-8
- 99) Di Santo A, Mezzetti A, Napoleone E, Di Tommaso R, Donati MB, De Gaetano G, Lorenzet R: Resveratrol and quercetin down-regulate tissue-factor expression by human stimulated vascular cells. *J Thromb Haemost* **2003**; 1(5):1089-95
- 100) Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R: Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation and induce gene expression. *Hypertension* **2001**; 38(2):159-65
- 101) Dinnen RD, Ebisuzaki K: The linking of anticancer drugs, cell cycle blocks, and differentiation: implications in the search for antineoplastic drugs. *Leuc Res* **1992**; 16(5):491-5
- 102) Dinnen RD, Ebisuzaki K: The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a folklore product. *Anticancer Res* **1997**; 17(2A):1027-33
- 103) Dirsch VM, Gerbes AL, Vollmar AM: Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activated nuclear factor kappaB. *Mol Pharmacol* **1998**; 53(3):402-7
- 104) Dirsch VM, Kiemer AK, Wagner H, Vollmar AM: Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric synthase. *Atherosclerosis* **1998**; 139(29):333-9
- 105) Dirsch VM, Vollmar AM: Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)- like properties? *Biochem Pharmacol* **2001**; 61(5):587-93
- 106) Dirsch VM, Antlsperger DS, Hentze H, Vollmar AM: Ajoene, an experimental anti-leukemic drug: mechanism of cell death. *Leukemia* **2002**; 16(1):74-83
- 107) Dirsch VM, Keiss HP, Vollmar AM: Garlic metabolites fail to inhibit the activation of the transcription factor NF kappaB and subsequent expression of the adhesion molecule E-selectin in endothelial cells. *Eur J Nutr* **2004**; 43(1):55-9
- 108) Djousse L, Ellison RC, McLennan CE, Cupples LA, Lipinska I, Tofler GH, Gokce N, Vita JA: Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* **1999**; 34(6):660-4
- 109) Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ: A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **1987**; 26(10):2657-64
- 110) Donahue RP, Abot RD, Reed DM, Yano K: Alcohol and hemorrhagic stroke: the Honolulu Heart Program. *JAMA* **1986**; 255:2311-4
- 111) Dörner K: *Klinische Chemie*. Enke Verlag **1992**; 2. Aufl.:74-7
- 112) Duell PB, Malinow MR: Homocyst(e)ine: an important risk factor for atherosclerotic vascular disease. *Curr Opin Lipidol* **1997**; 8(1):28-34
- 113) Dyer AR, Stamler J, Paul O, Berkson DM, Lepper MH, Shekelle RB, McKean H, Garside D: Alcohol consumption and 17-year mortality in the Chicago Western Electric Company Study. *Prev Med* **1980**; 9: 78-90

- 114) Dzau VJ: Atherosclerosis and hypertension : mechanisms and interrelationships. *J Cardiovasc Pharmacol* **1990**; 15 (Suppl 5):S59-S64
- 115) Dzeidzie SZ, Hudson BJB: Polyhydroxychalcones and flavanones as antioxidants for edible foods. *Food Chem* **1983**; 12:205-12
- 116) Eastwood MA: A molecular biological basis for the nutritional and pharmacological benefits of dietary plants. *QJM* **2001**; 94(1):45-8
- 117) Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank GD, Motley ED, Eguchi K, Marumo F, Hirata Y, Inagami T: Intracellular signalling of angiotensin II-induced P70 S6 kinase phosphorylation at SER411 in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, RAS, extracellular signal-regulated kinase and Akt. *J Biol Chem* **1999**; 274:36843-51
- 118) Ehrendorfer F: Übersicht des Pflanzenreiches : Dicotyledonae, Rosidae. In: Strasburger E; Noll F, Schenck H, Schimper AFW, von Denffer D, Ziegler H, Ehrendorfer F: *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag **1983**; 32.Aufl.:864-5
- 119) El Mowafy AM; White RE: Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: Reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett* **1999**; 45:63-7
- 120) Elwood PC, Renaud S, Sharp DS, Beswick AD, O'Brien J, Yarnell JW: Ischaemic heart disease and platelet aggregability: The Caerphilly collaborative heart disease study. *Circulation* **1991**; 83:38-44
- 121) Ernst E: Plasmafibrinogen- an independent cardiovascular risk factor. *J Intern Med* **1990**; 227:365
- 122) Fagiotto A, Ross R, Harker L: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* **1984**; 4:323-40
- 123) Fagiotto A, Ross R : Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* **1984**; 4:341-56
- 124) Fan S, Wei D, Liu J, Xin X, Tung W, Miwa N: Ascorbic acid-2-o-phosphate-6-o-palmitate protecting the human umbilical cord vein endothelial cells against hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide induced cytotoxicity. *Biomed Pharmacother* **2004**; 58(3):205-11
- 125) Farkas E, Luiten PG: Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **2001**; 64:575-611
- 126) Farrer LA, Cupples LA, Haines JL: Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* **1997**; 278:1349-56
- 127) Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrieri, Decendit A, Merillon JM: Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci* **1997**; 61(21):2103-10
- 128) Favot L, Martin S, Keravis T, Andraiantsitohaina R, Lugnier C: Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc Res* **2003**; 59(2):479-87
- 129) Feig LA: The many roads that lead to ras. *Science* **1993**; 260:767-8

- 130) Feig LA, Schaffhausen B: The hunt for Ras targets. *Nature* **1994**; 370:508-9
- 131) Fenech M, Stockley C, Aitken C: Moderate wine consumption protect against hydrogen peroxid-induced DNA damage. *Mutagenesis* **1997**; 12(4):289-96
- 132) Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW: Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (cafe) and related compounds. *Biochem Pharmacol* **1994**; 48:595-608
- 133) Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK: Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **1991**; 253:401-6
- 134) Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG: Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* **1993**; 265(2 Pt2):H 774-8
- 135) Fleckenstein B : Onkoviren. In: Brandis H, Köhler W, Egger HJ, Pulverer G: *Medizinische Mikrobiologie*. Gustav-Fischer-Verlag **1994**; 7. Aufl.:874-7
- 136) Flesch M, Erdmann E, Böhm M: Alkohol und Myokardinfarkt. Epidemiologische und experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Alkohol auf Gefäßrelaxation und Koronarsklerose. *Dtsch Med Wochenschr* **1998**; 123:1490-96
- 137) Flesch M, Schwarz A, Böhm M: Different effects of red and white wine on endothelial-dependent vasorelaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* **1998**; 275:H1183-H1190
- 138) Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ: Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* **2000**; 156(2):361-81
- 139) Folkman J: Ausschaltung der Blutversorgung von Tumoren. *Spekt d Wiss Spezial Krebsmedizin* **1996**; 91-9
- 140) Folts JD, Begolli B, Shanmuganayagam D, Osman H, Maatej N: Inhibition of platelet activity with red wine and grape products. *Biofactors* **1997**; 6(4):411-4
- 141) Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O: Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide-reductase. *FEBS Lett* **1998**; 421(3):277-9
- 142) Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF: *Pathophysiologie*; Springer Verlag; **2000**; 23
- 143) Formica JV, Regelson W: Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* **1995**; 33:1061-80
- 144) Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K: *Pharmakologie und Toxikologie*. 7. Aufl.: **1996**; BI Wissenschaftsverlag Mannheim: 153-4
- 145) Förstermann U, Boissel J-P, Kleinert H: Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **1998**; 12:773-90
- 146) Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **1993**; 341(8852):1103-4

- 147) Fremont L, Belguendouz L, Delpal S: Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* **1999**; 64(26):2511-21
- 148) Fried LP, Moore RD, Pearson TA: Long term effects of cigarette smoking and moderate alcohol consumption on coronary artery diameter. Mechanisms of coronary artery disease independent of atherosclerosis or thrombosis. *Am J Med* **1986**; 80(1):37-44
- 149) Friedman LA, Kimball AW: Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. *Am J Epidemiol* **1986**; 24:481-9
- 150) Fu W, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C: Red wine prevents homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. *J Surg Res* **2003**; 115(1):82-91
- 151) Fuhrmann B, Lavy A, Aviram M: Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* **1995**; 61:549-54
- 152) Fukuda S, Kaga S, Sasaki H, Zhan L, Zhu L, Otani H, Kalfin R, Das D, Maulik N: Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction. *J Mol Cell Cardiol* **2004**; 36(4):547-59
- 153) Furchgott RF: Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. *Circ Res* **1983**; 53:557-73
- 154) Furutani Y, Nomura M, Notake Y, Oyamada C, Larsen CG, Oppenheim JJ, Matsushima K: Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Biochem Biophys Res Commun* **1989**; 159:249-55
- 155) Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ: Cancer chemoprevention and apoptosis in mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact* **2000**; 17(1-4):311-49
- 156) Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL: Moderate alcohol-intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* **1993**; 329:1829-34
- 157) Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL: Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**; 94(25):14138-43
- 158) Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II induces hypertrophy not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* **1988**; 62:749-56
- 159) Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG: Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase 7. *J Biol Chem* **1999**; 274(40):28379-84
- 160) Giasson E, Meloche S: Role of P70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **1995**; 270:5225-31
- 161) Giovanucci E: Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer : review of the epidemiology. *J Natl Cancer Inst (USA)* **1999**; 91(4):317-31

- 162) Goldberg DM, Hahn JE, Parkes JG : Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chem Acta* **1995**; 237(1-2):155-87
- 163) Goldberg DM: More on antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin Chem* **1996**; 42(1):113-4
- 164) Goldberg DM, Garovic-Kocic V, Diamandis EP, Pace-Asciak CR: Wine: does the colour count? *Clin Chim Acta* **1996**; 246(1-2):183-93
- 165) Goldberg DM, Soleas GJ, Levesque M: Moderate alcohol consumption: the gentle face of Janus. *Clin Biochem* **1999**; 32(7):505-18
- 166) Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ: Phenolic constituents, furans, and total antioxidative status of distilled spirit. *J Agric Food Chem* **1999**; 47(10):3978-85
- 167) Gottlieb AI, Langille BL, Wong MKK, Kim DW: Biology of disease: structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest* **1991**; 65(2):123-36
- 168) Gottschalk H: *Lexikon der Mythologie*. W. Heyne Verlag München **1979**; 154-5
- 169) Graziano MP, Freissmuth M , Gilman AG: Purification of recombinant Gs alpha. *Methods Enzymol* **1991**; 195:192-202
- 170) Groenbaek M, Dies A, Sorensen TIA, Becker U, Schnohr P, Jensen G: Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *Br Med J* **1995**; 310:1165-9
- 171) Groß M: p53 – Selbstmordknopf für defekte Zellen. *Spektr d Wiss* **2000**;11:14
- 172) Grossman M: Inhibitory effects of Phloretin on histamin release from isolated rat mast cells. *Agents Actions* **1988**; 25:284-90
- 173) Gustin M, Albertyn J, Alexander M, Davenport L: Map kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**; 62(4):1264-300
- 174) Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM: Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and 70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **2002**; 62: 772-7
- 175) Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM: Resveratrol increases serine¹⁵-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **2003**; 63:925-32
- 176) Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kinell H, Vornam B, Wiese W, Schnelzer E, Schreier PH, Stocker RH: Disease resistance results from foreign phytoalexins in a novel plant. *Nature* **1993**; 361(6408):153-6
- 177) Hansaki Y, Ogawa S, Fukui S: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol Med* **1994**, 16:845-50
- 178) Hanson PI, Schulman H: Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinases. *Ann Rev Biochem* **1992**; 61:559-601

- 179) Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Ando A, Kotani K, Kitamura T, Kitamura Y, Ueda H, Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT, Dhand R, Clark AE, Holman GD, Waterfield MD, Kasuga M: 1-Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**; 91(16):7415-9
- 180) Hara Y: The effect of tea polyphenols on cardiovascular disease. *Prev Med* **1992**; 21:333
- 181) Harborne JB: Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: *Plant flavonoids in biology and medicine 2: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. Alan R. Liss, New York, NY USA; **1986**; 15-24
- 182) Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M: Reduced progression of atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols Quercetin or Catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* **1997**; 17(11):2744-52
- 183) Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simmons ML: Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* **2003**; 348(12):1104-11
- 184) Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP: Nicotine stimulates angiogenesis and promoted tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* **2001**; 7(7):833-9
- 185) Hegsted DM, Ausman LM: Diet, alcohol and coronary heart disease in man. *J Nutr* **1988**; 118:1184-9
- 186) Heldin CH, Westermark B: Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* **1984**; 37(1):9-20
- 187) Hendriks HF, van der Gaag MS: Alcohol, coagulation and fibrinolysis. *Novartis Found Symp* **1998**; 216:111-20
- 188) Herold G (Hrsg.) und Mitarbeiter: Innere Medizin. Im Eigenverlag **1997**; 178-9
- 189) Hertog MGL, Feskens EJM, Hollmann PCH, Katan MB, Kromhout D: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **1993**; 342:1007-11
- 190) Hertog MGL, Hollmann PCH, van der Putte B: Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem* **1993**; 41:1242-1246
- 191) Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollmann PCH, Katan MB: Flavonoide intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* **1995**; 155:381-86
- 192) Hiles ID, Otsu M, Violinia S, Fry MJ, Gout I, Dhaud R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF: Phosphatidylinositol 3-Kinase; structure and expression of the 110 kD catalytic subunit. *Cell* **1992**; 70(3):419-29
- 193) Hixon ML, Muro-Cacho C, Wagner MW, Obejero-Paz C, Millie E, Fujio Y, Kureishi Y, Hassold T, Walsh K, Gualberto A: Akt1/PKB upregulation leads

- to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest* **2000**; 106:1011-20
- 194) Hodnick WF, Milosavljevic EB, Nelson JH, Pardini RS: Electrochemistry of flavonoids: Relationship between redox potential, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radical by flavonoids. *Biochem Pharmacol* **1988**; 37:2607-11
 - 195) Hofman A, Ott A, Breteler MM: Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* **1997**; 349:151-4
 - 196) Hollenberg NK: Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Curr Hypertens Rep* **2003**; 5(4):287-8
 - 197) Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB: Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Transactions* **1996**; 24:785-90
 - 198) Hope WC, Welton AF, Fiedler-Nagy C, Batula-Bernardo C, Coffey JW: In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipooxygenase activity of quercetin. *Biochem Pharmacol* **1983**; 32:367-71
 - 199) Horwitz AF: Integrins and health. *Sci Am (US)* **1997**; 276(5):68-75
 - 200) Hsieh TC, Juan G, Darzynkiewicz Z, Wu JM: Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21 (WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2. *Cancer Res* **1999**; 59(11):2596-601
 - 201) Hu B, Finsinger D, Peter K, Guttenberg Z, Barmann M, Kessler H, Escherich A, Moroder L, Bohm J, Baumeister W, Sui SF, Sackmann E: Intervesicle crosslinking with integrin alpha IIb beta 3 and cyclic RGD-lipopeptide. A model of cell adhesion processes. *Biochemistry* **2000**; 39(40):12284-94
 - 202) Huang XY, Morielli AD, Peralta EG: Molecular basis of cardiac potassium channel stimulation by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**; 91(2):624-8
 - 203) Iio M, Ono Y, Kai S, Fukumoto M: Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome C reduction by milk xanthine oxidase. *J Nutr Sci Vitaminol* **1986**; 32:635-42
 - 204) Ikura M, Clore GM, Groneborn AM, Zhu G, Klee CB, Bax A: A solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* **1992**; 256:632-8
 - 205) Innes G: Cost-effectiveness of beer versus red wine for the prevention of symptomatic coronary artery disease. *CMAJ* **1998**; 159(12):1463-6
 - 206) Ip C, Lisk DJ: Enrichment of selenium in allium vegetables for cancer prevention. *Carcinogenesis* **1994**; 15(9):1881-5
 - 207) Jackson CL, Schwartz SM: Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension* **1992**; 20: 713-36
 - 208) Jahangeer S, Rodbell M: The disaggregation theory of signal transduction revisited: further evidence that G proteins are multimeric and disaggregate

- to monomers when activated. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**; 90(19):8782-6
- 209) Jahroudi N, Greenberger JS: The role of endothelial cells in tumor invasion and metastasis. *J Neurooncol* **1995**; 23(2):99-108
- 210) Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM: Cancer chemopreventive activity of Resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **1997**; 275:218-21
- 211) Janssen O, Pfaff K: Allicin-Freisetzung und Lagerungsstabilität. *Dt Apoth Z* **1991**; Supplement 24
- 212) Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D: In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins - cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Drug Res* **1993**; 43 (II):1221-7
- 213) Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves D: Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* **1992**; 148:2423-8
- 214) Jimenez JL, Punzon C, Navarro J, Angeles Muñoz-Fernandes M, Fresno M: Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting Nuclear Factor- κ B and Nuclear Factor of Activated T cells activation. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**; 229(2):753-9
- 215) Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK: Regional accumulation of T-cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* **1986**; 6:131-8
- 216) Kagan A, Harris BR, Winkelstein W: Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics. *J Chron Dis* **1974**; 7:345-64
- 217) Keil U, Chambless LE, Döring A, Filipiak B, Stieber J: The relation of alcohol intake to coronary heart disease and all-cause mortality in a beer-drinking population. *Epidemiology* **1997**; 8:150-6
- 218) Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R, Vollmar AM: Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide activated human blood thereby inhibiting NF- κ B activity. *J Nutr* **2003**; 133(7):2171-5
- 219) Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D: Dietary Flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. The Zutphen Study. *Arch Intern Med* **1996**; 156:637-42
- 220) Kerry NL, Abbey M: Red wine and functional phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* **1997**; 135(1):93-102
- 221) Kessel M, Gruss P: Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **1991**; 67:1-2
- 222) Kessler H: Hoffnung auf neues Krebsmedikament. *Spekt d Wiss* **2000**; 11:48-53
- 223) Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK, Ryu DG, Chung SY, Jung BH, Kim YK, Moon G, Park R. Activation of caspase cascades in

- Korean mistletoe (*Viscum album* var. *Coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen Pharmacol* **2000**; 34(5):349-55
- 224) Kinch MS, Geoffrey JC, Der CJ, Burrige JR: Tyrosine phosphorylation regulates the adhesion of Ras-transformed breast epithels. *J Cell Biol* **1995**; 130(2):461-71
- 225) Kiraly-Veghely Z, Tyihak E, Albert C, Nemeth ZI, Katay G: Identification and measurement of resveratrol and formaldehyde in parts of white and blue grape berries. *Acta Biol Hung* **1998**; 49(2-4):281-9
- 226) Klatsky AL, Friedman GD, Siegelau AB: Alcohol use and cardiovascular disease: the Kaiser-Permante experience. *Circulation* **1992**; 117:646-54
- 227) Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J: Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Brit Med J* **1996**; 312:478-81
- 228) Knippers R: *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag **1985**; 4.Aufl.:226-30
- 229) Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM: Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **1992**; 90:772-9
- 230) Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T: SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **1991**; 252:668-74
- 231) Koegl M, Kypta RM, Bergman M, Alitalo K, Courtneidge SA: Rapid and efficient purification of Src homology 2 domain-containing proteins: Fyn, Csk and phosphatidylinositol 3-kinase p85. *Biochem J* **1994**; 302(Pt 3):737-44
- 232) Kozarevic D, Vojvodic N, Gordon T, Kaelber CT, McGee D, Zukel WJ: Drinking habits and death. The Yugoslavia cardiovascular disease study. *Int J Epidemiol* **1983**; 12(2):145-50
- 233) Kretsinger RH: Calcium coordination and the calmodulin fold : divergent versus convergent evolution. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **1987**; 52:499-510
- 234) Kris-Etherton P, Eckel R, Howard B, Jeor SS, Bazzarre TL: Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **2001**; 103:1823
- 235) Kromhout D, Keys A, Aravanis C: Food consumption patterns in the 1960s in seven countries. *Am J Clin Nutr* **1989**; 49:889-94
- 236) Kyhse-Andersen J: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* **1984**; 10:203-9
- 237) Kühnau J: The Flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *Wld Rev Nutr Diet* **1976**; 24:117-91
- 238) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **1970**; 227:680-5
- 239) Lalli E, Sassone-Corsi P: Signal transduction and gene regulation: The nuclear response to cAMP. *J Biol Chem* **1994**; 169(26):17359-62

- 240) Lamartiniere CA, Moore JB, Brown NM, Thompson R, Hardin MJ, Barnes S: Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* **1995**; 16:1049-55
- 241) Lammers R, Bossenmaier B, Cool DE, Tonks NK, Schlessinger J, Fischer EH, Ullrich A: Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem* **1993**; 268(30):22456-62
- 242) Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B, Dejana E: Molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential associations of plakoglobin, -catenin, and -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* **1995**; 129:203-17
- 243) Lamuela-Raventos RM, de la Torre-Boronat MC: Beneficial effects of white wines. *Drugs Exp Clin Res* **1999**; 25(2-3):121-4
- 244) Lang F: Pathophysiologie und Pathobiochemie. Enke-Verlag; **1990**; 294
- 245) Langer RD, Criqui MH, Reed DM: Lipoproteins and blood pressure as biological pathways for effect of moderate alcohol consumption on coronary heart disease. *Circulation* **1992**; 85:910-5
- 246) Langman J: Medizinische Embryologie, Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie Bd. IV. 8. überarbeitete Aufl. **1994**; Thieme Verlag; 230
- 247) Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR: Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics Quercetin, Gossypol and Myricetin. *Biochem Pharm* **1989**; 38:2859-65
- 248) Lazarus NB, Kaplan GA, Cohen RD, Diing-Jen L: Change in alcohol consumption and risk of death from all causes and from ischaemic heart disease. *Br Med J* **1991**; 303:553-6
- 249) Leighton F, Cuevas A, Guasch Y, Perez DD, Strobel P, San Martin A, Urzua U, Diez MS, Foncea R, Castillo O, Mizon C, Espinoza MA, Urquiaga I, Rozowski J, Maiz A, Germain A: Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res* **1999**; 25(2-3):133-41
- 250) Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM: Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* **2002**; 106(13):1614-7
- 251) Leonhardt H: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie Bd.3. 8. überarb. Aufl. **1990**; Thieme Verlag:220 ff
- 252) Libby P, Warner SJC, Salomon RN, Birinyi LK: Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med* **1988**; 318:1493-8
- 253) Libby P, Friedman GB, Salomon RN: Cytokines as modulators of cell proliferation in fibrotic diseases. *Am Rev Respir Dis* **1989**; 140:1114-7
- 254) Libby P, Hansson GK: Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* **1991**; 64:5-15
- 255) Li H, Förstermann U: Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* **2000**; 190:244-54

- 256) Liu M, Simon MI: Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature* **1996**; 382(6586):83-7
- 257) Loher F, Schmall K, Freytag P, Landauer N, Hallwachs R, Bauer C, Siegmund B, Rieder F, Lehr HA, Dauer M, Kapp JF, Endres S, Eigler A: The specific type-4 phosphodiesterase mesopram alleviates experimental colitis in mice. *J Pharm Exp Ther* **2003**; 305(2):549-56
- 258) Lolito SB, Fraga CG: (+)-Catechin as antioxidant: mechanisms preventing human plasma oxidation and acting in red wines. *Biofactors* **1999**; 10(2-3):125-30
- 259) Loskutoff DJ, Curriden SA: The fibrinolytic system of the vessel wall and its role in the control of thrombosis. *Ann NY Acad Sci* **1990**; 598:238-47
- 260) Lugasi A, Blazovics A, Dworschk E, Feher J: Cardio-protective effect of red wine as reflected in the literature. *Orv Hetil* **1997**; 138(11):637-8
- 261) Lukacs NW, Strieter RM, Elnor V, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel DSL: Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 during monocyte-endothelial cell interactions. *Blood* **1995**; 86:2767-73
- 262) Lüscher TF: Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Hypertens* **1990**; 3:317-30
- 263) Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY: Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* **2000**; 102(5):635-46
- 264) Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB: The systematic identification of flavonoids. Springer, New York, **1970**
- 265) Maisel AS, Motulsky HJ, Insel PA: Cardiac alpha 1 and beta-adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol* **1987**; 36(1):1-6
- 266) Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesey C: Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr Res* **1996**; 16:517-44
- 267) Mannig DR, Gilman AG: The regulatory component of adenylat cyclase and transducin. A family of stucturally homologous guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem* **1983**; 258(11):7059-63
- 268) Markham KR: Flavones, Flavonols and their glycosides. In: Harbourne JB (Ed). *Methods in plant biochemistry. Vol 1, Plant phenolics*. New York academic press **1989**:197-235
- 269) Martin S, Andriambelason E, Takeda K, Andriantsitohaina 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* **2002**; 135(6):1579-87
- 270) Martin S, Favot L, Matz R, Lugnier C, Andriantsitohaina R: Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2. *Biochem Pharmacol* **2003**; 65(4):669-75
- 271) Martin S, Giannone G, Andriantsitohaina R, Martinez MC: Delphinidin, an active component of red wine, inhibits endothelial cell apoptosis via nitric oxide pathway and regulation of calcium homeostasis. *Br J Pharmacol* **2003**; 139(6):1095-102
- 272) Maulik N, Engelman D, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton DW, Gorbunov NV, Elsayed NM, Kagan VE, Das DK: Nitric

- oxide/carbon monoxide: a free radical-dependent molecular switch for myocardial preservation during ischemic arrest. *Circulation* **1996**;94:398-406
- 273) Maxwell SR: Women and heart disease. *Basic Res Cardiol* **1998**; 93:79-84
- 274) Mazza G: Anthocyanins in grapes and grape-products. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1995**; 35:341-71
- 275) McGuire TF, Corey SJ, Sebti SM: Lovastatin inhibits platelet-derived growth factor (PDGF) stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity as well as association of p85 subunit to tyrosine-phosphorylated PDGF receptor. *J Biol Chem* **1993**; 268(30):22227-30
- 276) Mendelsohn ME, Karas RH: The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* **1999**; 340:1801-11
- 277) Mendes A, Desgranges C, Cheze C, Vercauteren J, Freslon JL: Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fundam Clin Pharmacol* **2003**; 17(6):673-81
- 278) Meyers Großes Handlexikon. 14. Aufl.; **1985**; Meyers Lexikonverlag
- 279) Middleton E, Drzewiecki G, Krishnarao D: Quercetin: An inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *J Immunol* **1981**; 127:546-50
- 280) Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC: The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* **2000**; 52:673-51
- 281) Mikoshiba K: Inositol 1,4,5-triphosphate receptors. *Trends Pharmacol Sci* **1993**;14:86-9
- 282) Mills BJ, Weiss MM, Lang LA, Liu MC, Ziegler C: Blood glutathion and cystein changes in cardiovascular disease. *J Lab Clin Med* **2000**; 135(5):396-401
- 283) Mitzutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y: Extract of wine phenolics improves aortic biomechanical properties in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *J Nutr Sci Vitaminol* **1999**; 45:95-106
- 284) Miyagi M, Nakajima H, Katoh T: Fluorescence spectrum analysis of atherosclerotic plaque using doxycycline. *Jpn Circ J (Australia)* **1999**; 63(5): 374-86
- 285) Miyagi Y, Miwa K, Inoue H: Inhibition of human LDL-oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am J Cardiol* **1997**; 80(12):1627-31
- 286) Miyagi Y, Shinjo S, Nishida R, Miyagi C, Takamatsu K, Yamamoto T, Yamamoto S: Trypsin inhibitor activity in commercial soybean products in Japan. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1997**; 43(5):575-80
- 287) Miyagi Y, Om AS, Chee KM, Bennink MR: Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutr Cancer* **2000**; 36(2):224-9
- 288) Mizuno M: Anti-tumor polysaccharides from mushrooms during storage. *Biofactors* **2000**; 12(1-4):275-81
- 289) Moorby CD, Stoker M, Gherardi E: HGF/SF inhibits junctional communication. *Exp Cell Res* **1995**; 219(2):657-63

- 290) Moore RD, Pearson TA: Moderate alcohol consumption and coronary artery disease. A review. *Medicine (Baltimore)* **1986**; 65(4):242-67
- 291) Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ: Single intraluminal delivery of antisense Cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**; 90:8474-78
- 292) Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski, Folkman J: Angiogenesis inhibitors endostatin and TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **1999**; 99: 1726-32
- 293) Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, Camargo CA Jr., 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* **2003**; 348(2):109-18
- 294) Murase T, Kume N, Hase T, Shibuya Y, Nishizawa Y, Fokimitsu I, Kita T: Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF κ B and expression of leucocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* **1999**; 19(6):1412-20
- 295) Murota SI, Onodera M, Morita I: Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor. *Ann NY Acad Sci* **2000**; 902:208-12
- 296) Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Soclet JC, Schini-Kerth VB: Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxation in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**; 10(2):371-7
- 297) Negrescu EV, Lubber de Quintana K, Siess W: Platelet shape change induced by thrombin receptor activation. *J Biol Chem* **1995**; 270:1057-61
- 298) Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* **1991**; 88:1121-7
- 299) Ng ML, Yap AT: Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med* **2002**; 8(5):581-9
- 300) Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA: Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr* **1998**; 68:258-65
- 301) Ning XH, Ding X, Childs KF, Bolling SF, Gallagher KP: Flavone improves functional recovery after ischemia in isolated reperfused rabbit hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* **1993**; 105:541-9
- 302) Nishizuka Y: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **1992**; 258:607-14
- 303) Nordoy A, Lagarde M, Renaud S: Platelets during hyperlipidaemia induced by cream and cod liver oil. *Eur J Clin Invest* **1984**; 14(5):339-45
- 304) O'Brien MA, Moravec RA, Riss TL: Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *Biotechniques* **2001**; 30(4):886-91

- 305) Obata T, Brown GE, Yaffe MB: MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* **2000**; 28(4 Suppl):N67-77
- 306) Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P: The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effect of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* **2002**; 61:294-302
- 307) Otsu M, Terada Y, Okayama H: Isolation of two members of the rat MAP kinase-kinase gene family. *FEBS Lett* **1993**; 320 (3):246-50
- 308) Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis : implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta (Netherlands)* **1995**; 2365(2):207-19
- 309) Pace-Asciak CR: Wine and grape juice as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta (Netherl)* **1996**; 246(1-2):163-82
- 310) Pai EF, Krengel V, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, Wittinghofer A: Refined crystal structure of the triphosphat conformation of H-ras p21 at 1.35Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J* **1990**; 9:2351-9
- 311) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release account for the biology activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond.)* **1987**; 327:524-6
- 312) Pan MH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Zhu NQ, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin A through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *J Agric Food Chem* **2000**; 48(12):6337-46
- 313) Pan MH, Chang WL, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. *J Agric Food Chem* **2001**; 49(39):1467-74
- 314) Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M: Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers. *Am Heart* **2004**; 147(2):E5
- 315) Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D: Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* **1986**; 6:505-10
- 316) Patel MD, Samelson LE, Lausne RD: Multiple kinases and signal transduction: phosphorylation of the t cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* **1987**; 262:5831-8
- 317) Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C: Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol* **1999**; 69(1-3):71-6
- 318) Pawson T: Protein-tyrosine kinases: new impressions of Src and Hok. *Nature* **1997**; 385:582-5
- 319) Pearson TA, Osorio D, Brown K: Nutritional interventions in cardiovascular disease: new challenges and opportunities. *Curr Atheroscler Rep* **2000**; 2(6):515-20

- 320) Pechánová O, Bernátová I: L-NAME-induced hypertension: possibilities of its prevention and regression. *Physiol Res* **2000**; 49:2P
- 321) Pellegrini N, Pareti FI, Stabile F, Brusamolino A, Simonetti P: Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* **1996**; 50(4):204-13
- 322) Pellegrini N, Simonetti P, Brusamolino A, Bollasso B, Pareti FI: Composition of platelet phospholipids after moderate consumption of red wine in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* **1996**; 50(8):535-44
- 323) Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brighenti F, Pietta P: Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *J Agric Food Chem* **2000**; 48(3):732-5
- 324) Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV: Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**; 19(2):419-26
- 325) Pentz R, Guo Z, Müller B, Aye RD, Siegers CP: Standardisierung von Knoblauchpräparaten. *Dt Apoth Z* **1992**; Supplement 35
- 326) Pfaendler HR: Organische Chemie I. 1. Aufl.; **1986** Verlag Uni-Druck: 96-7
- 327) Plate KH, Mennel HB: Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp Toxicol Pathol* **1995**; 47(2-3):89-94
- 328) Potter JD, Steinmetz K: Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. *IARC Sci Publ* **1996**; 139:61-90
- 329) Pratt DE, Birac PM: Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J Food Sci* **1979**; 44:1720-2
- 330) Pratt D, Hudson BJB: Natural antioxidants not commercially exploited. In: Hudson BJB (Ed). *Food antioxidants*. Elsevier, Amsterdam **1990**:171
- 331) Pschyrembel W, Hildebrandt H, Dornblüth O: Klinisches Wörterbuch, 259. Aufl., **2002** de Gruyter Verlag
- 332) Puchois P, Chalim N, Zylberberg G, Fievet P, Demarquilly C, Fruchart JC: Effect of alcohol intake on human apolipoprotein A-1-containing lipoprotein subfractions. *Arch Intern Med* **1990**; 150:1638-41
- 333) Pullen N, Thomas G: The modular phosphorylation and activation of P70s6k. *FEBS Lett* **1997**; 410:78-82
- 334) Ragazzi E, Frodi G, Fassina G: Resveratrol activity on guinea pig isolated trachea from normal and albumin-sensitized animals. *Pharmacol Res Commun* **1988**; Suppl. 5:79-82
- 335) Rak JW, Croix BD, Kerbel RS: Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anticancer Drugs* **1995**; 6(1):3-18
- 336) Ray PS, Maulik G, Cordis GA: The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* **1999**; 27(1-2):281-9
- 337) Razandi M, Pedram A, Levin ER: Estrogen signals to the preservation of endothelial cells form and function. *J Biol Chem* **2000**; 275(49):38540-6

- 338) Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL: Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activity and function. *J Nutr* **2000**; 130(8):21205-65
- 339) Renaud S, McGregor L; Martin JL: Influence of alcohol on platelet functions in relation to atherosclerosis. In: Pozza G et al., eds.: *Diet, diabetes and atherosclerosis*. New York, Raven Press; **1984**; 177-87
- 340) Renaud S, Dumont E, Baudier F, Ortchanian E, Symington IS: Effect of smoking and dietary saturated fats on platelet functions in Scottish farmers. *Cardiovasc Res* **1985**; 19:155-9
- 341) Renaud S, Morazain R, Godsey F: Nutrients, platelet functions and composition in nine groups of French and British farmers. *Atherosclerosis* **1986**; 60:37-48
- 342) Renaud S, de Logeril M: Dietary lipids and their relation to ischaemic heart disease: from epidemiology to prevention. *J Intern Med* **1989**; 225(S1):39-46
- 343) Renaud S, Beswick AD, Fehily AM, Sharp DS, Elwood PC: Alcohol and platelet aggregation: the Caerphilly prospective heart disease study. *Am J Nutr* **1992**; 55:1012-7
- 344) Renaud S, de Logeril M: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**; 339:1523-6
- 345) Renaud S, Gueguen R, Siest G, Salamon R: Wine, beer and mortality in middle-aged men from eastern France. *Arch Intern Med* **1999**; 159:1865-70
- 346) Rhee SG: Inositol phospholipid-specific phospholipase C: interaction of the gamma 1 isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem Sci* **1991**; 16:297-301
- 347) Rhee SG, Choi KD: Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* **1992**; 267:12393-6
- 348) Ribeiro-Neto FA, Rodbell M: Pertussis toxin induces structural changes in G alpha proteins independently of ADP-ribosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**; 87(3):1208-12
- 349) Rice-Evans C, Miller NJ, Bolwell GP, Bramley PM, Pridham JB: The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* **1995**; 22:375-83
- 350) Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J: Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* **1998**; 351:88-92
- 351) Riede UN, Wiestler OD, Müller HJ: Autonomes Zellwachstum. In: Riede UN, Schaefer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Auflage **1995**; Georg Thieme Verlag:351-2 u. 363
- 352) Riede UN, Wiestler OD, Müller HJ: Autonomes Zellwachstum. In: Riede UN, Schaefer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Auflage **1995**; Georg Thieme Verlag:467-8
- 353) Ridley A: Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Gen Develop* **1995**; 5:24-30

- 354) Rifci VA, Stephan EM, Schneider SH, Khachdourian AK: Red wine inhibits the cell mediated oxidation of LDL and HDL. *J Am Coll Nutr* **1999**; 18(2):137-43
- 355) Rimm EB, Giovannucci FL, Willett WC: Prospective Study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* **1991**; 338:464-86
- 356) Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC: Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* **1996**; 125:384-9
- 357) Rochlitz H, Voigt A, Lankat-Buttgereit B, Goke B, Heimberg H, Nauck MA, Schiemann U, Schatz H, Pfeiffer AF: Cloning and quantitative determination of the human Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II (CAMK II) isoforms in human β cells. *Diabetologia* **2000**; 43(4):465-73
- 358) Rodbell M, Lad PM, Nielsen TB: The structure of adenylat cyclase systems. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **1981**; 45(14):3-14
- 359) Rodbell M: Structure-function relationships in adenylat cyclase systems. *Ciba Found Symp (Netherl)* **1982**; 90:3-21
- 360) Rodbell M: The complex structure and function of G proteins in cellular communication. *Bull Mem Acad R Med Belg (Belgium)* **1995**; 150(79):316-9
- 361) Roher AE, Esh C, Kokjohn TA: Circle of willis atherosclerosis is a risk factor for sporadic Alzheimer's disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; 23:2055-62
- 362) Rollins BJ, Yoshimura T, Leonhard EJ, Pober JS: Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1-JE. *Am J Pathol* **1990**; 136:1229-33
- 363) Rollins BJ: JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells* **1991**; 12:517-24
- 364) Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Ann Rev Physiol* **1995**; 57:791-804
- 365) Ross R, Glomset JA: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* **1973**; 180:1332-9
- 366) Rudel LL, Leathers CW, Bond MG, Bullock BC: Dietary ethanol-induced modification in hyperlipoproteinaemia and atherosclerosis in nonhuman primate (*Macaca nemestrina*). *Atherosclerosis* **1981**; 1:144-55
- 367) Ruf JC: Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. *Drugs Exp Clin Res* **1999**; 25(2-3):125-31
- 368) Rump AF, Schussler M, Acar D, Cordes A, Ratke R, Theisohn M, Rosen R, Klaus W, Fricke U: Effect of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *Gen Pharmacol* **1995**; 26(3):603-11
- 369) Russell KS, Hayes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR: Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol which mediate rapid intracellular signalling. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **2000**; 97(11):593-5
- 370) Saklatvala J, Rawlinson L, Waller RJ, Sarsfield S, Lee JC, Morton LF, Barnes MJ, Farndale RW: Role for p38 mitogen-activated protein kinase in

- platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J Biol Chem* **1996**; 271(12):6586-9
- 371) Samelson LE, Patel MD, Weissmann AM, Harford JB, Klausner RD: Antigen activation of murine t-cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T-cell antigen receptor. *Cell* **1986**; 46:1083-90
- 372) Sanhueza J, Valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A: Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **1992**; 78:211-8
- 373) Sankaranarayanan R, Mathew B: Retinoids as cancer-preventive agents. *IARC Sci Publ* **1996**; 139:47-59
- 374) Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK : Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **1999**; 31(6):1289-97
- 375) Savage CR jr, Hash JH, Cohen S: Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. *J Biol Chem* **1973**; 248(22):7669-72
- 376) Saward L, Zahradka P: Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **1997**; 81:249-57
- 377) Schlessinger J, Ullrich A: Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **1992**; 9:383-91
- 378) Schlessinger J: How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* **1993**; 18:273-75
- 379) Schlichting I, Alno SC, Rapp G, Wilson K, Petratos K, Lentfer A, Wittinghofer A, Kabsch W, Pai EF, Petsko GA: Time-resolved x-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein. *Nature* **1990**; 345:309-15
- 380) Schmid-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI: The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept* **2000**; 93:65-77
- 381) Schmidt U, Kuhn U, Ploch M: Efficacy of a Hawthorn (crataegus) preparation LI 132 in 78 patients with chronic congestive heart failure defined as NYHA functional class II. *Phytomedicine* **1994**; 1:17-24
- 382) Schneider Y, Vincent F, Durantou B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, Seiler N, Raul F: Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* **2000**; 158(1):85-91
- 383) Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D: Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* **1996**; 431:379
- 384) Scholl M, Müller S: Health Food: Strategische Überlegungen für einen Eintritt in einen hybriden Pharma-Lebensmittel-Markt. *Pharm Ind* **2004**; 66(3):263-6
- 385) Schramm DD, Pearson DA, German JB: Endothelial cell basal PGI₂ release is stimulated by wine in vitro: one mechanism that may mediate the vasoprotective effects of wine. *J Nutr Biochem* **1997**; 8:647-51
- 386) Schramm DD, Donovan JL, Kelly PA, Waterhouse AL, German JB: Differential effects of small and large molecular weight wine

- phytochemicals on endothelial cell eicosanoid release. Unveröffentlichter Vorab-Druck **1999**
- 387) Schulman H, Hanson PI, Meyer T: Decoding calcium signals by multifunctional CAM kinase. *Cell Calcium* **1992**; 13(6-7):401-11
- 388) Seki N, Kadama J, Hongo A, Miyagi Y: Angiogenesis and platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphatase expression in endometrial cancer. *Int J Oncol* **1999**; 15(4):781-6
- 389) Senault C, Betoulle D, Luc G, Hauw P, Rigaud D, Fumeron : Beneficial effects of moderate consumption of red wine on cell cholesterol efflux in young men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2000**; 10(2):63-9
- 390) Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A: Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* **1998**; 128(6):1003-7
- 391) Shahidi F, Wanasundara PKJ: Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1992**; 32:67-103
- 392) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshner E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **1992**; 359:843-5
- 393) Shimada K, Watanabe H, Hosoda K, Takeuchi K, Yoshikawa Y: Effect of red wine on coronary flow-velocity reserve. *Lancet* **1999**; 354(9183):1002
- 394) Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zacharine COC, Matsushima K: Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-2 and tumor necrosis factor. *J Immunol* **1990**; 144:3034-8
- 395) Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio AG, Bonomo RP: In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂. *Free Radic Biol Med* **1991**; 11:1-8
- 396) Simon MA, Dodson GS, Rubin GM: An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and sos proteins in vitro. *Cell* **1993**; 73:169-77
- 397) Singh AK, Sidhu GS, Deepa T, Maheshwari RK: Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cells. *Cancer Lett* **1996**; 107(1):109-15
- 398) Slater SJ, Seiz JL, Cook AC, Stagliano BA, Buzas CJ: Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochim Biophys Acta* **2003**; 1637(1):59-69
- 399) Slater SJ, Cook AC, Seiz JL; Malinowski SA, Stagliano BA, Stubbs CD: Effects of ethanol on protein kinase C alpha activity induced by association with Rho GTPases. *Biochemistry* **2003**; 42(41):12105-14
- 400) Soldani C, Lazze MC, Bottone MG, Tognon G, Biggiogera M, Pellicciari CE, Scovassi AI: Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp Cell Res* **2001**; 269(2):193-201
- 401) Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* **1997**; 11(5):287-313
- 402) Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* **1997**; 30:91-113

- 403) St Leger AS, Cochrane AL, Moore F: Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* **1979**; 1:1017-20
- 404) Staubs PA, Reichart DR, Saltiel AR, Milarski KL, Maegawa H, Berhanu P, Olefsky JM, Seely BL: Localization of the insulin receptor binding sites for the SH2 domain proteins p85, Syp, and GAP. *Biol Chem* **1994**; 269(44):27186-92
- 405) Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD: Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* **1999**; 100(10):1050-5
- 406) Steinberg D: The cholesterol controversy is over. Why did it take so long? *Circulation* **1989**; 80:1070-8
- 407) Steinberg D: Antioxidants and atherosclerosis. *Circulation* **1991**; 84:1420-5
- 408) Steinberg D: Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* **2002**; 8: 1211-17
- 409) Sternweis PC, Smrcka AV: Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci* **1992**; 17:502-6
- 410) Stille W, Dittmann R: Arteriosclerosis as a sequela of chronic Chlamydia pneumoniae infection. *Herz* **1998**; 23(3):185-92
- 411) Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E: Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem* **2001**; 276:22586-94
- 412) Stoclet JC: Bonum vinum laetificat cor hominum. *Med Sci Monit* **2001**; 4:842-7
- 413) Stryer L, Bourne HR: G proteins: a family of signal transducers. *Ann Rev Cell Biol* **1986**; 2:391-419
- 414) Suarez Garcia I, Gomez Cerezo JF, Rios Blanco JJ, Barbado Hernandez FJ, Vazquez Rodriguez JJ: Homocysteine. The cardio-vascular risk factor of the next millenium? *An Med Intern* **2001**; 18(4):211-7
- 415) Sueishi K, Yonemitsu Y, Nakagawa K, Kaneda Y, Kumamoto M, Nakashima Y: Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. *Ann N Y Acad Sci* **1997**; 811:311-24
- 416) Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ: Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* **1999**; 140(1-2):1-10
- 417) Tabin CJ: Retinoids, homeoboxes, and growth factors : toward molecular models for limb development. *Cell* **1991**; 66:199-200
- 418) Takahashi T, Kawahara Y, Okuda M, Ueno H, Takeshita A, Yokoyama M: Angiotensin II stimulates mitogen-activated protein kinases and protein synthesis by a RAS-independent pathway in vascular smooth muscle cells *J Biol Chem* **1997**; 272:16018-22

- 419) Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y, Yokoyama M: Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am Physiol* **1999**; 276:H1927-34
- 420) Takeya M, Yoshimura T, Leonhard EJ, Takahashi K: Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody. *Hum Pathol* **1993**; 23:534-9
- 421) Tannapfel A, Wittekind C, Tahara E: Effect of hepatocyte growth factor (HGF)/scatter factor (SF) on cell adhesion in gastric cancer. *Z Gastroenterol* **1994**; 32(2):91-3
- 422) Taubmann MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y: Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* **1997**; 78:200-4
- 423) Teixeira MM, Gristwood J, Cooper N, Hellewell PG: Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? *TIPS* **1997**, 18:164-70
- 424) Tham DM, Gardner CD, Haskell WL: Clinical review 97 : Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol/Metab* **1998**; 83(7):2223-35
- 425) Thaulow E, Erikssen J, Sandvik, Stormorken H, Cohn PF: Blood platelet configuration and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* **1991**; 84:613-7
- 426) Thomas L: *Labor und Diagnose*, 5. Aufl. **1998**; TH Books Verlagsgesellschaft: 504-5
- 427) Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW, Doll R: Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N Engl J Med* **1997**; 337: 1705-14
- 428) Tredici G, Miloso M, Nicolini G, Galbiati S, Cavaletti G, Bertelli A: Resveratrol, Map kinases and neuronal cells : might wine be a neuroprotectant? *Drugs Exp Clin Res* **1999**; 25(2-3):99-103
- 429) Trevillyan JM, Lu Y, Atluru D, Philipps CA, Bjorndahl JM: Differential inhibitors of T cell receptor signal transduction and early activation events by a selective inhibitor of protein-tyrosine kinase. *J Immunol* **1990**; 145:3223-30
- 430) Trichopoulou A, Vasilopoulou E: Mediterranean diet and longevity. *Br J Nutr*, **2000**; 840007-1145: S205-9
- 431) Turner SJ, Domin J, Waterfield MD, Ward SG, Westwick J: The CC chemokine monocyte chemoattractant peptide-1 activates both the class I p85/p110 phosphatidylinositol 3-kinase and the class II PI3K-C2 alpha. *J Biol Chem* **1998**; 273(40):25987-95
- 432) Turrens JF, Lariccia J, Nair MG: Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats. *Free Radic Res* **1997**; 27(6):557-62
- 433) Ulbricht TLV, Southgate DAT: Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* **1991**; 338:985-92
- 434) Ullrich A, Riedel H, Yarden Y, Coussens L, Gray A, Pull T, Schlessinger J, Waterfield MD, Parker PJ: Protein kinases in cellular signal transduction,

- tyrosine kinase growth factor receptors and protein kinase C. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **1986**; 51Pt2:713-24
- 435) Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK: P38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* **1998**; 273:15022-29
- 436) Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK: Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **1999**; 274:22699-704
- 437) Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: P22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **1996**; 271: 23317-21
- 438) Vagnucci AH, Li WW: Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet* **2003**; 361:605-8
- 439) Van der Gaag MS, den Berg R, den Berg H, Schaafsma G, Hendriks HF: Moderate consumption of beer, red wine and spirits has a counteracting effect on plasma antioxidants in middle-aged men. *Eur J Clin Nutr* **2000**; 54(7):588-91
- 440) Van der Gaag MS, Ubbink JB, Sillanaukee P, Nikkari S, Hendriks HF: Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine.[Letter] *Lancet* **2000**; 355(9214):1522
- 441) Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD: Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* **1997**; 22(7):267-72
- 442) Van Jaarsveld H, Kuyl HM, Schulenburg DH: Effect of flavonoids on the outcome of myocardial mitochondrial ischemia/reperfusion injury. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **1996**; 91:65-75
- 443) Van Poppel G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA: Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **1999**; 472:159-68
- 444) Vasse M, Pourtau J, Trochon V: Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1999**; 19:1835-42
- 445) Vermeer SE, Prins ND, den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM: Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N Engl J Med* **2003**; 248:1215-22
- 446) Wade DP, Owen JS: Regulation of the cholesterol efflux gene, ABCA1. *Lancet* **2001**; 357:161-3
- 447) Wagner H: *Pharmazeutische Biologie*. 5. Aufl. **1993**, Gustav Fischer Verlag, Frankfurt a. M.
- 448) Waksman G, Shoelson SE, Pant N, Cowburn D, Kariyan J: Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the SrcSH2 domain: crystal structure of the complexed and peptide-free forms. *Cell* **1993**; 72:779-90
- 449) Walle T, Otake Y, Walle UK, Wilson FA: Quercetin glycosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J Nutr* **2000**; 130(11):2658-61

- 450) Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U: Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* **2003**; 41(3):471-8
- 451) Wan YW, Kurosaki T, Huang XY: Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G protein-coupled receptors. *Nature* **1996**; 380(6574):541-46
- 452) Wang G, Siow YL, O K: Homocystein induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kappa B in THP-1 macrophages. *Am J Heart Circ Physiol* **2001**; 280(6):H2840-7
- 453) Wang H, Joseph JA: Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12. *Free Radic Biol Med* **1999**; 27(5-6):683-94
- 454) Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL: A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechine and oxidative damage. *J Nutr* **2000**; 130 (8S Suppl):2115 S-2119 S
- 455) Wempe F, Lindner V, Augustin HG : Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulates the expression of the CC chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in autocrine-activated endothelial cells. *Arteriosclerosis Thr Vasc Biol* **1997**; 17(11):2471-8
- 456) Wennstrom S, Hawkins PT, Cooke F, Hara K, Yonezawa K, Kasuga M, Jackson T, Claesson-Welsh L, Stephens LR: Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr Biol* **1994**; 4:385-393
- 457) Wickramasinghe SN, Hasan R, Khalpey Z: Differences in the serum levels of acetaldehyd and cytotoxic acetaldehyd-albumin complexes after the consumption of red wine and white wine: in vitro effects of flavonoids, vitamin E, and other dietary antioxidants on cytotoxic complexes. *Alcohol Clin Exp Res* **1996**; 20(5):799-803
- 458) Wilkinson MG, Millar JB: Control of the eucaryotic cell cycle by MAP-kinase signaling pathways. *FASEB J* **2000**; 14(14):2147-57
- 459) Wilson F: Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci* **1996**; 59(1):15-21
- 460) Wollny T, Aiello L, Di Tommaso D, Bellavia V, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L: Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: A role for increased nitric oxide production. *Brit J Pharmacol* **1999**; 127(3):747-55
- 461) Woo DK, Dudick SJ, Sumpio BE: Homocysteine stimulates MAP-kinase in bovine aortic smooth muscle cells. *Surgery* **2000**; 928(1):59-66
- 462) World Health Organisation (WHO): Classification of atherosclerotic lesions. *WHO Tech Rep Serv* **1985**; 143: 19-20
- 463) World Health Organisation (WHO): World health statistics annual. Geneva; WHO, **1989**
- 464) Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ: Mechanism of cardioprotectin by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Int J Mol Med* **2001**; 8:3-17

- 465) Wübert J, Oster U, Rüdiger W: Inhibitors of chlorophyll biosynthesis from bulbs of *Gadiolus* spp. *Z Naturforsch* **1996**; 51c:548-57
- 466) Wymann MP, Pirola L: Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* **1998**; 1436:127-50
- 467) Yano K, Rheads CG, Kagan A: Coffee, ale and the risk of coronar heart disease among Japanese men living in Hawaii. *N Engl J Med* **1977**; 297:405-9
- 468) Ying GG, Williams B (1999): Herbicide residues in grapes and wine. *J Environ Sci Health B* **1999**; 34(3):397-411
- 469) Zbikowska HM, Olas B: Antioxidants with carcinostatic activity (resveratrol, vitamin E and selenium) in modulation of blood platelet adhesion. *J Physiol Pharmacol* **2000**; 51(3):513–520
- 470) Zenebe W, Pechanova O, Andriantsitohaina R: Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res* **2003**; 52(4):425-32
- 471) Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G: Immunohistochemical study if intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* **1993**; 143:164-72
- 472) Ziegler H: Physiologie: Die Nährstoffe und ihre Umsetzung in der Pflanze. In: Strasburger E; Noll F, Schenck H, Schimper AFW, von Denffer D, Ziegler H, Ehrendorfer F: *Lehrbuch der Botanik*. 32.Aufl. **1983**; Gustav Fischer Verlag:362-6
- 473) Ziegler H : Physiologie: Regulation von Wachstum und Differenzierung. In: Strasburger E; Noll F, Schenck H, Schimper AFW, von Denffer D, Ziegler H, Ehrendorfer F: *Lehrbuch der Botanik*. 32.Aufl. **1983**; Gustav Fischer Verlag: 387-94
- 474) Zloch Z: Regulatory influence of peroral dehydroascorbic acid and bioflavonoids on the biochemical function of Vitamin C. *Int J Vitam Nutr Res* **1974**; 44(4):466-76
- 475) Zloch Z: The role of dietary plant polyphenols in health maintainance. *Cas Lek Cesk* **1996**; 135(39):84-8
- 476) Zou JG, Huang YZ, Chen Q, Wei EH, Hsieh TC, Wu JM: Resveratrol inhibits copper ion-induced oxidative modification of human low density lipoprotein. *Biochem Mol Biol Int* **1999**; 47(6):1089-96
- 477) Zou JG, Huang YZ, Cao KJ, Yang G, Yin H, Len J, Hsieh TC, Wu JM: Effect of resveratrol on intimal hyperplasia after endothelial denudation in an experimental rabbit model. *Life Sci* **2000**; 68:153-63
- 478) Zou JG, Wang ZR, Huang YZ, Cao KJ, Wu JM: Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on endothelial function of hypercholesterolemic rabbits. *Int J Mol Med* **2003**; 11(39):317-20
-

G. ANHANG

1. Verwendete Abkürzungen

AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BAPTA/AM	1,2-Bis(2-aminoethoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	(zweiwertiges) Calciumion
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX-2	Cyklooxygenase 2
CYP ₄₅₀	Cytochrom P ₄₅₀ , Atmungskettenenzym mit vielen Isoformen
DEPC	Diethylpyrocarbonat (kanzerogen !)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleotidic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglyceroltetraacetat
EMEA	<i>European Agency of the Evaluation of Medicinal Products</i>
EPCG	Epigallocatecin-3-gallat
Fe ²⁺	(zweiwertiges) Eisenion
Fe ³⁺	(dreiwertiges) Eisenion
GDP	Guanindiphosphat
GTP	Guanintriposphat
GTPase	Guanintriposphat-spaltendes Enzym
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfat
HDL	Lipoproteine hoher Dichte (<i>high density lipoprotein</i>)
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRT	<i>Hormone Replacement Therapy</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
Ig G	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin 10
IP ₃ K	Inositoltriposphat-3-Kinase
KHK	koronare Herzkrankheit
kd	Kilodalton
LDL	Lipoproteine niedriger Dichte (<i>low density lipoprotein</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonucleotidic Acid, Boten-RNA
MTX	Methotrexat
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NF _κ B	nukleärer Faktor κ _B
NO	Stickoxid
p	Passagezyklus bei Zellkultur
p	<i>Probability</i> (Wahrscheinlichkeit)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
pH	negativer Logarithmus der Protonenkonzentration, "Säuregrad"
pK _A	chemische Dissoziationskonstante
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat (kanzerogen !)
Py	phosphoryliertes Tyrosin
rTLC	<i>Reversed Thin Layer Chromatography</i>

RGD-Sequenz	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure
RNA	<i>Ribonucleotidic Acid</i> , Ribonukleotidsäure
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SEM	<i>Standard Error of Means</i> (Standardfehler)
SH2, SH3	src-Homologue (Region) 2, src-Homologue (Region) 3
SHRSP	<i>spontaneously hypertensive stroke-prone rats</i>
SSC	<i>Solution of Sodium Citrate</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline</i> (+ Tween 20 %)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	(Tris)hydroxymethyl-aminomethan
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

2. Internationale Aminosäuren-Codes

A	Alanin	Ala
C	Cystein	Cys
D	Asparaginsäure	Asp
E	Glutaminsäure	Glu
F	Phenylalanin	Phe
G	Glycin	Gly
H	Histidin	His
I	Isoleucin	Ile
K	Lysin	Lys
L	Leucin	Leu
M	Methionin	Met
N	Asparagin	Asn
P	Prolin	Pro
Q	Glutamin	Gln
R	Arginin	Arg
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
V	Valin	Val
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr

3. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Relation der altersstandardisierten Mortalitätsrate durch KHK zum Konsum tierischer Fette (S. 11)
- Abb. 2: Relation der altersstandardisierten Mortalitätsrate durch KHK und dem Konsum von tierischen Fetten und Wein (S. 12)
- Abb. 3: Struktur der Phenolderivate Urushiol und Primin (S. 18)
- Abb. 4: Übersicht über die Hauptgruppen pflanzlicher Phenole (S. 19)
- Abb. 5: Biosynthese von Phenolcarbonsäuren bzw. Phenolglucosiden sowie Strukturgerüst der Gallussäure (S. 20)
- Abb. 6: Flavangerüst und schematische Übersicht über die Biosynthese wichtiger Derivate (S. 22)
- Abb. 7: Aminosäure-Sequenz von EGF (S. 31)
- Abb. 8: Schematische Darstellung eines 7-Helix-Rezeptors (S. 32)
- Abb. 9: Calmodulin und seine Konformationsänderung bei Bindung an ein Zielprotein (S. 34)
- Abb. 10: Wirkweise des aktivierten Calmodulins am Beispiel der CaM II-Kinase (S. 35)
- Abb. 11: Schema von Aktivierung und Inaktivierung bei G-Proteinen (S. 36)
- Abb. 12: Funktionelle Regionen von G_{α} (S. 36)
- Abb. 13: Schematische Darstellung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase (S. 39)
- Abb. 14: Die vier Klassen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (S. 39)

- Abb. 15: Schematische Darstellung von Konformationsänderung, Dimerisierung und Aktivierung durch Autophosphorylierung am Beispiel des EGF-Rezeptors (S. 40)
- Abb. 16: SH2-Domänen in Signal- und Regulatorproteinen wie src, PLC γ 1 und Grb2 (S. 42)
- Abb. 17: Schematische Darstellung einer ras-Aktivierung durch Phosphorylierung (S. 44)
- Abb. 18: Schematisierte Wachstumskontrollkaskade im Säugerorganismus (S. 45)
- Abb. 19: Schema des Zusammenwirkens verschiedener Ebenen der Signaltransduktionskaskade vom Wachstumsfaktor-Rezeptorsignal bis zur Umstrukturierung des Aktingerüsts (S. 45)
- Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (x1000) naiver konfluenter Endothelzellen (HUVEC) (S. 78)
- Abb. 21a u. b: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (x1000) von Veränderungen an Zellmembran und Cytoskelett von Endothelzellen (HUVEC) nach 35-minütiger Inkubation mit Rotweinslösung (S. 78/79)
- Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (x 1000): Inkubation konfluenter Endothelzellen (HUVEC) mit Herbizin vor 15-minütiger Inkubation mit Rotweinslösung (zu 0,5‰ in PBS) schränkt die Ausbildung von Stressfasern ein (S. 79)
- Abb. 23: Die 85 kd-Bande bei Rotwein-Verdünnungen von 0,5‰, 1‰ und 2,5‰ in PBS (S. 80)
- Abb. 24: Effekte verschiedener Rotwein-Verdünnungen bei 30-minütiger Zellinkubation (S.80)
- Abb. 25: Zeit-Wirkungs-Abhängigkeit der 85 kd-Bande bei Inkubation gesunder konfluenter Endothelzellen mit Rotwein-Verdünnungen und Kontrollen (S. 81)
- Abb. 26: Rotweineffekt (Zunahme der 85 kd-Bande) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (S. 81)
- Abb. 27: 85 kd-Banden mit zusätzlich sichtbaren Banden in den Bereichen von 210 und 190 kd (S. 82)
- Abb. 28: Ausspüleffekt durch PBS in Abhängigkeit von der Einwirkzeit (S.83)
- Abb. 29: Zeitverlaufsdiagramm des von PBS-verursachten Auswasch-Effektes auf die nach 30-minütiger Inkubation in den Endothelzellen induzierte Rotweinswirkung (Ausbildung der 85 kd-Bande) *in vitro* (S. 83)
- Abb. 30: Blotphoto der Zeit-Wirkungs-Kinetik zweier PBS-Rotwein-Verdünnungen (S.84)
- Abb. 31: Zeit-Wirkungs-Kinetik für verschiedene Rot- und Weißwein-Verdünnungen (S.85)
- Abb. 32: Zeit-Wirkungs-Diagramme der Endothelzell-Reaktion *in vitro* (S.85)
- Abb. 33: Darstellung des Bandeneffektes bei jeweils 30-minütiger Inkubation mit den Lösungen verschiedener Rotweine (1‰) unterschiedlicher Lagen und Rebsorte, mit Kontrollen (S. 86)
- Abb. 34: Darstellung des Bandeneffektes von Rotweinen im Vergleich zu unterschiedlichen Kontrollsubstanzen (S. 87)
- Abb. 35: Beeinflussung der Zellreaktion bei Rotwein-Inkubation durch Zugabe der SRC-Kinase-Hemmstoffe PP1, Genistein, Herbizin A und Tyrphostin A23 (S. 88)
- Abb. 36: Einfluss der Kalzium-Chelatoren EGTA und BAPTA/AM auf die Zellreaktion unter Rotweinsinkubation (S. 89)
- Abb. 37: Konzentrations-Wirkungs-Kinetik des Kalzium-Chelators BAPTA/AM (S. 90)
- Abb. 38: Northern-Blot-Analyse MCP-1-spezifischer Messenger-RNA (MCP-1 mRNA) (S. 91)
- Abb. 39: Effekt der lipophilen und hydrophilen Extraktionsphasen in Zusammenhang mit der Bandenentstehung (mit Kontrollen) (S. 92)
- Abb. 40: Wirkungen pH-abhängiger Etherausschüttelungen (S. 93)
- Abb. 41: Auswirkung verschiedener Verdünnungsstufen (8 μ M, 15 μ M und 25 μ M) der pflanzlichen Flavonoide Quercetin, Resveratrol und Myricetin auf den Bandeneffekt (S. 94)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben:

- meinem Doktorvater, Herrn Priv. Doz. Dr. med. Markus Essler, Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar (- vormals am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München tätig -) für die Betreuung der Arbeit, Lenkung meiner Ideen und die Diskussionen.
 - dem Biologen Herrn Dr. rer. nat. Joachim Wübert, Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München, der mich bei den chromatographisch-analytischen Aspekten der Arbeit beriet und unterstützte.
 - Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Siess, Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München, der die Fragestellung anstieß und mir einen Laborplatz zur Verfügung stellte.
 - dem Leiter des Instituts für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Peter C. Weber, an dessen Einrichtung ich freundlicherweise diese Arbeit durchführen durfte.
 - den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts Frau Dr. rer. nat. Petra Maschberger, Herrn Dr. rer. nat. Petros Arnaoutis und Herrn Dr. rer. nat. Markus Bauer für Unterstützung, Tipps und Tricks besonders zu Beginn.
 - den Technischen Assistentinnen des 'Gartenpavillons', Frau Barbara Böhringer, Frau Monika Morbitzer und ganz besonders Frau Carola Meister, die stets freundlich und überaus hilfsbereit waren.
 - und zuguterletzt allen lieben Menschen, die mich während Studium und Doktorarbeit unterstützt und bestärkt haben.
-

Curriculum vitae

Name: Roland Hallwachs
geboren am: 19. Januar 1965 in München

Schulbildung: 1975-1984: Werner-von-Siemens-Gymnasium, München
Allgemeine Hochschulreife: 29. Juni 1984 (Abitur)

Universitäre Ausbildung: 1984-1991 Diplomstudiengang Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Diplomarbeit (Betreuung Prof. Dr. rer. nat. S. Weidinger und Prof. Dr. med. F. Schwarzfischer, Institut für Anthropologie und Humangenetik): „Populationsgenetische Untersuchungen zum Polymorphismus von Erythrozytenisoenzymen (ACP, ESD, PGM1) und Serumproteinen (GC, TF, PI, AHS, ORM1) an einer Stichprobe aus der Garfagnana (Toskana).“
XI/1991-VII/1993 Aufnahme des Aufbaustudiums Lehramt Chemie (Sekundarstufe II) / Didaktik der Biologie, mit Unterrichtspraktikum am Gymnasium Pullach.
1993-2000 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.
Praktisches Jahr im Universitätsklinikum Großhadern (Physikalische Medizin, Prof. Dr. med. G. Stucki), im Städt. Krankenhaus Neuperlach (Viszeral- und Unfallchirurgie, Prof. Dr. med. A. Gunther, Prof. Dr. med. K. Kunze und Anästhesiologie Prof. Dr. med. U. Jensen) und im Städt. Krankenhaus Schwabing (Innere Medizin/Infektiologie, Prof. Dr. med. D. Eichenlaub).

Ärztliche Approbation: 15. Juli 2002

Berufstätigkeit und Weiterbildung: I-V/2001 AiP im Medical Department der HEXAL Pharmaforschung GmbH, Holzkirchen
VI/2001 bis VII/2002 AiP in der Medizinischen Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München, Abteilung für Klinische Pharmakologie (Prof. Dr. med. S. Endres)
bis VIII/2002 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität, München
seit IX/2002 Drug Safety Scientist in der Abteilung für Arzneimittelsicherheit / internationale Pharmakovigilanz eines großen süddeutschen innovativen Generikaherstellers
seit VI/2003 stellvertretender Stufenplanbeauftragter besagter Firma und deren Töchter
XI-XII/2004 Hospitation in der Augenklinik am Marienplatz (Praxis Dr. med. T. Neuhann, J. Remky, Dr. med. S. Frei)
I-II/2005 Gastarzt am Kreiskrankenhaus Starnberg (Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Prof. Dr. med. C. Anthuber)