

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Wirkung von Epigallocatechin-Gallate (EGCG) auf die Endothelfunktion und Untersuchung molekularer Mechanismen

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Elena Follmann
aus Kaiserslautern

Gutachter:

1.: Prof. Dr. med. V. Stangl

2.: Priv.-Doz. Dr. V. Böhm

3.: Priv.-Doz. Dr. med. habil. M. Faßhauer

Datum der Promotion: 21. November 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Wirkungen von Tee und Teeinhaltsstoffen auf die Gesundheit	5
1.2. Stickstoffmonoxid (NO) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS)	7
1.3. Protektive Effekte von Tee-Polyphenolen auf das kardiovaskuläre System ...	10
1.4. Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Allgemeine Materialien und Geräte.....	14
2.1.1. Chemikalien.....	14
2.1.2. Geräte.....	15
2.2. Vasorelaxationsexperimente.....	16
2.2.1. Materialien.....	16
2.2.2. Durchführung.....	16
2.3. Zellkultur	18
2.3.1. Materialien.....	18
2.3.2. Durchführung.....	19
2.4. Stimulation der Zellen	20
2.4.1. Materialien.....	20
2.4.2. Durchführung.....	20
2.5. Zellyse und Proteinextraktion.....	21
2.5.1. Materialien.....	21
2.5.2. Durchführung.....	21
2.6. Western Blot	22
2.6.1. Materialien.....	23
2.6.2. Durchführung.....	24
2.7. eNOS-Aktivitätstest in lebenden Zellen	26
2.7.1. Materialien.....	26
2.7.2. Durchführung.....	27
2.8. PKA-Assay.....	28
2.8.1. Materialien.....	29
2.8.2. Durchführung.....	29
2.9. Statistik.....	30

3. Ergebnisse	31
4. Diskussion.....	42
5. Zusammenfassung	49
6. Abstract	51
7. Danksagung	52
8. Abkürzungsverzeichnis.....	53
9. Literaturverzeichnis.....	55
10. Lebenslauf.....	62
11. Publikationsliste	63
12. Eidesstattliche Erklärung.....	64

1. Einleitung

1.1. Wirkungen von Tee und Teeinhaltsstoffen auf die Gesundheit

In Ostasien sterben wesentlich weniger Menschen an koronarer Herzkrankheit als in der westlichen Welt. In Japan erreichte die Todesrate aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen in den Jahren 1965 bis 1969 beispielsweise nur ein Sechstel derjenigen in den Vereinigten Staaten (Levi et al., 2002). Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Lebensmittel kardio- und vasoprotektive Substanzen enthalten. Der Verzehr von Flavonoiden beispielsweise, die in Wein, Tee und diversen Pflanzen vorkommen, ist negativ mit dem Auftreten von KHK korreliert (Renaud et al., 1992; Hertog et al., 1995; Knekt et al., 1996).

Tee (*Camellia sinensis*) ist neben Wasser das am häufigsten konsumierte Getränk der Welt. Während in Europa, Amerika und Afrika schwarzer Tee bevorzugt wird, trinkt man in Asien vorwiegend grünen Tee. Die beiden Tee-Formen unterscheiden sich durch ihre Verarbeitung. Um grünen Tee zu erhalten, werden die frisch geernteten Blätter vor dem Trocknen bedampft, was eine Inaktivierung der Polyphenol-Oxidase bewirkt. Schwarzer Tee entsteht durch Fermentation: In den Teeblättern wird die Polyphenol-Oxidase aktiviert und sie reagiert mit Sauerstoff aus der Luft.

Tee ist besonders reich an Flavonoiden, die der Gruppe der Polyphenole angehören (Vinson et al., 1995). Hauptbestandteile des grünen Tees sind Catechine, eine Untergruppe der Flavonoide, wie Epicatechin (EC), Epicatechin-3-gallate (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Sie machen im grünen Tee >80% der Flavonoide aus, im schwarzen Tee nur 20-30% (Balentine et al., 1997). In schwarzem Tee überwiegen polymerisierte Verbindungen wie Theaflavine und Thearubigene. Der Gehalt an Methylxanthinen, zu denen auch das Koffein zählt, ist im schwarzen Tee ebenfalls höher. Der Anteil und die Konzentration der Substanzen im Getränk hängt von den Wachstumsbedingungen der Pflanzen, der Verarbeitung der Blätter und der Zubereitung des Aufguss ab (Wehrwein, 1999; Arts et al., 2000). In heiß gebrühtem Tee finden sich Flavonoidkonzentrationen von 541-692 µg/ml (Hakim et al., 2000).

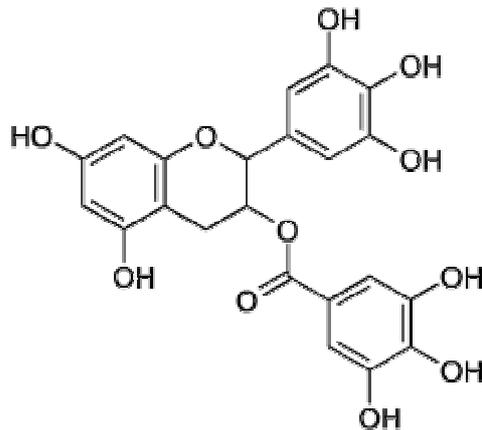


Abbildung 1: Strukturformel von EGCG.

Die Catechine des Tees sind für ihre antioxidativen Eigenschaften bekannt. In einer Studie zur Oxidation von Lipoproteinen hatten Catechine eine 20-fach höhere antioxidative Aktivität als Vitamin C (Vinson et al., 1995). EGCG ist aufgrund der beiden Gallat-Gruppen das potenteste Catechin (Guo et al., 1999). Polyphenole sind in der Lage Superoxidradikale, freie Radikale und Peroxynitrite zu neutralisieren, sie beeinflussen die Aktivität von oxidativen Enzymen und modifizieren die Phosphorylierung von Proteinen (de Groot und Rauen, 1998; Chen und Ho, 1995; Middleton, 1998).

In der experimentellen und klinischen Krebsforschung spielen die Tee flavonoide bereits eine wichtige Rolle. Als wirksame Antioxidantien können sie Proteine und DNA der Zellen vor Karzinogenen schützen (Hecht und Hoffmann, 1998; Gordon, 1996; Yoshioka et al., 1996). Durch Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden und interzellulärer Kommunikation sind sie in der Lage, die Entstehung von Tumoren zu verhindern, beziehungsweise deren Fortschreiten zu hemmen (Lin et al.; 1999, Chen et al.; 1999, Chung et al., 1999). Auch dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren wirkt EGCG entgegen, indem es entscheidende Enzyme hemmt (Jankun et al., 1997). Mittlerweile existieren eine Vielzahl von Arbeiten, die unterschiedlichste Wirkungen von Teeextrakten auf verschiedene Tumorzelllinien untersucht haben (Dufresne und Farnworth, 2001).

Darüber hinaus zeigen an Ratten durchgeführte Experimente, dass sich das im grünen Tee enthaltene Tannin positiv auf die Nierenfunktion auswirkt (Yokozawa et al., 1996). Für EGCG wurde in vitro eine Anregung der Insulinproduktion um mehr als das 15-fache nachgewiesen, was für die Diabetesprophylaxe bzw. -therapie relevant sein könnte (Anderson und Polanski, 2002). Die Inzidenz von Kollagen-induzierter Arthritis konnte bei Mäusen, die mit Polyphenolen des grünen Tees gefüttert wurden, signifikant reduziert werden, was für eine antiinflammatorische Wirkung der Polyphenole spricht (Haqqi et al., 1999). In mehreren Studien konnte eine antimikrobielle Wirkung für Teecatechine nachgewiesen werden (Diker et al., 1991; Inoue et al.; 1996, Toda et al., 1991). Durch Hemmung des Wachstums und des Anheftens von Streptokokken auf Zähnen, beugt EGCG und ECG der Entstehung von Karies vor (Sakanaka et al., 1990).

1.2. Stickstoffmonoxid (NO) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Endothelabhängiges Stickstoffmonoxid (NO) wird von der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche ein Schlüsselenzym der kardiovaskulären Homöostase darstellt, synthetisiert.

Furchtgott stellte 1980 fest, dass Aortenringe mit intaktem Endothel auf den Stimulus Acetylcholin mit einer Dilatation reagieren; Aortenringe, von denen das Endothel entfernt wurde, dies jedoch nicht tun. Er postulierte daraufhin einen „endothelium derived relaxing factor (EDRF)“, dessen biochemische Natur unklar war (Furchtgott und Zawdzki, 1980). Dass es sich bei dem Faktor um das labile Radikal NO handelt, wurde 1987 von mehreren Arbeitsgruppen aufgeklärt (Palmer et al., 1987; Furchtgott, 1988; Ignarro et al., 1987).

Die Wirkungen von NO im kardiovaskulären System sind vielfältig: Neben seiner Eigenschaft als potenter Vasodilatator besitzt NO unter Anderem auch antiatherogene Eigenschaften. NO kontrolliert die Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Proteinen, die in die Atherogenese involviert sind (Zeiher et al., 1995; Kubes et al., 1991; Gauthier et al., 1995; De Caterina et al., 1995). Zusätzlich senkt es die Permeabilität von Endothelzellen, so dass weniger Lipoproteine passieren können (Draijer et al., 1995) und beugt der LDL-Oxidation vor (Goss et al., 1997).

Des Weiteren ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid die Aggregation von Thrombozyten und deren Adhäsion an die Gefäßwand hemmt. Durch die verminderte Ausschüttung von PDGF (Platelet-derived growth factor) wird die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen gesenkt (Radomski et al., 1987; Alheid et al., 1987). Dieser Effekt wird durch Hemmung der DNA-Synthese und der Mitogenese von glatten Muskelzellen durch NO unterstützt (Garg et al., 1989; Nakaki et al., 1990). Cayatte konnte experimentell zeigen, dass Atherogenese durch pharmakologische Inhibition der NO-Synthase bei Kaninchen mit Hypercholesterinämie gefördert wird (Cayatte et al., 1994).

NO reagiert sowohl mit Häm-Gruppen, als auch mit Thiolgruppen von Proteinen. Die kovalente Modifikation der Häm-Gruppe der Guanylatzyklase durch NO führt zu einer vermehrten Synthese des second messengers cGMP. Dieses Molekül ist für viele NO-Effekte, wie beispielsweise die Vasodilatation oder die Inhibition der Thrombozytenaggregation, verantwortlich. Des Weiteren geht NO Redoxreaktionen mit Radikalen ein und wirkt so zytoprotektiv (Stamler, 1994; Clementi et al., 1995). Die geringe Größe und die Neutralität ermöglichen NO die Diffusion durch Membranen, so dass es nicht nur autokrin sondern auch parakrin wirken kann (Lancaster, 1994; Förstermann, 1994).

Vom Enzym, das für die Synthese von Stickstoffmonoxid verantwortlich ist, sind drei Isoformen bekannt. Neben der endothelialen NO-Synthase (eNOS), die in Endothelzellen, Thrombozyten, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten, Knochenzellen und in Neuronen nachgewiesen werden konnte, wird in Zellen des Nervensystems die neuronale NO-Synthase (nNOS) exprimiert (Palmer et al., 1987; Radomski et al., 1990; Balligand et al., 1995; Dinerman et al., 1994). Während diese beiden Enzyme konstitutiv exprimiert sind, wird die induzierbare NO-Synthase (iNOS) im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion in vielen Zelltypen gebildet.

NO-Synthasen sind in der Lage das Radikal NO zu synthetisieren, indem das Substrat L-Arginin mit molekularem Sauerstoff reagiert, wobei L-Citrullin und NO entsteht (Groves und Wang, 2000). Diese Reaktion setzt die Bindung der Kofaktoren FAD und FMN an eNOS-Monomere voraus. Zwei Monomere bilden ein Dimer, an das Häm und BH₄ sowie L-Arginin binden können. Die Konformationsänderung von der inaktiven in

die aktive Form des Dimers wird durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und nachfolgende Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes an die eNOS ausgelöst (Alderton et al., 2001).

Modulierend auf die eNOS Aktivität wirkt neben genomischer Regulation sowohl eine Änderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, als auch eine Änderung des Phosphorylierungsstatus des Enzyms (Govers und Rabelink, 2001). Die Transkription des eNOS-Gens wird durch Substanzen wie Estradiol, VEGF und Angiotensin II gefördert, aber auch durch Einwirkung von Scherkräften auf das Endothel (Tan et al., 1999; Noris et al., 1995). Die Halbwertszeit der eNOS-mRNA, die normalerweise etwa 24-48 Stunden beträgt, kann beispielsweise durch Wasserstoffperoxid oder durch VEGF verlängert werden, wohingegen $\text{TNF}\alpha$ und Hypoxie eine rasche Degradierung der mRNA bewirken (Förstermann et al., 1998). Ca^{2+} -mobilisierende Substanzen wie Bradykinin, Acetylcholin, Histamin und Ionophore sind in der Lage, über die Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels die endotheliale NO-Synthase kurzfristig zu aktivieren (Gosink und Forsberg, 1993; Michel et al., 1997; Feron et al., 1998).

Die Regulation der Phosphorylierung von eNOS wird durch diverse Phosphokinasen und Phosphatasen vermittelt und ist sehr komplex. Bislang sind die Phosphorylierungsstellen Serin116, Serin617, Serin635, Serin1179 und Threonin497 bekannt (bovine eNOS), was zahlreiche Konstellationen des Phosphorylierungszustandes ermöglicht. Thr497 ist beispielsweise basal phosphoryliert und sorgt im dephosphorylierten Zustand für eine erhöhte eNOS-Aktivität. Eine Phosphorylierung an Ser1179 oder an Ser635 erhöht die Aktivität des Enzyms (Michell et al., 2001).

Ser1179 ist die am besten untersuchte Phosphorylierungsstelle von eNOS. Stimuli wie VEGF, ATP, Bradykinin und Acetylcholin sowie auf das Endothel einwirkende Scherkräfte führen zu einer Phosphorylierung von Ser1179 und damit zu einer eNOS-Aktivierung. Kinasen wie Akt (Proteinkinase B), cAMP-abhängige PKA (Proteinkinase A) und AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) phosphorylieren Ser1179 (Fulton et al., 1999; Michell et al., 1999; Dimmeler et al., 1999).

Auch Protein-Protein Interaktionen sind für die eNOS-Aktivität von Bedeutung. Eine Bindung von Hsp90 an eNOS, die beispielsweise durch Scherkräfte, VEGF und Estradiol gefördert wird, führt zu einer erhöhten Aktivität (Garcia-Cardena et al., 1998). Unter Stimulation mit Calciumionophoren bindet vermehrt Dynamin-2 an eNOS, was ebenfalls mit einer erhöhten Enzymaktivität einhergeht (Fulton et al., 2001). Das NOSIP-Protein hingegen bewirkt eine Verminderung der eNOS-Aktivität, da es eine Verlagerung des eNOS-Proteins von der Zellmembran in intrazelluläre Kompartimente veranlasst (Dedio et al., 2001).

Durch NOS-Inhibitoren kann festgestellt werden, ob die induzierte Vasorelaxation tatsächlich auf eine erhöhte NO-Freisetzung zurückzuführen ist oder ob andere Mechanismen dabei eine Rolle spielen. In erster Linie werden dazu L-Arginin-Analoga, wie beispielsweise N^G-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME), verwendet, die kompetitiv die L-Argininbindung hemmen. Die so genannten „mechanism based inhibitors“ gehen eine kovalente Bindung mit einer funktionelle Gruppe des Enzyms ein und schädigen es so irreversibel (Salerno et al., 2002; Alderton et al., 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die eNOS einer Vielzahl unterschiedlichster Regulationsmechanismen unterliegt, die bis jetzt nur teilweise aufgeklärt werden konnten.

1.3. Protektive Effekte von Tee-Polyphenolen auf das kardiovaskuläre System

Krankheiten des kardiovaskulären Systems, wie die koronare Herzkrankheit oder der Schlaganfall, haben in Gebieten mit hohem Teegenuss eine geringere Inzidenz. Einige Studien haben gezeigt, dass Teegenuss das Risiko von Herzkrankheiten und die Sterblichkeit durch kardiovaskulär bedingte Krankheiten senkt (Kuriyama et al., 2006; Nakachi et al., 2000; Arts et al., 2001; Hertog et al., 1997). Außerdem scheint Teekonsum die Entwicklung und das Fortschreiten von Atherosklerose zu hemmen (Geleijnse et al., 1999; Sazuki et al., 2000).

Die Resultate der zahlreichen epidemiologischen Studien, in denen der Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und Teegenuss untersucht wurde, sind nicht alle

konsistent. Sesso, der mit seinen Kollegen eine Fall-Kontroll-Studie in der Umgebung von Boston durchführte, konnte bei Patienten, die täglich mehr als eine Tasse Tee getrunken haben, ein um 44% vermindertes kardiovaskuläres Risiko feststellen (Sesso et al., 1999). Auch im Rahmen der Zutphen Elderly Study konnte demonstriert werden, dass die Personen, deren Teekonsum im Bereich der oberen Tertile lag, im Vergleich zu Personen, deren Teekonsum in der unteren Tertile lag, ein merklich vermindertes kardiovaskuläres Risiko aufwiesen (Hertog et al., 1993). Eine Reihe anderer Studien, wie zum Beispiel die Scottish Heart Health Study und die Caerphilly Study, die an einer Waliser Population durchgeführt wurde, konnten einen solchen Zusammenhang jedoch nicht nachweisen (Brown et al., 1993; Hertog et al., 1997).

Aus einer Studie von Lorenz et al. geht hervor, dass der Zusatz von Milch die positiven Effekte von Tee auf die Endothelfunktion vollständig verhindert (Lorenz et al. 2007). Eine Meta-Analyse, die auf 10 Kohortenstudien und 7 Fall-Kontroll-Studien basiert, zeigt eine Reduktion des kardiovaskulären Risikos um etwa 11% für einen Teegenuss von drei Tassen täglich (Peters et al., 2001).

Das Teekonsum eine endotheliale Dysfunktion vermindert, konnte in einer randomisierten cross-over Studie an Patienten mit KHK gezeigt werden. Um kurzfristige Effekte des Tees auf die Vasomotorik der A. brachialis von Patienten zu erfassen, wurde die Vasoreaktivität zwei Stunden nach Konsum von 450 ml schwarzem Tee oder von der gleichen Menge Wasser mittels Gefäßultraschall gemessen. Zur Ermittlung von längerfristigen Effekten haben die Probanden über vier Wochen täglich 900 ml Tee oder Wasser getrunken. Anhand der Messergebnisse an 50 Patienten konnte gezeigt werden, dass sowohl kurzfristiger als auch der längerfristige Teegenuss die endothelabhängige, flussmodulierte Relaxation der Arterie im Vergleich zur Wasser-Kontrollgruppe verbesserte. Die endothelunabhängige Vasodilatation durch Nitroglycerin wurde vom Teekonsum nicht beeinflusst (Duffy et al., 2001).

In einer 2002 erschienenen Studie an 1900 Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten haben, war bei Personen, die im Jahr vor dem Ereignis bis zu 14 Tassen Tee pro Woche getrunken haben, die Mortalität um 20% gesenkt. Konsumierten sie mehr als 14 Tassen pro Woche, verminderte sich die Mortalität sogar um die Hälfte (Mukamal et al., 2002).

An Apo-E-defizienten Mäusen durchgeführte Experimente wiesen nach, dass bei Tieren, die über einen Zeitraum von 14 Wochen Teeextrakt mit dem Trinkwasser aufgenommen haben, im Vergleich zur Kontrollgruppe das atheromatöse Areal um durchschnittlich 23% reduziert war. Der Anteil des in der Aorta abgelagerten Cholesterols war 27% und der Anteil an Triglyzeriden 50% geringer als in der Kontrollgruppe, obwohl der Plasma-Spiegel beider Lipide unbeeinflusst geblieben ist (Miura et al., 2001). Yang und Koo zeigten, dass Teecatechine der LDL-Oxidation in Endothelzellen vorbeugen (Yang und Koo, 2000).

Sagesaka-Mitane stellte mit seiner Arbeitsgruppe fest, dass EGCG die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation komplett supprimiert. Hinsichtlich des IC_{50} Wertes konnte die Potenz von EGCG mit der von Aspirin verglichen werden. Auch die Thrombin- und PAF-induzierte Thrombozytenaggregation wurde durch EGCG gehemmt (Sagesaka-Mitane et al., 1990).

Den Einfluss, der aus Grüntee gewonnenen Catechine EGCG, EGC, EC und ECG, auf die Kontraktion von Mesenterialarterien der Ratte untersuchte die Arbeitsgruppe von Huang. Sie wiesen nach, dass alle vier Substanzen eine durch Phenylephrin-induzierte Kontraktion dosisabhängig abschwächten, wobei EGCG die Kontraktion am wirksamsten unterdrückte (Huang et al., 1998).

1.4. Ziel der Arbeit

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl verschiedener Phytochemikalien günstige Wirkungen auf das kardiovaskuläre System haben. Ein Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase ist die endotheliale NO-Synthase. Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung funktioneller und molekularer Effekte von Epigallocatechin-3-gallate, einem potenten Inhaltsstoff des Tees, auf die eNOS-Aktivität. Zu diesem Zweck wurden Rattenaortenringe sowie bovinen Endothelzellen verschiedenen EGCG-Konzentration ausgesetzt und hinsichtlich ihres Relaxationsverhaltens beziehungsweise ihrer eNOS-Aktivität untersucht. Des Weiteren wurden zur Aufklärung möglicher Signalwege Mechanismen der EGCG-vermittelten eNOS-Aktivierung erforscht.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeine Materialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien

Ammonium Persulfate (APS)	Serva Feinbiochemica
Aprotinin	Fluka
Bromphenolblau	Biomol
Complete protease inhibitor mixture	Roche
Diclophenac	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
D-Glukose	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethanol absolute	J.T. Baker
Ethylenediaminetetraacetic-Acid (EDTA)	Sigma
Glycerol	Invitrogen
Glycin	Merck
HEPES Na-Salz	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Fluka
N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Serva Feinbiochemika
Okadaic acid	Sigma
Pefablock	Boehringer
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co.

Rotiphoresegel	Carl Roth GmbH & Co
Natrium dihydrogenpyrophosphat	Sigma
Natriumdodezylsulfat (SDS)	Serva
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Aldrich

2.1.2. Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments
Sterilbank:	
LaminAir® HBB 2448	Heraeus Instruments
Mikroskop	Leica
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo
Zentrifuge	Eppendorf
ELISA Reader	Anthos
Elektrophoresekammer	Roth
Blotkammer	Owl

2.2. Vasorelaxationsexperimente

2.2.1. Materialien

modifizierte Krebs-Henseleit Lösung:	144 mM NaCl
	5,9 mM KCl
	1,6 mM CaCl ₂
	1,2 mM MgSO ₄
	1,2 mM KH ₂ PO ₄ ⁻
	25 mM NaHCO ₃ ⁻
	11,1 mM D-Glukose
	1 µM Diclophenac
Phenylephrin gelöst in H ₂ O	Sigma
Epigallocatechin-3-gallate gelöst in H ₂ O	Sigma
N ^G -Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) gelöst in H ₂ O	Sigma
Doppelwandige Glasbehälter für Organbäder	Medizinisch-Glastechnische Werkstätte P. Heinrich
Kontraktionskraftaufnehmer FMI TIM-1020	Föhr Medical Instruments GmbH
Feinpositionierelement Vernier Control Typ 850 N	Hugo Sachs Elektronik

2.2.2. Durchführung

Die männlichen Wistarratten (Körpergewicht 300-350 g) wurden von Charles Rivers Laboratories bezogen. Alle Tiere wurden in Übereinstimmung des Europäischen und Deutschen Gesetzes zum Gebrauch von Labortieren unter Standardstallbedingungen gehalten und standardisiert mit Pellets und Leitungswasser ad libitum ernährt.

Zunächst wurden die Ratten mit 0,3 g Thiopental/kg Körpergewicht, das intraperitoneal injiziert wurde, getötet. Dann wurde den Tieren die Aorta entnommen. Die weitere Präparation erfolgte in einer modifizierten Krebs-Henseleit Lösung, die eine Temperatur von 4 °C hatte. Die Aorta wurde unter dem Mikroskop vollständig von Bindegewebe und Fett befreit und vorsichtig mit modifizierter Krebs-Henseleit Lösung gespült, bevor das Gefäß in Ringe von 2 mm Länge geschnitten wurde. Anschließend wurden die Ringe in Organbädern, die 10 ml modifizierte Krebs-Henseleit Lösung enthielten, an Platinhaken aufgehängt. Es erfolgte eine kontinuierliche Begasung der Lösung mit Carbogen, um einen pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Die doppelwandigen Organbäder wurden ständig von 37 °C warmem Wasser umspült.

Die an den Ringen entwickelten Spannungswerte wurden mit Hilfe von Kontraktionskraftaufnehmern gemessen. Über ein mit dem Kraftaufnehmer verbundenes Feinpositionierelement konnte die Vorspannung des Rings exakt eingestellt werden. Diese Signale wurden digitalisiert und als kontinuierliche Kurven auf dem Bildschirm mittels LabView (National Instruments) in der Einheit mg dargestellt.

Nach Einhängen in das Organbad wurden die Ringe auf 2000 mg vorgespannt. Nach 15-minütiger Äquilibration wurden die Ringe durch Zugabe von KCl (50 mM) etwa 10 min vorkontrahiert, um die Kontraktionsfähigkeit der Ringe zu testen. Funktionsuntüchtige Ringe wurden gegebenenfalls ausgetauscht. Nach dreimaligem Auswaschen der Lösung mit modifizierter Krebs-Henseleit Lösung hatten die Ringe wiederum eine Stunde Zeit stabil auf die Ausgangsspannung von 2000 mg zurückzukehren. Die Feineinstellung erfolgte über die an den Kraftaufnehmern befindlichen Reglern.

Danach wurden die Ringe mit dem α_1 -Rezeptoragonisten Phenylephrin (Konzentration 50 nM) vorkontrahiert. Aus zuvor durchgeführten Messreihen ging hervor, dass bei dieser Konzentration eine etwa 80%ige Vorkontraktion gewährleistet ist. Der für das Experiment erforderliche steady-state der Vorkontraktion wurde etwa nach 30 Minuten erreicht. EGCG wurde nun kumulativ zu den Ringen gegeben, das Konzentrationspektrum erstreckte sich über einen Bereich von 0,1 μ M bis zu 50 μ M.

Für einige Experimente wurden Ringe mit dem NOS-Inhibitor L-NAME (1 mM) 15 Minuten inkubiert, bevor sie mit Phenylephrin vorkontrahiert wurden. Auch Ringe, von denen das Endothel mit Zahnseide entfernt wurde, wurden für bestimmte Experimente verwendet.

Die Auswertung der registrierten Messwerte erfolgte mit LabView und Microsoft Excel.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Materialien

Bovine Aortenendothelzellen (BAECs)	Cambrex
Bovine Pulmonalarterienzellen (CPAEs)	American Type Culture Collection

Phosphatgepufferte Salzlösung	GibcoBRL Life Technologies
Trypsin-EDTA in HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	GibcoBRL Life Technologies
Medium für BAECs:	Cell Systems
EGM-MV BulletKit	
enthält Endothelzellbasalmedium, serum-frei,	
BBE 12 µg/ml,	
hEGF 10 pg/ml,	
Hydrocortisone 1 µg/ml,	
Gentamycin-Amphotericin 0,1%	
FBS 5%	

Medium für CPAEs:	GibcoBRL Life Technologies
Minimal Essential Medium	
Aqua dest. 1l	
Natriumpyruvat 110 µg/ml	
NaHCO ₃ 1,5 mg/ml	
Penicillin-Streptomycin 0,1%	
FBS 5%	

2.3.2. Durchführung

Die BAECs wurden ebenso wie die CPAEs bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung in Zellkulturflaschen (T 75) kultiviert. Die BAECs wurden in wachstumsfördernden Endothelzellmedium (EGM) gehalten, während die CPAEs in Minimal Essential Medium (MEM) gehalten wurden. Bei Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Mit Hilfe von Trypsin-EDTA wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Das Trypsin wurde nach 1-3 min Inkubationszeit bei 37°C mit Medium verdünnt und somit inaktiviert. Die noch haftenden Zellen wurden mit dem Trypsin-Mediumgemisch vom Flaschenboden gespült und schließlich auf vier neue, schon Medium enthaltende Flaschen verteilt. Um Kontaminationen zu vermeiden wurde grundsätzlich unter einer Werkbank mit laminarem Luftzug gearbeitet.

Zellen, die im Experiment eingesetzt werden sollten, wurden auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausplattiert. Die dabei verwendete Zellzahl wurde dem Bedarf angepasst. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.4. Stimulation der Zellen

2.4.1. Materialien

Epigallocatechin-3-gallate, gelöst in H ₂ O	Sigma
LY294002, gelöst in DMSO	Sigma
Wortmannin, gelöst in DMSO	Sigma
Ca-ionomycin, gelöst in DMSO	Sigma
PKI (14-22 amide), gelöst in H ₂ O	Calbiochem
PD98059, gelöst in DMSO	Calbiochem
SH-5, gelöst in DMSO	Alexis

2.4.2. Durchführung

Einen Tag vor Stimulation der Zellen wurde das Medium gewechselt. Es wurde soviel der Substanz in das Medium gegeben, dass die gewünschte Endkonzentration auf der Schale erreicht wurde. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Lösungsmittel behandelt, in dem die stimulierende bzw. inhibierende Substanz gelöst war. Ein Basalwert wurde durch eine unbehandelte Probe ermittelt. Die Dauer der Behandlung war abhängig von der Fragestellung.

2.5. Zellyse und Proteinextraktion

2.5.1. Materialien

Lysepuffer 1: pH 7,4	50 mM Tris-HCl
	1,15% KCl
	5 mM Glukose
	1% Triton X 1000
	5 mM EDTA
	1 mM Pefablock
	2 mM DTT

DTT und Pefablock wurden unmittelbar vor Verwendung zugefügt.

Lysepuffer 2:	100 mM NaCl
	20 mM Hepes, pH 7,9
	1% Triton X-100
	1 mM Na_3VO_4
	4 mM sodium pyrophosphate
	10 mM EDTA
	10 mM NaF
	complete protease inhibitor mixture
	100 nM okadaic acid
	1 mM Pefablock

BCA Protein Assay Reagent Kit	PIERCE
-------------------------------	--------

2.5.2. Durchführung

Vor der Lyse wurden die Zellen zunächst zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen, um Reste des Nährmediums und der stimulierenden Substanz zu entfernen. Dann wurden die vom PBS befreiten Schalen auf Eis mit 100 μl Lysepuffer 10 min inkubiert. Die Zusammensetzung des verwendeten Puffers richtete sich nach dem anschließenden

Experiment. Sollte die Phosphorylierung der eNOS überprüft werden, wurde Lysepuffer 2 eingesetzt, welcher Phosphataseinhibitoren enthält. Der Puffer wurde nochmals sorgfältig über den Zellrasen gespült, damit gewährleistet war, dass sämtliche Zellen mit dem Puffer in Kontakt kommen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Plattenboden geschabt und das Lysat in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt, die dann bei -80 °C eingefroren wurden.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das Lysat langsam auf Eis aufgetaut und 5 min mit 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, um das Proteinextrakt von Zelltrümmern zu befreien. Der Überstand wurde in ein neues, gekühltes Gefäß überführt, das Pellet wurde verworfen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Extrakt zunächst 1:10 mit dest. H₂O verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 10 µl in zwei nebeneinander liegende Vertiefungen einer 96-well-Platte gegeben und mit 200 µl Piercelösung versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Proben im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen. Zur Ermittlung einer Eichkurve dienten Proteinstandards mit einer Konzentration von 0,125 -1,0 µg/µl, als Leerwert wurden 10 µl dest. H₂O mit Piercelösung versetzt.

2.6. Western Blot

Der Western Blot dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen. Werden entsprechende phosphospezifische Antikörper eingesetzt, lassen die Blots auch eine Aussage über den Phosphorylierungsstatus des nachgewiesenen Proteins zu.

Zunächst müssen die in Zellextrakten enthaltenen Proteine durch Aufkochen und durch die Zugabe von Natriumdodezylsulfat (SDS) denaturiert werden. SDS bindet an Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung. β-Mercaptoethanol trennt die Disulfidbrücken kovalent verbundener Untereinheiten. So ist gewährleistet, dass die Proteine mittels Gelelektrophorese nach Laemmli, bei der die Moleküle in einem elektrischen Feld wandern, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Anschließend werden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

2.6.1. Materialien

	Trenngel, pH 8,8	Sammelgel, pH 6,8
1,5 M Tris pH 8,8	1,56 ml	-
1,5 M Tris pH 6,8	-	625 µl
10% SDS	62,5 µl	50 µl
40% Acrylamid	1,28 ml	625 µl
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
ddH ₂ O	3,28 µl	3,65 ml

Tris-gepufferte Salzlösung:

50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
150 mM NaCl

5x SDS-Probenpuffer, pH 6,8:

60 mM Tris
25% Glycerol
5% β-Mercaptoethanol
2% SDS
0,1% Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer, pH 8,8:

2,5 mM Tris
19,2 mM Glycin
0,01% SDS

Blotpuffer:	20% Methanol 2 mM Tris 15 mM Glycin
Waschpuffer:	0,02%iges Tween 20 in TBS
Marker:	
Prestained Protein Marker, Broad Range	BioLabs
Rotiblock	Carl Roth GmbH & Co
BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)	Sigma
NBT (nitro blue tetrazolium)	Sigma
Enhanced Chemiluminescence Lösung	Amersham
Erstantikörper:	
Anti-phospho-eNOS (Ser1177)	Cell Signaling
Anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling
Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling
Anti-Akt Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Anti-eNOS Antikörper	BD Transduction Laboratories
Zweitantikörper:	
Secondary anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit	Dianova

2.6.2. Durchführung

Die Konzentration des Acrylamids bestimmt den Vernetzungsgrad der Gele und somit die Laufeigenschaften der Proteine. Deshalb muss sie an die Größe der Proteine angepasst werden. Für eNOS mit einem Molekulargewicht von 133 kDa eignet sich ein 8%iges Trenngel.

50 µg Protein wurden mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95°C aufgeköcht. Nach kurzem Zentrifugieren wurden der Marker und die Proben in die Geltaschen geladen. Nun wurde die Elektrophorese, die etwa 60 min dauerte, mit 20 mA/Gel gestartet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Laufkammer genommen und zurechtgeschnitten.

Beim Blotten wurden die zuvor durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes vom Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurde mit dem kontinuierlichen SemiDry-Blotting-Verfahren gearbeitet. Dazu wurden zunächst 3 Whatman-Filterpapiere mit Blotpuffer befeuchtet und übereinander auf die als Anode fungierende untere Elektrodenplatte gelegt. Darauf wurde das Gel gelegt und hierauf die in Methanol aktivierte und mit Blotpuffer gewaschene PVDF-Membran. Der Stapel wurde nun mit drei weiteren feuchten Whatman-Papieren bedeckt. Geblottet wurde bei einer konstanten Leistung von 3 W.

Die Blockierung dient der Vermeidung unspezifischer Hintergrundsignale. Hierzu wurde die PVDF-Membran in 10 ml Blockierlösung für 2 h geschwenkt. Dann wurde der, 1:2500 mit Blockierlösung verdünnte, spezifische Antikörper auf die Membran gegeben und nach kurzem Schwenken für mehrere Stunden oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Membran musste vor Zugabe des farbstoffmarkierten Antikörpers noch dreimal 10 Minuten mit je 10-20 ml Western-Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen werden. Nun wurde der Sekundärantikörper für eine Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blots wurden in AP-Puffer, dem 66 µl NTB und 33 µl BCIP zugesetzt waren, in einer lichtundurchlässigen Schale entwickelt. Vor dem Trocknen der Membran wurde die Färbelösung kurz mit Western-Waschpuffer abgewaschen. Bei Überfärbung des Blots kann die Membran durch kurzes Eintauchen in Methanol wieder etwas entfärbt werden. Anschließend wurden die Blots am Computer gescannt.

Alternativ wurden die Blots mit dem ECL-Verfahren entwickelt: Die am Zweitantikörper gebundene Meerrettichperoxidase oxidiert das in der Enhanced Chemoluminescence Lösung enthaltene Luminol. Das auf diese Art und Weise angeregte Luminol fällt unter Lichtemission wieder in seinen Grundzustand zurück. Das ausgesandte Licht wird durch

einen Film detektiert, der in einer Dunkelkammer entwickelt wurde. Die Filme wurden am Computer gescannt.

2.7. eNOS-Aktivitätstest in lebenden Zellen

Dieser eNOS-Aktivitätstest misst den Umsatz vom Substrat der NOS, L-Arginin, zu ihrem Produkt, L-Citrullin, und kann so eine Aussage über die Aktivität des Enzyms machen. Der eNOS-Aktivitätstest mit intakten Endothelzellen läuft unter physiologischen Bedingungen ab, da die für die Funktion der eNOS bedeutende intrazelluläre Lokalisation des Enzyms erhalten bleibt. Es werden keine Kofaktoren zugesetzt, so dass die reale Situation in der Zelle unverfälscht bleibt.

Mit dem in-vivo eNOS-Aktivitätstest lässt sich eine schnelle, kurzfristige Aktivierung der NO-Synthase, die beispielsweise durch Phosphorylierung oder durch Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels erreicht wird, nachweisen.

2.7.1. Materialien

Hepes-Puffer pH 7,4 bei 37°C:	145 mM NaCl
	5 mM KCl
	1 mM MgSO_4
	10 mM Hepes-Na
	10 mM Glukose
	1 mM CaCl_2
Reaktionsgemisch pro	Hepespuffer
Schale:	10 μM L-Arginin
	3 μM L- ^3H -Arginin
Stoppuffer:	PBS
	5 mM L-Arginin
	4 mM EDTA
Extraktionspuffer:	20 mM Hepes-Na, pH 5,5

Chemikalien:

L-Arginin	Fluka
L-[2,3,4,5- ³ H]Arginin	Amersham Pharmacia Biotech
DOWEX [®] 50WX8-200	Sigma
Szintillationscocktail:	
Rotiszint [®] eco plus	Carl Roth GmbH & Co

2.7.2. Durchführung

Zunächst wurden die Säulen mit dem Ionenaustauscher vorbereitet. Um bei dem trocken vorliegenden DOWEX den für den Versuch erforderlichen pH-Wert von 5,5 einzustellen, muss es dreimal mit 1 M NaOH-Lauge, dann zweimal mit destilliertem Wasser und zuletzt noch dreimal mit 20 mM HepesNa-Puffer, dessen pH-Wert auf 5,5 eingestellt wurde, gewaschen werden. Das DOWEX sollte mit 20 mM HepesNa feucht gehalten werden und muss auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt sein.

Dann wurden die Säulen mit 3,5 ml DOWEX (0,5 g/ml) gefüllt. Anschließend wurden die Säulen zweimal mit je 2 ml Extraktionspuffer gewaschen und das Eluat wurde verworfen. Das Verschließen der unteren Öffnung der Säule verhindert das Austrocknen. Bis zum Beladen wurden die Säulen bei 4 °C gekühlt.

Die auf Zellkulturschalen (d=6 cm) ausplattierten, konfluenten Zellen wurden zweimal mit je 2 ml 37 °C warmen Hepes-Puffer gewaschen, um sämtliche Mediumreste zu entfernen und in 2 ml Hepes-Puffer 30 min bei 37 °C inkubiert. Wurde mit Kinaseinhibitoren gearbeitet, wurden diese für 30 min zu den Zellen gegeben.

Dem Reaktionsgemisch, welches eine Temperatur von 37 °C haben sollte, wurden dann die stimulierenden Substanzen zugesetzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 ml Hepes-Puffer von der Schale genommen und verworfen. Dann wurde das auf 37 °C temperierte Reaktionsgemisch zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun nochmals 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem das Reaktionsgemisch von der Schale entfernt wurde und 2 ml

eiskalter Stopppuffer für 60 sec auf die Zellen gegeben wurde. Das im Stopppuffer enthaltene EDTA bindet Ca^{2+} , das in hoher Konzentration enthaltene L-Arginin verdrängt das tritiumgelabelte Arginin. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 500 μl 96%igem unvergällten Ethanol, der nach wenigen Minuten verdampft.

Auf das getrocknete Lysat wurde 2 ml Extraktionspuffer gegeben und 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde das Extrakt auf die gekühlte Säule gegeben. Da das Citrullin bei einem pH-Wert von 5,5 in neutraler Form vorliegt, passiert es im Gegensatz zum basischen Arginin die Säule. Nach Durchlaufen der Säule gewährleistete das Spülen mit 4 ml Aqua dest. eine bessere Citrullinausbeute. Das Eluat wurde in ein verschließbares Gefäß überführt, mit 12 ml Szintillationscocktail versetzt und mit diesem gründlich vermischt. Gemessen wurde die vom ^3H -markierten Citrullin abgegebene β -Strahlung mit dem Programm Easy Count im Szinticounter. Die in cpm angegebene Strahlung lässt eine Aussage über die eNOS-Aktivität der stimulierten Zellen gegenüber den unstimulierten, als Basalwert dienenden Zellen zu.

2.8. PKA-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der cAMP-abhängigen Protein Kinase A (PKA) wurde ein kommerzieller Kit eingesetzt. Nach einem von MacAla *et al.* 1998 entwickelten Protokoll wird mit dieser nichtradioaktiven Methode die Kinase-Aktivität der PKA in einem Zellextrakt gemessen. Man macht sich hierbei die fluoreszierende Eigenschaft von Kemptide, einem Substrat der PKA, zunutze. Im nichtphosphorylierten Zustand trägt das Kemptide (L-R-R-A-S-L-G) die Gesamtladung +1. Nach Phosphorylierung durch PKA ändert sich die Gesamtladung nach -1, was im elektrischen Feld zu einem veränderten Wanderungsverhalten gegenüber den nichtphosphorylierten Peptiden führt.

2.8.1. Materialien

Extraktionspuffer:	20 mM Tris (pH 7,4) 1 mM Di-Natriumpyrophosphat 1 mM EGTA 25 µg/ml Aprotinin
PepTag Non-Radioactive cAMP-dependent Protein Kinase Assay	Promega

2.8.2. Durchführung

Für diesen Versuch wurden konfluente BAECs auf 6 cm Gewebekulturschalen zunächst für 24 h in einem FCS-armen (1%) Medium kultiviert und anschließend mit den gewünschten Substanzen über die entsprechenden Zeiträume behandelt.

Vor der Extraktion wurde zweimal mit PBS gewaschen um Mediumbestandteile vom Zellrasen zu entfernen. Nachdem der Extraktionspuffer (100 µl/Schale) 10 min auf Eis einwirken konnte, wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale geschabt und nach Überführung in ein Eppendorfgefäß für 15 sec sonifiziert.

Anschließend wurden die Extrakte für 10 min mit 12000 rpm bei 4°C zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt (siehe oben).

Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte nach dem vom Hersteller des Kits empfohlenen Protokoll: Zunächst wurde die als Positivkontrolle dienende cAMP-abhängige PKA mit Verdünnungspuffer auf eine Endkonzentration von 2 µg/ml verdünnt. Je Probe wurde 5 µl PKA 5X Reaktionspuffer, A1 Peptid (Kemptide), 5X Aktivierungslösung, 1 µl Proteinschutzlösung und eine Menge H₂O zugefügt, die von der eingesetzten Menge Zellextrakt abhängig ist. Das Endvolumen je Probe muss 25 µl entsprechen, das Volumen des eingesetzten Extrakts muss so berechnet werden, dass die Proteinmenge 5 µg beträgt. Die beschriebene Mixtur wurde in 0,5 ml Gefäßen auf Eis angesetzt.

Zum Zeitpunkt 0 wurden die vorbereiteten Gefäße vom Eis in ein 30°C warmes Wasserbad überführt. Nach einer Minute wurde das Proteinextrakt beziehungsweise 5

µl der verdünnten PKA zugefügt, und es erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Negativkontrolle enthielt keinerlei Extrakt, sondern lediglich Wasser. Ein lichtgeschütztes Arbeiten ist empfehlenswert, da das fluoreszierende A1 Peptid lichtempfindlich ist. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Proben 10 min bei 95 °C gekocht und bis zur Beladung des Gels bei –20 °C gelagert.

Vor Beladung des 0,8%igen Agarosegels wurde zu jeder Probe 1 µl 80%iges Glycerol zugegeben. Bei 100 V wurden die Proben dann 15-18 min in einem horizontalen Gel aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris (pH 8,0). Dabei wandern die phosphorylierten Peptide zur Anode, während die nicht phosphorylierten Peptide zur Kathode wandern.

Durch Fotografieren des Gels mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm sind die Banden der fluoreszierenden Peptide erkennbar. Anhand der Fotografie ist eine qualitative Auswertung des Assays möglich.

2.9. Statistik

Eine statistische Analyse wurde bei den Vasorelaxationsexperimenten durchgeführt. Bei der Auswertung der anderen Versuche wurde aufgrund der geringen Fallzahl von einer Statistik abgesehen.

Die Vasorelaxation wurde in Prozent der Vorkontraktion mit Phenylephrin angegeben. Die ermittelten Daten wurden mit der Software SigmaStat auf signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wurden einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) und t-Tests durchgeführt.

3. Ergebnisse

Zu Beginn wurde die Wirkung von EGCG, dem biologisch wirksamsten Catechin des grünen Tees, auf intakte Organe untersucht. Mit Phenylephrin vorkontrahierte Rattenaortenringe wurden kumulativ mit steigenden Dosen EGCG behandelt. Abbildung 2 stellt eine Originalregistrierung des Verhaltens eines Rings dar. In einer Konzentration ab 1 μM ruft EGCG, nach einer initialen, reversiblen Kontraktion, eine leichte Dilatation des Gefäßes hervor. Die Zusammenfassung der Experimente ist in Abbildung 3 dargestellt. Das Maximum der Dilatation wurde bei 50 μM erreicht. Ringe, die mit dem NOS-Inhibitor L-NAME vorinkubiert wurden, zeigten bei EGCG-Konzentrationen von 1-25 μM keine Vasodilatation, erst bei 50 μM EGCG kam es zu einer Relaxation. Identische Beobachtungen wurden an Ringen gemacht, bei denen das Endothel entfernt wurde (Abbildung nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die durch EGCG hervorgerufene Relaxation der Aortenringe durch eine Induktion der NO-Produktion des Endothels bedingt ist.

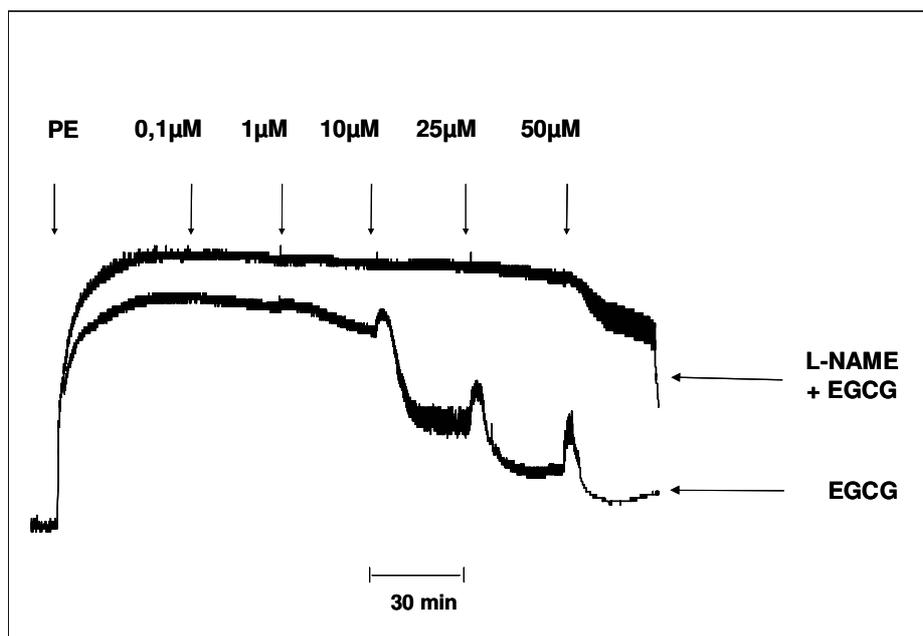


Abbildung 2: Effekte von EGCG auf die Vasodilatation vorbehandelter Aortenringe, Originalregistrierung. Die untere Kurve zeigt die Relaxation eines mit Phenylephrin vorkontrahierten Aortenrings mit steigender EGCG-Dosis. Die obere Kurve repräsentiert einen mit L-NAME vorinkubierten Ring. Dabei zeigt sich eine Vasodilatation ab einer EGCG-Dosis von 50 μM .

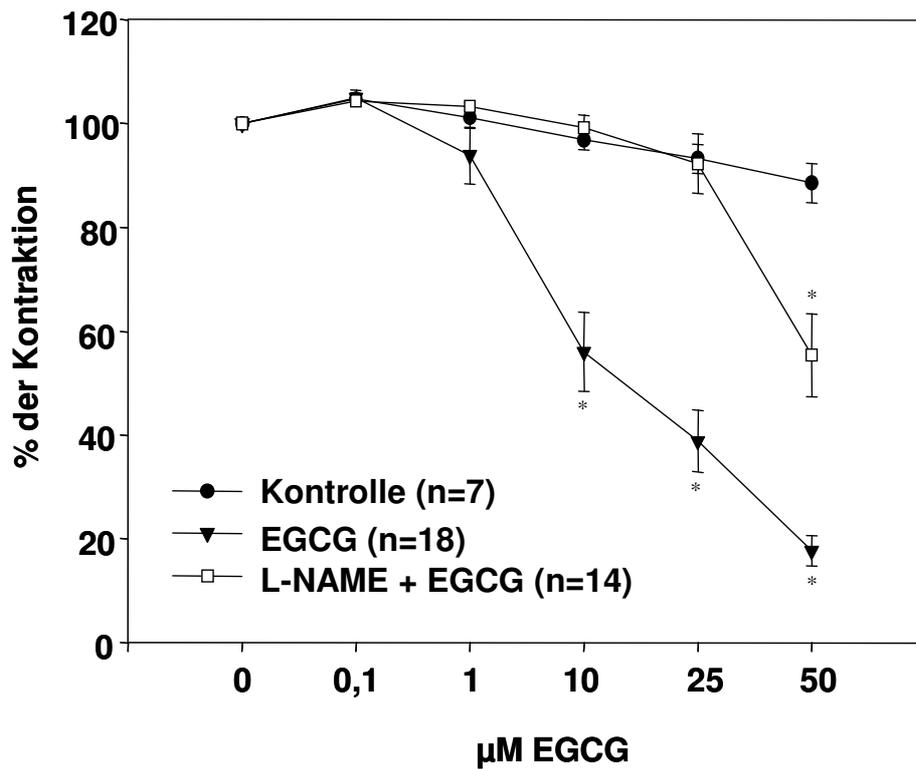


Abbildung 3: Effekte von EGCG auf die Vasodilatation vorbehandelter Aortenringe, Zusammenfassung mehrerer Experimente. EGCG wurde kumulativ zu den vorkontrahierten Ringen gegeben, als Kontrolle dienten unbehandelte, vorkontrahierte Ringe. Ausgewählte Ringe wurden vor Zugabe von EGCG mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. Die Relaxation ist im Graph als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Um zu überprüfen, ob EGCG eine Aktivierung der eNOS hervorruft, wurde ein eNOS-Aktivitätstest in lebenden Zellen durchgeführt. Zur Erstellung einer Dosiswirkungskurve wurden BAECs (bovine Aortenendothelzellen) für 15 min mit steigenden EGCG-Konzentrationen stimuliert. Abbildung 4 zeigt, dass bei einer EGCG-Konzentration von 50 μM die Aktivität der eNOS gegenüber dem Basalwert verdoppelt war, bei 100 μM EGCG stieg sie auf das Vierfache an.

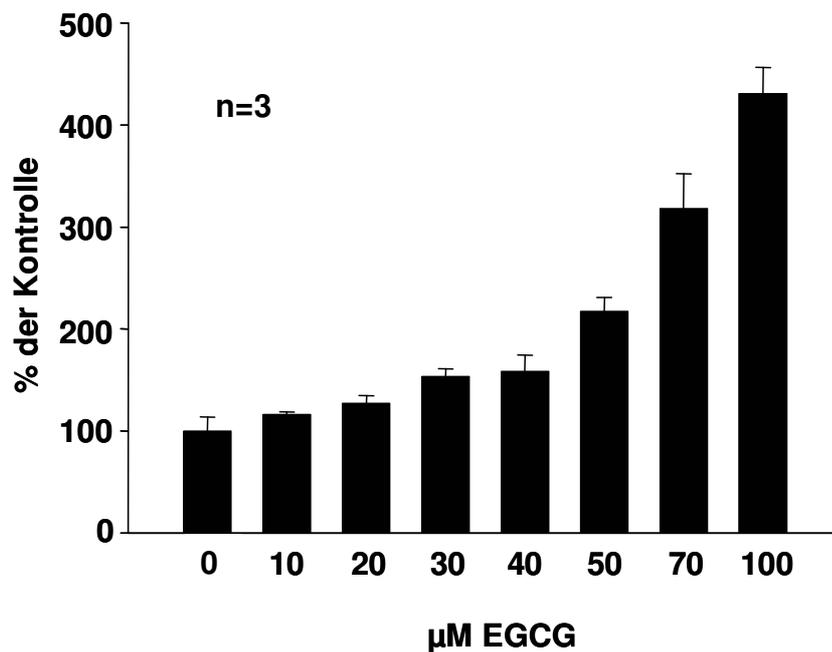


Abbildung 4: eNOS Aktivitätstest mit BAECs. Die Zellen wurden 15 min mit den angegebenen Dosen EGCG behandelt, als Kontrolle dienten nicht behandelte Zellen. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Für Untersuchungen der eNOS-Aktivität nach Behandlung mit EGCG in einem anderen Zelltyp, wurde der gleiche Versuch mit CPAEs (bovinen Pulmonalarterienzellen) durchgeführt. Wie in Abbildung 5 dargestellt, reagierten diese Zellen bei einer EGCG-Konzentration von 50 μM mit einer Erhöhung der Aktivität auf das 1,5-fache. Bei einer Konzentration von 100 μM EGCG konnte eine Verdopplung der Aktivität beobachtet werden.

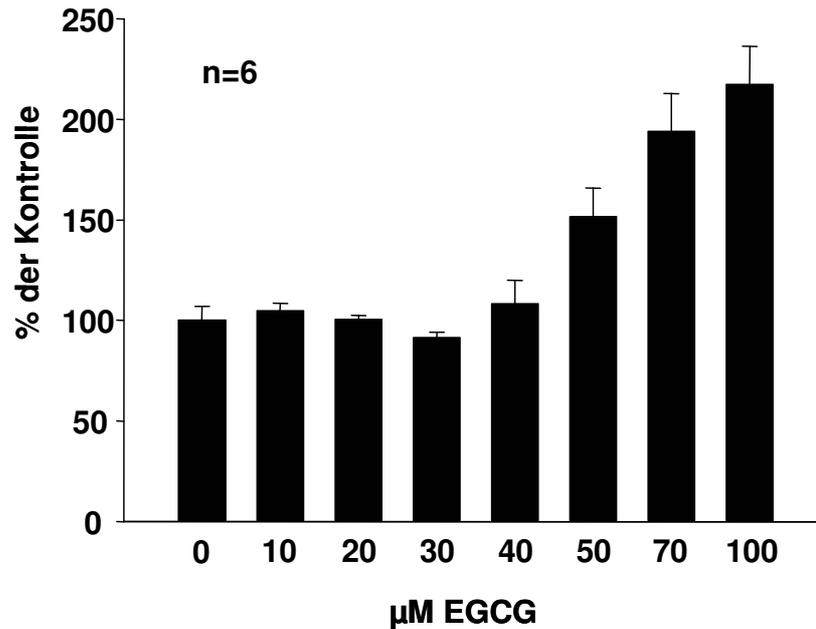


Abbildung 5: eNOS-Aktivitätstest mit CPAEs. Die Zellen wurden 15 min mit den angegebenen Dosen EGCG behandelt, als Kontrolle dienten nicht behandelte Zellen. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Diese schnelle Aktivitätssteigerung kann durch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und durch eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus bedingt sein. Um den zugrunde liegenden Mechanismus zu untersuchen, wurde ein Western Blot von Extrakten aus Zellen, die mit EGCG behandelt wurden, angefertigt. Der eingesetzte Antikörper ist spezifisch für phosphoryliertes Ser1179 der bovinen eNOS. Die Zellen (BAEC) wurden 15 min mit steigenden EGCG-Konzentrationen behandelt und mit einem speziellen Puffer, dem Phosphataseinhibitoren zugesetzt waren, lysiert. Abbildung 6 zeigt eine zunehmende Ser1179-Phosphorylierung der eNOS mit steigenden EGCG-Konzentrationen.



Abbildung 6: Darstellung der durch EGCG hervorgerufenen eNOS-Phosphorylierung im Western Blot. BAECs wurden 15 min mit den angegebenen Konzentrationen EGCG behandelt und anschließend lysiert. Als Erstantikörper diente ein phosphospezifischer eNOS-Antikörper gegen Ser1179. Diese Abbildung repräsentiert 3 unabhängige Versuche.

Um die beteiligten Signalwege der EGCG-vermittelten eNOS-Phosphorylierung aufzuklären, wurden in die Signaltransduktion involvierte Kinasen untersucht. Dazu wurden pharmakologische Inhibitoren dieser Enzyme eingesetzt. Die Zellen wurden 30 min vor Stimulation durch EGCG mit den entsprechenden Inhibitoren vorbehandelt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die PI3-K (Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase) und die ERK1/2 (Extracellular regulated signal kinases 1/2) häufig über eine Aktivierung weiterer Kinasen an der eNOS-Phosphorylierung beteiligt sind. Ein untersuchter Signalweg ist die Phosphorylierung von Akt an Ser473 durch PI3-K. Akt phosphoryliert wiederum eNOS an Ser1179 (Dimmeler et al., 1999). Mit Hilfe des PI3-K-Inhibitors LY294002 (30 μ M) und des ERK1/2-Inhibitors PD98059 (10 μ M) wurde untersucht, ob diese Kinasen die EGCG-induzierte eNOS-Phosphorylierung an Ser1179 beeinflussen. Der Western Blot in Abbildung 7 zeigt, dass eine Stimulation mit 100 μ M EGCG für eine Stunde eine Phosphorylierung von eNOS an Ser1179, von Akt an Ser473 und von ERK1/2 an Thr202/Tyr204 induzierte. Nach Vorbehandlung mit LY294002 wurden weder eNOS an Ser1179 noch Akt an Ser473 phosphoryliert, wohingegen die Phosphorylierung von ERK1/2 unbeeinflusst geblieben ist. PD98059 verhinderte die Phosphorylierung von ERK1/2, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von eNOS und Akt.

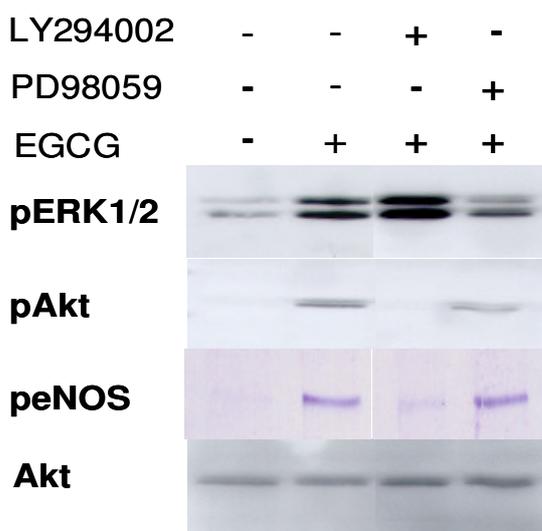


Abbildung 7: EGCG-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2, Akt und eNOS nach Vorbehandlung mit Kinaseinhibitoren. BAECs wurden 30 min mit 30 μ M LY294002 bzw. mit 10 μ M PD98059 vorbehandelt und anschließend eine Stunde mit EGCG stimuliert. Als Erstantikörper wurden phosphospezifische Antikörper gegen Akt (Ser473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und eNOS (Ser1179) verwendet. Der Anti-Akt Antikörper diente als Ladekontrolle. Diese Abbildung ist repräsentativ für drei separate Experimente.

In Abbildung 8 ist dargestellt, dass die durch 100 μM EGCG induzierte eNOS-Aktivitätssteigerung durch LY294002 vollständig inhibiert, durch PD98059 aber nicht beeinflusst wurde. Auch PD98059-Konzentrationen von 20 μM und 50 μM hatten keinen Einfluss auf die EGCG-induzierte eNOS-Aktivitätserhöhung (Abbildung nicht gezeigt).

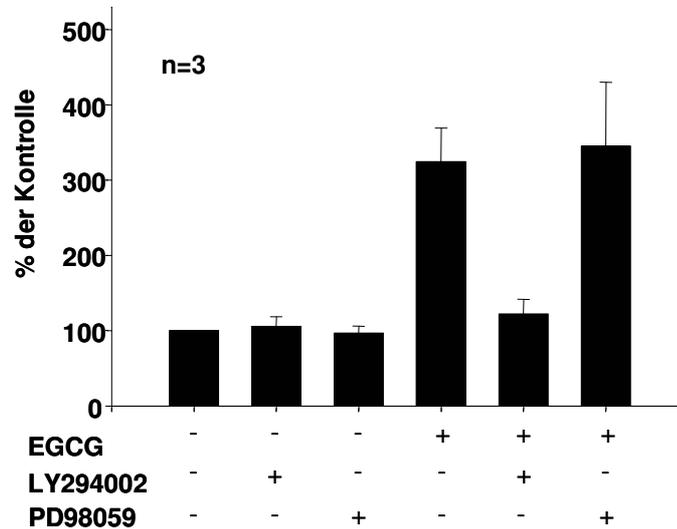


Abbildung 8: eNOS-Aktivität von BAECs nach Vorbehandlung mit dem PI3-K-Inhibitor LY294002 bzw. mit dem ERK1/2-Inhibitor PD98059. Die Zellen wurden 30 min mit 30 μM LY294002 oder mit 10 μM PD98059 vorbehandelt. Die eNOS-Aktivität wurde nach 15-minütiger Stimulation mit EGCG gemessen. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Ein weiterer, häufig verwendeter Inhibitor der PI3-K ist Wortmannin. Dieser Hemmstoff wurde an CPAEs getestet. Abbildung 9 zeigt, dass die Vorinkubation von CPAEs mit 100 nM Wortmannin den EGCG-induzierten Aktivitätsanstieg der eNOS hemmte.

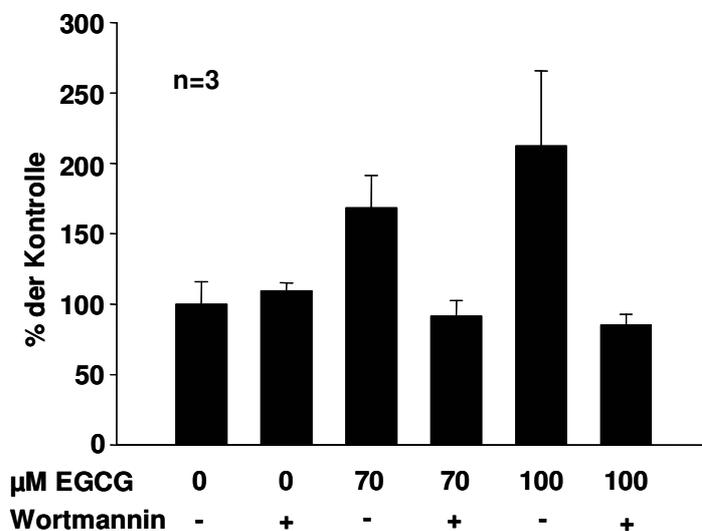


Abbildung 9: eNOS-Aktivität von CPAEs nach 30-minütiger Vorbehandlung mit 100 nM Wortmannin. Anschließend wurde mit 70 μM bzw. 100 μM EGCG für 15 min stimuliert und die eNOS-Aktivität gemessen. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Eine weitere Kinase, die direkt an der eNOS-Phosphorylierung beteiligt ist, stellt die PKA dar. Wie Boo et al. zeigen konnten, ist PKA beispielsweise an der eNOS-Phosphorylierung durch auf das Endothel einwirkende Scherkräfte beteiligt (Boo et al., 2002). PKI (14-22 amide), ein zellpermeables Peptid, inhibiert die PKA hochspezifisch. Die Aktivierung der PKA durch EGCG wurde durch einen Enzymaktivitätstest untersucht. In Abbildung 10 ist ein PKA-Assay nach Behandlung mit EGCG dargestellt. Dabei bewirkt EGCG eine Erhöhung des Anteils der durch PKA phosphorylierten Kemptide, was durch Vorbehandlung der Zellen mit PKI verhindert wird.

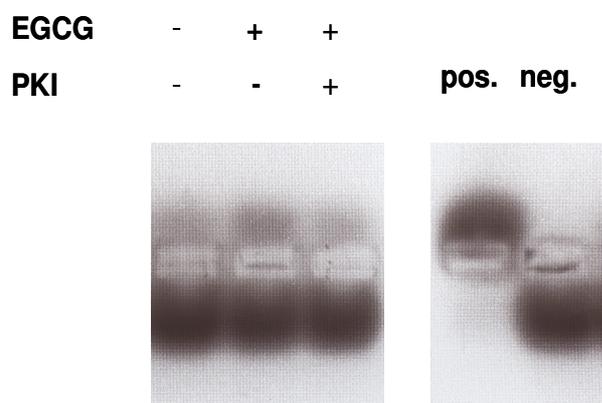


Abbildung 10: Messung der PKA-Aktivität von BAECs nach EGCG-Behandlung. Die Zellen wurde 30 min mit PKI vorinkubiert und anschließend 1 h mit 100 μ M EGCG stimuliert. Pos. zeigt die phosphorylierte Form des PKA-spezifischen fluoreszierenden Substrats Kemptide. Neg. zeigt die nicht phosphorylierte Form nach Trennung in einem Agarosegel. Die Abbildung ist repräsentativ für drei Experimente.

Abbildung 11 zeigt, dass der Einsatz von PKI die EGCG-induzierte eNOS-Aktivitätssteigerung um etwa 50% hemmte.

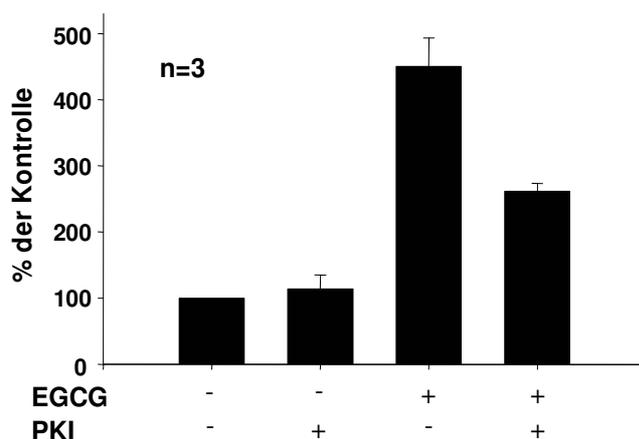


Abbildung 11: Effekt des PKA-Inhibitors PKI auf die EGCG-induzierte Stimulation der eNOS von BAECs. Die Zellen wurde für 30 min mit 20 μ M PKI vorbehandelt und dann 15 min mit 100 μ M EGCG stimuliert. Die Aktivität der Zellen wurde mit dem eNOS-Aktivitätstest gemessen. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Proteinkinase B (Akt) ist in der Lage, die eNOS über Phosphorylierung von Ser 1179 zu aktivieren (Dimmeler et al., 1999). Der eNOS-Aktivitätstest in Abbildung 12 zeigt, dass bei gleichzeitiger Inhibition von Akt durch SH-5 und der PKA durch PKI eine Aktivierung der eNOS durch EGCG vollständig blockiert wurde.

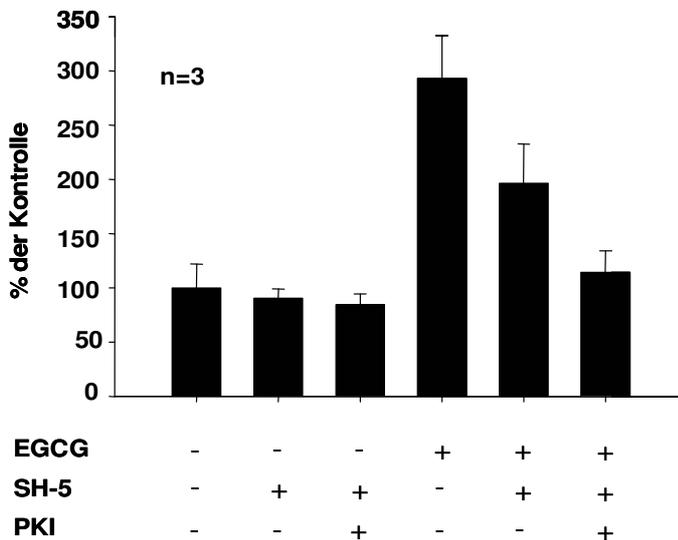


Abbildung 12: EGCG-induzierte eNOS-Aktivität von BAECs nach Vorbehandlung mit SH-5 bzw. PKI. Die Zellen wurden mit 20 μ M SH-5 oder mit 20 μ M PKI vorbehandelt und anschließend mit 100 μ M EGCG stimuliert. Die eNOS-Aktivität wurde nach 15-minütiger Stimulation gemessen. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Bei Verwendung eines phosphospezifischen Akt-Antikörpers, wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigt sich ein zur eNOS-Phosphorylierung analoges Bild. Die EGCG-stimulierte Phosphorylierung von eNOS an Ser1179 lies sich durch Vorbehandlung der Zellen mit SH-5, einem Akt-Inhibitor, hemmen. PKI hingegen beeinflusste weder die EGCG-induzierte Akt Phosphorylierung, noch die Phosphorylierung von Ser1179 der eNOS.

EGCG	-	+	+	+
SH-5	-	-	+	-
PKI	-	-	-	+

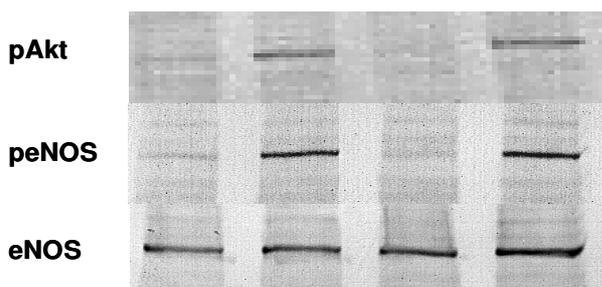


Abbildung 13: EGCG-induzierte Phosphorylierung von eNOS und Akt von BAECs nach 30-minütiger Vorbehandlung mit SH-5 bzw. PKI. Die Zellen wurden mit 20 μ M SH-5 oder mit 20 μ M PKI vorbehandelt, eine Stunde mit 100 μ M EGCG stimuliert und anschließend lysiert. Diese Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Abbildung 14 zeigt einen Zeitverlauf der EGCG-induzierten Phosphorylierung anhand eines Western Blots. Neben einem phosphospezifischen eNOS-Antikörper wurden phosphospezifische Antikörper gegen ERK1/2 und Akt verwendet. Nach 15 min Behandlung der Zellen war eine schwache Signalerhöhung von Ser1179 der eNOS erkennbar. Ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung war jedoch erst bei Behandlungszeiträumen über 30 min zu verzeichnen. Die Phosphorylierung von Ser1179 der eNOS blieb über 6 h erhalten. Die Phosphorylierung von Akt verlief analog zur eNOS-Phosphorylierung. Die ERK1/2-Phosphorylierung war dagegen transient und erreichte nach etwa 6 h wieder den Ausgangswert.

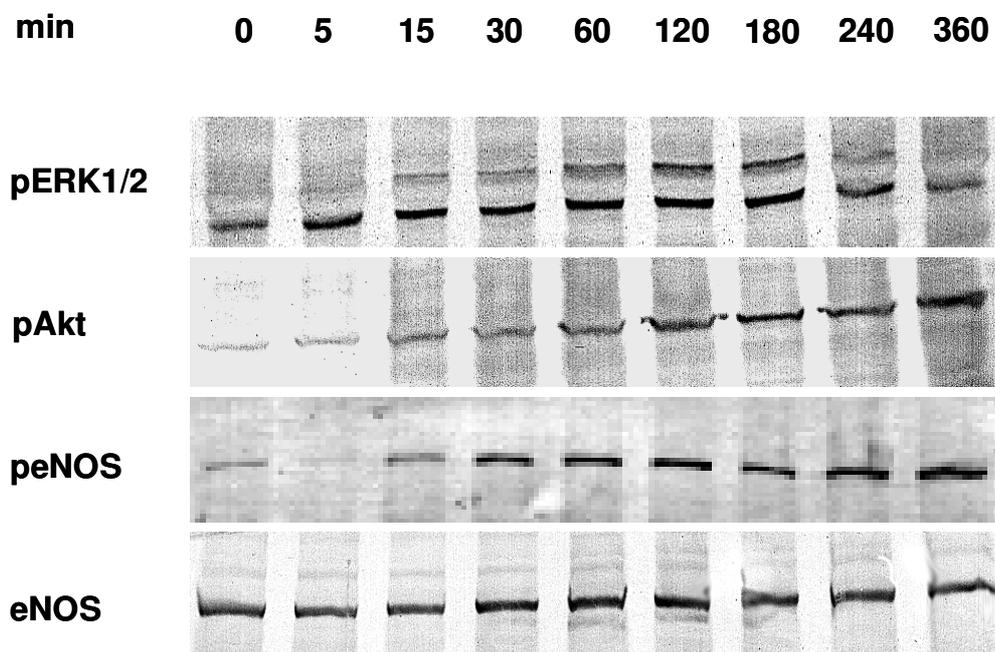


Abbildung 14: Zeitkinetik der EGCG-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2, Akt und eNOS. BAECs wurden über die angegebenen Zeiträume mit 100 μ M EGCG inkubiert. Für den Western Blot wurden als Erstantikörper phosphospezifische Antikörper gegen ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Akt (Ser437) und eNOS (Ser1179) eingesetzt. Als Ladekontrolle diente ein Anti-eNOS-Antikörper. Diese Abbildung repräsentiert drei separate Experimente.

Um zu überprüfen, ob die anhaltende Phosphorylierung von eNOS einen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt, wurden Zellen, wie in Abbildung 15 dargestellt, 4 h mit 100 μM EGCG vorbehandelt und anschließend die eNOS-Aktivität gemessen. Unstimuliert (basal) ließ sich kein Unterschied in der Aktivität zwischen nicht vorbehandelten und mit EGCG vorbehandelten Zellen feststellen. Wurde jedoch für 15 min mit Ca^{2+} -Ionomycin stimuliert, war die eNOS-Aktivität in den mit EGCG vorbehandelten Zellen doppelt so hoch wie in den nicht vorbehandelten Zellen.

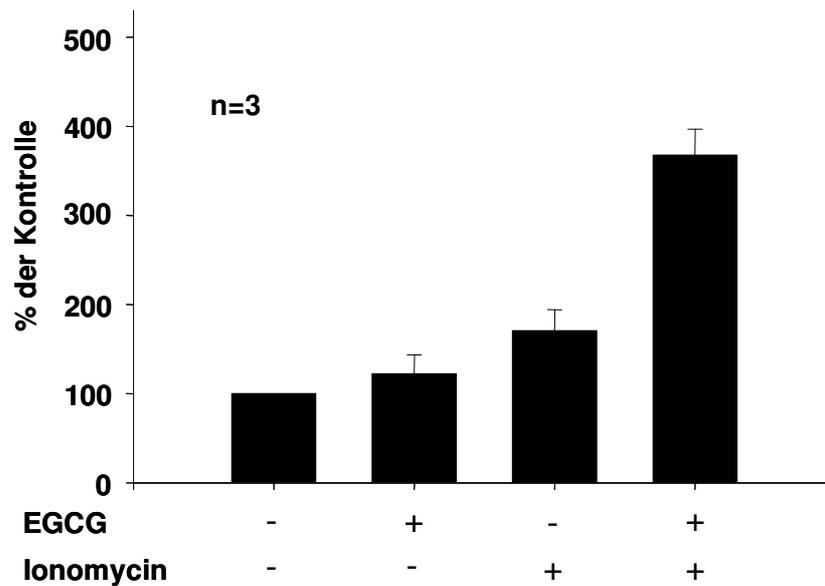


Abbildung 15: Ca^{2+} -Ionomycin-induzierte eNOS-Aktivität nach Vorbehandlung mit EGCG. BAECs wurden über vier Stunden mit 100 μM EGCG vorbehandelt. Ein Teil der Zellen wurde 15 min mit 2 μM Ca^{2+} -Ionomycin stimuliert. Die eNOS-Aktivität wurde als % der Kontrolle dargestellt. Aufgezeigt sind Mittelwerte \pm SEM.

Um eine mögliche Auswirkung langfristiger EGCG-Exposition auf die Veränderung der eNOS-Proteinmenge zu untersuchen, wurden verschiedene Zellen mit EGCG-Konzentrationen von 10 nM bis 100 μ M über Zeiträume von 24 und 72 h inkubiert. Die Western Blots in Abbildung 16, bei denen ein Antikörper gegen das eNOS-Protein eingesetzt wurde, zeigen keine deutlichen Unterschiede zwischen den mit EGCG behandelten Zellen und der Kontrolle.

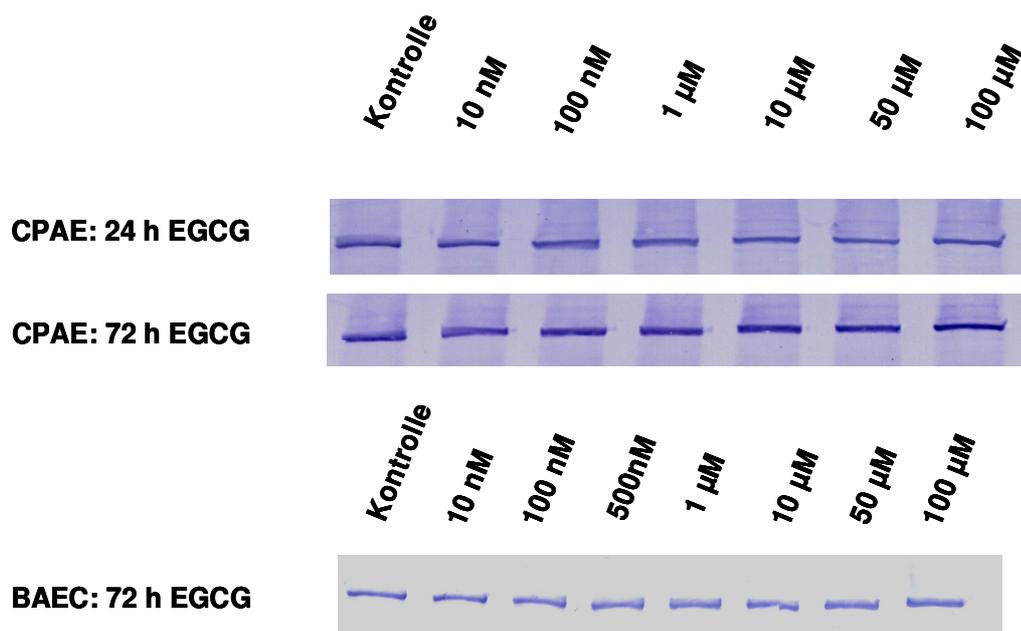


Abbildung 16: Mittelfristige Inkubation von bovinen Endothelzellen mit EGCG. Endothelzellen wurden für 24 bzw. 72 h mit den angegebenen Konzentrationen EGCG (0,01-100 μ M) inkubiert. Die Kontrollen erhielten keinerlei Behandlung. Als Erstantikörper diente ein Anti-eNOS-Antikörper. Diese Western Blots repräsentieren drei unabhängige Versuche.

4. Diskussion

Aufgrund der hohen Prävalenz und Mortalität der KHK in der westlichen Bevölkerung sind Prophylaxe und Therapie dieser Erkrankung von großem wissenschaftlichem Interesse. Dass Tee eine kardio- und vasoprotektive Wirkung besitzt, konnte in den letzten Jahren durch epidemiologische und klinische Studien gezeigt werden. Die zugrunde liegende Wirkungsweise scheint komplex zu sein. Diese experimentelle Arbeit untersucht die Wirkung von EGCG, einem potenten Inhaltsstoff des Tees, auf ein Schlüsselenzym des kardiovaskulären Systems, die endotheliale NO-Synthase. Aus den von uns durchgeführten Versuchen geht hervor, dass EGCG zu einer endothelabhängigen Vasodilatation von Rattenaortenringen führt. Dies scheint durch eine erhöhte NO-Produktion der Endothelzellen bedingt zu sein. EGCG führt offenbar in der Endothelzelle zu einer Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der eNOS. In diesen Prozess sind unseren Resultaten zufolge die Phosphokinasen PI3-K, PKA und Akt involviert.

Die von uns in den Vasorelaxationsversuchen gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Teecatechine an durch Phenylephrin vorkontrahierten Rattenaorten eine Vasodilatation hervorrufen. Diese Resultate bestätigen die Beobachtungen, die Huang et al. zuvor schon an Mesenterialgefäßen von Ratten machen konnten (Huang et al., 1999).

Es gibt jedoch auch experimentelle Studien, die zu anderen Ergebnissen führten. Die Arbeitsgruppe von Adriambeloso setzte repräsentativ für die Flavonolgruppe (+)-Epicatechin ein, welches keine Vasorelaxation hervorrufen konnte (Adriambeloso et al., 1998). Allerdings gilt dieses Catechin als weniger potent als EGCG. Die Experimente von Sanae et al. ergaben, dass Catechine, unter anderem auch EGCG, die phenylephrininduzierte Vasokonstriktion sogar potenzieren beziehungsweise eine durch Acetylcholin hervorgerufene Relaxation abschwächen. Dieser Effekt wird von den Autoren durch eine Bindung und somit eine Neutralisierung des Stickstoffmonoxids durch die zugegebenen Catechine erklärt (Sanae et al., 2002).

Eine Studie konnte nachweisen, dass Teecatechine duale Effekte hervorrufen: zum einen führen sie zu einer endothelunabhängigen Vasokonstriktion, zum anderen zu einer endothelabhängigen Vasodilatation (Shen et al., 2003). Diese Tatsache könnte

die initiale, passagere Vasokonstriktion unmittelbar nach Zugabe von EGCG zu den Aortenringen in unseren Gefäßversuchen erklären.

Lim und seine Mitarbeiter haben einen Extrakt des Grünen Tees (GTE), welcher zahlreiche Einzelkomponenten enthält, mit isoliertem EGCG bezüglich vasodilatatorischer Eigenschaften und Beeinflussung des Blutdrucks von Ratten nach Norepinephrininjektion verglichen. Bei diesen Experimenten ergab sich, dass EGCG im Gegensatz zu GTE weder bei durch Phenylephrin, noch durch hochdosiertes KCl vokontrahierten Rattenaortenringen eine Dilatation auslöste. Auch der norepinephrininduzierte Blutdruck von Ratten konnte nicht gesenkt werden. Der Hypothese dieser Arbeitsgruppe zufolge beinhaltet GTE Substanzen, die über andere Mechanismen wirken als die Polyphenole (Lim et al., 2003).

EGCG führt in verschiedenen Zelllinien zu einer Produktion von H_2O_2 (Shen et al., 2003; Hong et al., 2002). H_2O_2 scheint in bestimmten Konzentrationen eine Aktivierung von eNOS und eine Relaxation von Kaninchengefäßringen hervorzurufen (Thomas et al., 2002). Aufgrund dessen wurden bei unseren Untersuchungen Gefäßrelaxationsversuche in Anwesenheit von Katalase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von H_2O_2 in H_2O und O_2 . Die Ergebnisse, die hierbei gewonnen wurden, unterscheiden sich jedoch nicht von denen ohne Katalase, was auf einen von der Produktion von H_2O_2 unabhängigen Wirkmechanismus von EGCG auf die eNOS schließen lässt. Die Konzentrationen von H_2O_2 , die für eine eNOS-Aktivierung nötig sind, liegen allerdings deutlich über denen, die durch EGCG in Zellen generiert werden (Hong et al., 2002).

Unsere Resultate der Vasorelaxationsexperimente deuten auf eine NO-bedingte Dilatation der Aortenringe durch EGCG hin. Der Prostaglandin-/Prostazyklinstoffwechsel wurde durch den Zusatz des Zyklooxygenaseinhibitors Diclophenac zur Krebs-Henseleit Lösung blockiert. Die Inkubation der Ringe mit dem NOS-Inhibitor L-NAME verhinderte jedoch eine Dilatation der Gefäße durch EGCG. Ringe, von denen das Endothel entfernt wurde, reagierten nicht auf EGCG. Erst EGCG-Konzentrationen ab $50 \mu M$ führten zu einer endothel- und NO-unabhängigen Dilatation.

Um die unmittelbare Wirkung von EGCG auf die NO-Produktion zu testen, wurde ein eNOS-Aktivitätstest in Endothelzellen durchgeführt. Sowohl BAECs, als auch CPAEs reagierten auf die Inkubation mit EGCG mit einer Erhöhung der eNOS-Aktivität. Die BAECs reagierten schon bei EGCG-Konzentrationen ab 30 μM mit einer leichten Aktivitätserhöhung sowie mit einer Steigerung auf das Vierfache bei 100 μM . Bei den CPAEs wurde ab 50 μM eine erhöhte eNOS-Aktivität gemessen, bei 100 μM ca. eine Verdopplung im Vergleich zum Basalwert. Diese quantitativen Unterschiede könnten mehrere Ursachen haben. Zum einen wurden die beiden Zelllinien in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert, zum anderen entstammen sie verschiedenen vaskulären Stromgebieten. Die Aortenzellen sind den hohen Druckbedingungen des großen Kreislaufs angepasst, während die CPAEs aus den Pulmonalarterien und damit aus dem Niedrigdrucksystem stammen.

Die innerhalb von wenigen Minuten stattfindende Aktivierung der eNOS deutet darauf hin, dass eNOS im Falle der EGCG-Stimulation posttranslational reguliert wird und nicht über die Proteinmenge. Die Resultate des Western Blots, bei denen ein Phospho-eNOS-Antikörper eingesetzt wurde, zeigten schon nach 15 min Stimulation eine verstärkte Phosphorylierung an Ser1179. Die Ergebnisse der Stimulation von Endothelzellen über 24 beziehungsweise 72 h unterstreichen die Hypothese: Durch die Western Blots konnte keine Änderung der eNOS-Proteinmenge nachgewiesen werden. Bei einer Aktivitätserhöhung durch Phosphorylierung kann sich die Zelle innerhalb kürzester Zeit der physiologischen Situation anpassen und so beispielsweise auf eine Belastung durch Scherkräfte mit einer erhöhten NO-Produktion reagieren. Auch Substanzen wie Estrogen, VEGF oder Sphingosin 1-Phosphat rufen eine Aktivierung auf diesem Weg hervor (Haynes et al., 2000; Igarashi und Michel, 2001).

Zusätzlich sollte der Signalweg, über den EGCG die eNOS in BAECs aktiviert, näher charakterisiert werden. Hierzu wurde die Rolle einiger Proteinkinasen, die bereits in der Literatur als Aktivatoren der eNOS beschrieben wurden, untersucht. Nach unseren Ergebnissen sind vor allem PKA und Akt, sowie PI3-K in die Signaltransduktion involviert, wohingegen eine Beteiligung von ERK1/2 nicht nachgewiesen werden konnte. Nach Behandlung der Zellen mit EGCG zeigte der Western Blot eine Phosphorylierung von eNOS (Ser1179), welche zeitgleich mit der Phosphorylierung von Akt (Ser437) auftrat. Zwar wurde durch die Stimulation mit EGCG auch eine

Phosphorylierung der ERK1/2 induziert, diese scheint jedoch in unseren Versuchen für die eNOS-Aktivierung keine Rolle zu spielen, da der Einsatz von PD98059, einem Inhibitor der Erk1/2, auf die eNOS-Aktivierung keinen Einfluss hatte. Die Arbeitsgruppe um Mineo konnte nachweisen, dass Erk1/2 jedoch grundsätzlich in die Aktivierung von eNOS involviert sein kann. Die HDL-induzierte Ser1179-Phosphorylierung wurde zwar durch Vorbehandlung der Zellen mit PD98059 nicht beeinflusst, die Steigerung der eNOS-Aktivität durch HDL konnte jedoch durch den Inhibitor vollständig verhindert werden (Mineo et al., 2003). Eine Beteiligung der PKA an der EGCG-induzierten Aktivierung der eNOS in unseren Versuchen wurde sowohl durch den PKA-Assay, als auch durch die eNOS- Aktivitätstests, bei denen eine EGCG-induzierte Erhöhung der Enzymaktivität mit dem PKA-Inhibitor PKI vermindert war, nachgewiesen. Die verringerte Phosphorylierung von eNOS (Ser1179) und die damit einhergehende Aktivitätsminderung nach pharmakologischer Inhibition der Akt unterstreicht die Rolle dieser Kinase für die eNOS-Aktivierung, die schon 1999 von Dimmeler et al. beschrieben wurde (Dimmeler et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass PKA nach Einfluss von Scherkräften eNOS an Ser1179 (Boo et al., 2002) und an Ser635 (Michell et al., 2002) phosphoryliert und dadurch aktiviert. In unseren Versuchen hatte die pharmakologische Inhibition der PKA vor Stimulation mit EGCG im Western Blot keinen Einfluss auf die eNOS-Phosphorylierung an Ser1179 sowie auf die Akt-Phosphorylierung an Ser437. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass in unseren Untersuchungen keine Beeinflussung der Akt durch die PKA gegeben war, und dass die eNOS-Phosphorylierung von Ser1179 nicht durch PKA erfolgte. Da zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Antikörper gegen Phospho-Ser635 erhältlich war, konnte ein Einfluss der Phosphorylierung der eNOS an Ser635 durch die PKA nicht untersucht werden. Die gleichzeitige Inhibition beider Kinasen führte zu einer vollständigen Blockierung der EGCG-induzierten eNOS-Aktivierung, was auf eine parallele Aktion der beiden Kinasen hindeutet. Ein identisches Resultat erhielt man nach Inhibition der PI3-K durch LY294002 oder durch Wortmannin. Die PI3-K liegt in der intrazellulären Signalkaskade oberhalb von PKA und Akt. Arbeitsgruppen in der Tumorforschung haben herausgefunden, dass EGCG die Aktivität der für den Zellzyklus entscheidenden Kinasen MAPK, ERK1/2 und Akt hemmt (Sah et al., 2004). Die Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit EGCG über einen Zeitraum von 12 beziehungsweise 24 h führte zu einer verringerten Expression der konstitutiven PI3-K

(Siddiqui et al., 2004). Diese Ergebnisse widersprechen scheinbar unseren Resultaten. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass jede Zellart über andere, charakteristische Rezeptor- und Enzymausstattungen verfügt und dass unterschiedliche Bedingungen bezüglich des Angebots an Kofaktoren und Signaltransduktionskinasen vorliegen. Die Rezeptoren, über die EGCG in primären Endothelzellen wirkt, sind bis jetzt nicht bekannt.

Die in vitro gewonnenen Daten dieser Arbeit zeigen, dass EGCG das Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase, die endotheliale NO-Synthase, aktiviert und eine endothelabhängige Vasodilatation bewirkt. Die Situation in vivo ist natürlich komplexer, eine Übertragung der Daten ist nur bedingt möglich. Die Plasmacatechinkonzentrationen liegen nach Teegeuss bei etwa 1 μM (Yang et al., 1998; Umegaki et al., 2001). Die Catechinkonzentration, die beim eNOS-Aktivitätstest in Zellen zu einer deutlichen Aktivitätserhöhung des Enzyms führte, liegt bei rund 50 μM und damit wesentlich höher als die durch Teegeuss zu erreichenden Plasmaspiegel von Teecatechinen. An den Rattenaortenringen jedoch konnte schon eine leichte Vasodilatation bei 1 μM EGCG beobachtet werden, also in relevanten physiologischen Konzentrationen.

Des Weiteren bleibt das Enzym nach Stimulation durch Catechine über einen Zeitraum von bis zu 6 h phosphoryliert und kann somit stärker aktiviert werden. Tee wird in vielen Kulturen über den gesamten Tag hinweg verteilt getrunken. Das könnte zu einem längerfristig erhöhten Catechinspiegel führen und für eine anhaltende Wirkung des Tees sorgen. Möglicherweise wird dabei ständig eine bestimmte Menge an eNOS aktiviert, was für den Organismus günstige Auswirkungen im Hinblick auf eine Reduktion des KHK-Risikos haben kann. Der Unterschied in den effektiven EGCG-Konzentrationen zwischen den Zellkulturexperimenten und den Aortenringen ist auffallend. Für die Organkamerexperimente wurden Aorten von Ratten verwendet, wohingegen für die Zellkulturexperimente Zellen verwendet wurden, die zwar aus der aortalen Strombahn stammen, aber von Rindern und damit von einer anderen Tierart. Der wesentliche Unterschied besteht vermutlich jedoch darin, dass die Aortenringe ein Organsystem repräsentieren, die Endothelzellen hingegen einen Verband gleicher Zellen.

Durch diese Arbeit wurden bereits beschriebene Beobachtungen einer EGCG-induzierten endothelabhängigen Vasodilatation bestätigt. Zum ersten Mal konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Mechanismus auf eine Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS zurückzuführen ist. EGCG aktivierte eine Signalkaskade, an der die Proteinkinasen PI3-K, Akt und PKA beteiligt sind, und in deren Folge die Phosphorylierung von Ser1179 der eNOS geschieht. Vermutlich sind weitere Kinasen in diesem Prozess beteiligt und andere Phosphorylierungsstellen der eNOS werden durch EGCG modifiziert.

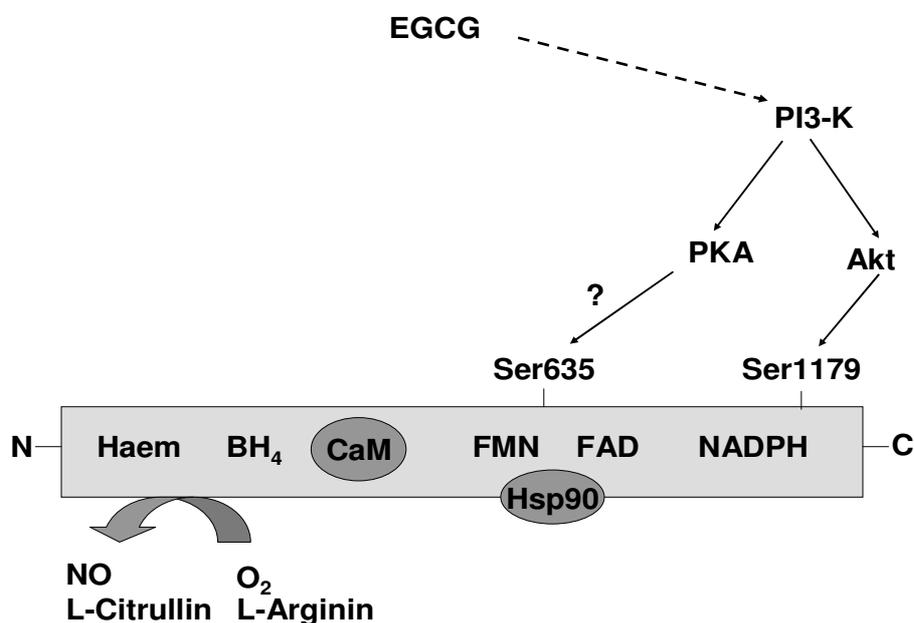


Abbildung 17: Möglicher Signalweg der EGCG-induzierten eNOS-Phosphorylierung. Die PI3-K scheint dann sowohl PKA als auch Akt zu aktivieren. Akt wiederum phosphoryliert eNOS an Ser1179, PKA könnte zu einer Phosphorylierung von Ser635 führen.

Die Aktivierung der eNOS könnte eine mögliche Ursache für den empirisch schon lange bekannten protektiven Effekt von Tee auf das Herz-Kreislaufsystem sein. Sicherlich spielen hierbei auch andere Eigenschaften des EGCGs eine Rolle, wie etwa die potenten antioxidativen Eigenschaften.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten bei der Entwicklung von, nebenwirkungsarmen Medikamenten, die die Endothelfunktion verbessern, hilfreich

sein. Auch im Hinblick auf die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen könnte der regelmäßige Genuss von Tee interessant sein.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Teecatechin EGCG die endotheliale NO-Synthase von Endothelzellen aktiviert. Dies geschieht wahrscheinlich über einen PI3-K, PKA und Akt-abhängigen Signalweg, der zu einer Phosphorylierung der eNOS an Ser1179 führt.

Zunächst konnte an Rattenaortenringen eine EGCG-induzierte, dosisabhängige Vasorelaxation nachgewiesen werden, die bis zu einer EGCG-Konzentration von 25 μM endothel- und NO-abhängig war. Die Stimulation zweier verschiedener Endothelzelltypen mit EGCG führte zu einer dosisabhängigen Aktivierung der eNOS, was durch einen eNOS-Aktivitätstest in lebenden Zellen nachgewiesen werden konnte.

Durch Western Blots konnte gezeigt werden, dass bei dieser schnellen eNOS-Aktivierung eine Phosphorylierung des Enzyms involviert ist. Eine 15-minütige Inkubation mit 100 μM EGCG führte zu einer Phosphorylierung von eNOS an Ser1179, von Akt an Ser473 und von ERK1/2 an Thr202/Tyr204.

Die Aktivierung der eNOS und Phosphorylierung von Ser1179 wurden durch 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit PI3-K-Inhibitoren (LY 294002, Wortmannin) vollständig gehemmt. Inkubation mit Inhibitoren der PKA (PKI) oder der Akt (SH-5) senkten die EGCG-induzierte eNOS-Aktivierung partiell. SH-5 verhinderte sowohl die Phosphorylierung der Akt an Ser473, als auch die Phosphorylierung der eNOS an Ser1179. Obwohl PKI keinen Einfluss auf die Phosphorylierung dieser Stellen hatte, hemmte es die Erhöhung der Aktivität des Enzyms durch EGCG. Im PKA-Assay konnte eine EGCG-induzierte Aktivierung der PKA nachgewiesen werden. PD98059, ein Inhibitor der ERK1/2, hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung und die Ser1179-Phosphorylierung der eNOS.

Eine Behandlung von BAECs und CPAEs mit verschiedenen EGCG-Konzentrationen über 24 beziehungsweise 72 h hatte keine Auswirkungen auf die eNOS-Proteinmenge in der Zelle.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die schnelle Aktivierung der eNOS durch EGCG durch eine Phosphorylierung von eNOS an Ser1179 bedingt ist. Offensichtlich sind mehrere Kinasen involviert, die möglicherweise parallel an verschiedenen eNOS-Phosphorylierungsstellen wirken. Welche Kinasen letztendlich welche Aminosäuren der eNOS phosphorylieren, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Schlüsselwörter: EGCG (Epigallocatechin-gallate), Vasodilatation, eNOS (endotheliale NO-Synthase), Signaltransduktion

6. Abstract

In the present study, we provide the first experimental evidence that the tea catechin EGCG induces an activation of the endothelial NO-synthase in endothelial cells, probably via a PI3-K-, PKA- and Akt-dependent pathway, that leads to phosphorylation of eNOS at Ser1179.

We observed an EGCG-induced, dose-dependent vasodilation of the rat aorta, which remained endothelium-dependent up to an EGCG-dose of 25 μ M. Stimulation of two different types of endothelial cells lead to dose-dependent activation of eNOS. The western blot analysis shows, that 15 min stimulation of bovine aortic endothelial cells with 100 μ M of EGCG leads to phosphorylation of eNOS at Ser1179, Akt at 473 and ERK1/2 at Thr202/Tyr204.

Activation of eNOS and phosphorylation at Ser1179 were completely inhibited by previous incubation of the cells with PI3-K-inhibitors (LY294004, wortmannin). Incubation with inhibitors of PKA (PKI) or Akt (SH-5) decreased EGCG-induced eNOS-activation partially. SH-5 prevented phosphorylation of Akt at Ser473 as well as phosphorylation of eNOS at Ser1179. PKI had no influence on the phosphorylation of these sites, but it inhibited EGCG-induced increase of eNOS-activity. PD98059, an inhibitor of ERK1/2, did not affect EGCG-induced activity of eNOS and phosphorylation at Ser1179. Treatment of BAECs and CPAEs with different concentrations of EGCG for 24 or 72 hours had no influence on the content of eNOS-protein in these cells.

These results suggest that rapid EGCG-induced eNOS-activation is conditioned by a phosphorylation of eNOS at Ser1179. Obviously there are different kinases involved, which act parallel on different phosphorylation-sites of eNOS. Which kinases are finally responsible for the phosphorylation of different sites has to be investigated in further experiments.

Keywords: EGCG (epigallocatechin-gallate), vasodilation, eNOS (endothelial NO-synthase), signaltransduction.

7. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med Verena Stangl für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Förderung meines Interesses für wissenschaftliches Arbeiten.

Dr. rer. nat. Mario Lorenz, der mich hervorragend betreute und ständig wichtige Ideen und Diskussionen vorbrachte.

Herrn Professor Dr. med Gert Baumann für die Möglichkeit der Arbeit im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie, Charité, Campus Mitte.

Cornelia Bartsch, Thomas Düsterhöft, Wanda Michaelis, Angelika Vietzke, Nikola Wilck und den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Kardiologischen Forschungslabors für das Beibringen der Methoden, die zuverlässige Hilfe und die nützlichen Tipps.

Bernd Hewing, meinem „Weggefährten“, der mich darauf brachte, diese Arbeit zu erstellen, und der mir immer wieder über Durststrecken hinweg geholfen hat.

Und meiner Familie und meinen Freunden, die mein Vorhaben stets unterstützt haben.

8. Abkürzungsverzeichnis

A. brachialis	Arteria brachialis
Akt	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Apo-E	Apolipoprotein-E
ATP	Adenosintriphosphat
BAEC	Bovine aortic endothelial cells
BBE	Bovine brain extract
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Ca ²⁺	Kalzium
CPAE	Calf pulmonary artery cells
cpm	Counts per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin-3-gallate
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ERK1/2	Extracellular regulated signal kinases 1/2
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBS	Fetal bovine serum
FMN	Flavinmononukleotid
hEGF	Human epidermal growth factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IC ₅₀	Inhibitory dose 50%
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Argininmethylester

MAPK	Mitogen activated protein kinase
mRNA	Messenger RNA
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOSIP	Nitric oxide synthase interacting-protein
PAF	Platelet activating factor
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phenylephrin
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKI	Proteinkinase inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
Ser	Serin
Thr	Threonin
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
tPA	Tissue Plasminogenaktivator
Tyr	Tyrosin
VEGF	Vascular endothelial growth factor

9. Literaturverzeichnis

- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G.: Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001, 357, S. 593-615.
- Alheid, U., Frölich, J. C., Förstermann U.: Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb. Res.* 1987, 47, S. 561-571.
- Anderson, R. A., Polansky, M. M.: Epigallocatechin-O-gallate (EGCG) enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, S. 7182-7186.
- Andriambeloson, E., Magnier, C., Haan-Archipoff, G., Lobstein, A., Anton, R., Beretz, A., Stoclet, J.C., Andriantsitohaina, R.: Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J. Nutr.* 1998, 128, S. 2324-2333.
- Arts, I., van de Putte, B., Hollmann, O.: Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands, 2. Tea, wine, fruit juices and chocolate milk. *J. Agri. Food Chem.* 2000, 48, S. 1752-1757.
- Arts, I.C., Hollmann, P.C., Feskens, E.J., Bueno de Mesquita, H.B., Kromhout, D.: Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 74, S. 227-232.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bowens, L.: The Chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997, 37, S. 693-704.
- Ballingand, J.L., Ungureanu-Longrois, D., Sims, W.W., Kozik, L., Lowenstein, C.J., Lamas, S., Kelly, R.A., Smith, T.W., Michel, T.: Induction of NO-Synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1beta and IFN-gamma. *Am. J. Physiol.* 1995, 268, S. 1293-1303.
- Boo, Y.C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J., Jo, H.: Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, S. 3388-3396.
- Brown, C.A., Bolton-Smith, C., Woodward, M., Tunstall-Pedoe, H.: Coffee and tea consumption and the prevalence of coronary heart disease in men and women: results from the Scottish Heart Health Study. *J. Epidemiol. Community Health* 1993, 47, S. 171-175.
- Cayatte, A.J., Palacino, J.J., Horten, K., Cohen, R. A.: Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesteremic rabbits. *Arterioscler. Thromb.* 1994, 14, S. 753-759.
- Chen, C.W., Ho, C. T.: Antioxidant properties of polyphenol extracted from green and black teas. *J. Food Lipids.* 1995, 2, S. 35-46.
- Chen, Y.C., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.K.: Inhibition of TPA-induced protein kinases C and transcription activator protein-1 binding activates by theaflavin-3,3'-digallate from black tea NIH3T3 cells. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, S. 1416-1421.
- Chung, J.Y., Huang, C., Meng, X., Dong, Z., Yang, C.: Inhibition of activator protein 1-activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenols in H-ras-

- transformed cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Cancer Research* 1999, 59, S. 4610-4617.
- Clementi, E., Sciorati, C., Riccio, M., Miloso, M., Meldolesi, J., Nistico, G.: Nitric oxide action on growth factor-elicited signals. Phosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} responses are negatively modulated via a cGMP-dependent protein kinase I pathway. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, S. 22277-22282.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannikal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Jr., Shin, W.S., Liao, J. K.: Nitric oxide increases cytokine-induced endothelial activation. *J. Clin. Invest.* 1995, 96, S. 60-68.
- Dedio, J., König, P., Wohlfahrt, P., Schroeder, C., Kummer, W., Müller-Esterl, W.: NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J.* 2001, 15, S. 79-89.
- De Groot, H., Rauen, U.: Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1998, 12, S. 249-255.
- Diker, K.S., Akan, M., Hascelik, G., Yurdakok, M.: The bacterial activity of tea against *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1991, 12, S. 34-35.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fissthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999, 399, S. 601-605.
- Dinerman, J.L., Daw, T.M., Schell, M.J., Snowman, A., Snyder, S.H.: Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, S. 4214-4218.
- Draijer, R., Atsma, D.E., van der Laarse, A., van Hinsbergh, V.W.: cGMP and nitric oxide modulate thrombin induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ. Res.* 1995, 76, S. 199-208.
- Duffy, S.J., Keaney, J.F., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P.L., Frei, B., Vita, J. A.: Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001, 104, S. 151-156.
- Dufresne, C.J., Farnworth, E.R.: A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J. Nutr. Biochem.* 2001, 12, S. 404-421.
- Feron, O., Michel, J. B., Sase, K., Michel, T.: Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. *Biochemistry* 1998, 37, S. 193-200.
- Förstermann, U.: Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung* 1994, 44, S. 402-407.
- 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, S. 773-790.
- Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C.: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase akt. *Nature* 1999, 399, S. 597-601.
- Fulton, D., Gratton J.P., Sessa W.C.: Posttranslational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Why isn't Calcium/Calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp.*

- Ther. 2001, 299, S. 818-824.
- Furchtgott, R.F., Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle cells by acetylcholine. *Nature* 1980, 288, S. 373-376.
- Furchtgott, R.F.: Studies of relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrate and the endothelium derived relaxing factor is nitric oxide. Hrsg.: Vanhoutte, P.: Vasodilation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves, and endothelium. New York, Raven press 1988; S. 401-414.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shan, V., Sorrention, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C.: Dynamic Activation Of Endothelial Nitric Oxide Synthase By Hsp90. *Nature* 1998, 392, S. 821-824.
- Garg, U.C., Hasid, A.: Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine ophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1989, 83, S. 1774-1777.
- Gauthier, T.W., Scalia, R., Murohara, T., Guo, J.P., Lefer, A.M.: Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15, S. 1652-1659.
- Geleijnse, J.M., Launer, L.J., Hofman, A., Pols, H.A.P., Witteman, J.C.M.: Tea flavonoids may protect against atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Arch. Intern. Med.* 1999, 159, S. 2170-2174.
- Gordon, M.H.: Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Prod. Rep.* 1996, 13, S. 265-273.
- Gosink, E.C., Forsberg, E.J.: Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca⁺ homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1993, 265, S. 1620-1629.
- Goss, S.P., Hogg, N., Kalyanaraman, B.: The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, S. 21647-21653.
- Govers, R., Rabelink, T.J.: Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001, 280, S. 193-206.
- Graham, H.N.: Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 1992, 21, S. 334-350.
- Groves, J.T., Wang, C.C.: Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000, 4, S. 687-695.
- Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J.X.W.: ERS study on the structure antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochem. Biophys. Acta* 1999, 1427, S. 13-23.
- Hakim, I.A., Harris, R.B., Weisgerber U.M.: Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000, 9, S. 727-731.
- Haqqi, T. M., Anthony, D.D., Gupta, S., Ahmad, N., Lee, M.S., Kumar, G.K., Mukhtar, H.: Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96, S. 4524-4529
- Haynes, M.P., Sinha, D., Russel, K.S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M.,

- Sessa, W.C., Bender, J.R.: Membrane estrogen receptor activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ. Res.* 2000, 87, S. 677-682.
- Hecht, S.S., Hoffmann, D.: Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 1998, 9, S. 875-884.
- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993, 342, S. 1007-1011.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S.: Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries. *Archives of Int. Med.* 1995, 155, S. 381-386.
- Hertog, M.J., Sweetman, P.M., Fehily, A.M., Elwood, P.C., Kromhout, D.: Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 65, S. 1489-1494.
- Hong, J., Lu, H., Meng, X., Ryu, J.H., Hara, Y., Yang, C.S.: Stability, cellular uptake, biotransformation and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Research* 2002, 62, S. 7241-7246.
- Huang, Y., Zhang, A., Lau, C.W., Chen, Z. Y.: Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sciences* 1998, 63, S. 275-283.
- Huang, Y., Chan, N.W.K., Lau, C.W., Yao, X. Q., Chan, F. L., Chen, Z. Y.: Involvement of endothelium/ nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)epicatechin. *Biochem. Biophys. Acta* 1999, 1427, S. 322-328.
- Igarashi, J., Michel, T.: Agonist-modulated targeting of the EGD-1 receptor to plasmalemmal caveolae. ENOS activation by sphingosine-1 phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, S. 32363-32370.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G.: Endothelium-derived relaxing factor released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987, 84, S. 9265-9269.
- Inoue, Y., Trevanich, S., Tsujimoto, Y., Miki, T., Miyabe, S., Sugiyama, K.I., Izawa, S., Kimura, A.: Evaluation of catechin and its derivatives as antioxidant: recovery of growth arrest of escherichia coli under oxidative conditions. *J. Sci. Food Agric.* 1996, 71, S. 297-300.
- Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R.: Why drinking tea could prevent cancer. *Nature.* 1997, 387, S. 561.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J.: Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br. J. Med.* 1996, 312, S. 478-481.
- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N.: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, S. 4651-4655.
- Kuriyama, S., Shimazu, T., Ohmori, K., Kikuchi, N., Nakaya, N., Nishino, Y., Tsubono, Y., Tsuji, I.: Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA* 2006, 296(10), S.

1255-1265.

- Lancaster, J.R., Jr.: Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91, S. 8137-8141.
- Levi, F., Lucchini, F., Negri, E., La Vecchia, C.: Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world. *Heart* 2002, 88, S. 119-124.
- Lim, D.Y., Lee, E.S., Park, H.G., Kim, B.C., Hong, S.P., Lee, E.B.: Comparison of green tea extract and epigallocatechingallate on blood pressure and contractile response of vascular smooth muscle of rats. *Arch. Pharmacol. Res.* 2003, 26, S. 214-223.
- Lin, J.K., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y.: Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem. Pharmacol.* 1999, 58, S. 911-915.
- Lorenz, M., Jochmann, N., von Krosigk, A., Martus, P., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V.: Addition of tea prevents vascular protective effects of tea. *Eur. Heart J.* 2007, 28, S. 219-223.
- Michel, J.B., Feron, O., Sacks, D., Michel, T.: Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, S. 15583-15586.
- Michell, B.J., Griffiths, J.E., Mitchelhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Tellano, P.R., Kemp, B.E., Pear, R.B.: The akt kinase signals direct to endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Biol.* 1999, 9, S. 845-848.
- Michell, J.B., Chen, Z., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D.A., Sim, A.T., Kemp, B.E.: Coordinated control of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, S. 17625-17628.
- Michell, B.J., Harris, M.B., Chen, Z.P., Ju, H., Venema, V.J., Blackstone, M.A., Huang, W., Venema, R.C., Kemp, B.E.: Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine617 and serine635. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, S. 42344-42351.
- Middleton, E.: Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998, 439, S. 175-182.
- Mineo, C., Yuhanna, I.S., Quon, M. J , Shaul, P.W.: High density lipoprotein-induced endothelial nitric oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP-kinases. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, S. 9142-9149.
- Miura, Y., Chiba, T., Tomita, I., Koizumi, H., Miura, S., Umegaki, K., Hara, Y., Ikeda, M., Tomita, T.: Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* 2001, 131, S. 27 – 32.
- Mukamal, K.J., Maclure, M., Muller, J.E., Sherwood, J.B., Mittleman, M.A.: Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 2002, 105, S. 2476-2481.
- Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M., Imai, K.: Preventing effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 2000, 13, S. 49-54.
- Nakaki, T., Nakayama, M., Kato, R.: Inhibition by nitric oxide and nitric oxide producing

- vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1990, 189, S. 347-353.
- Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., Aiello, S., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G., Remuzzi, A.: Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ. Research* 1995, 76, S. 536-543.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987, 327, S. 524-526.
- Peters, U., Poole, C., Arab, L.: Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* 2001, 154, S. 495-503.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S.: The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1987, 92, S. 639-646.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S.: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, S. 5193-5197.
- Renaud, S., de Lorgeril M.: Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992, 339, S. 152-159.
- Sagesaka-Mitane, Y., Miwa, M., Okada, S.: Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, S. 790-793.
- Sah, J.F., Balasubramanian, S., Eckert, R.L., Rorke, E.A.: Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway: evidence for direct inhibition of ERK1/2 and Akt kinases. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 12755-12762.
- Sakanaka, S., Sato, T., Kim, M., Yamamoto, T.: Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic *Streptococci*. *Agric. Biol. Chem.* 1990, 54, S. 2925-2929.
- Salerno, L.; Sorrenti, V.; Di Giacomo, C.; Romeo, G.; Siracusa M.A.: Progress in development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 2002, 8, S. 177-200.
- Sanae, F., Miyaichi, Y., Kizu, H., Hayashi, H.: Effects of catechins on vascular tone in rat thoracic aorta with endothelium. *Life Sciences* 2002, 71, S. 2553-2562.
- Sasazuki, S., Kodama, H., Yoshimasu, K., Liu, Y., Washio, M., Tanaka, K., Tokunaga, S., Kono, S., Arai, H., Dio, Y., Kawano, T., Nakagaki, O., Takada, K., Koyanagi, S., Hiyamuta, K., Nii, T., Shirai, K., Ideishi, M., Arakawa, K., Mohri, M., Takeshita, A.: Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Ann. Epidemiol.* 2000, 10, S. 401-408.
- Sesso, H.D., Gaziano, J.M., Burning, J.E., Hennekens, C.H.: Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am. J. Epidemiol.* 1999, 149, S.162-167.
- Shen, J.Z., Zheng, X.F., Wei, E.Q., Kwan, C.Y.: Green tea catechins evoke a phasic contraction in rat aorta via H₂O₂-mediated multiple-signalling pathways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2003, 30, S. 88-95.
- Siddiqui, I.A., Adhami, V.M., Afaq, F., Ahmad, N., Mukhtar, H.: Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/ protein kinase B and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J. Cellular*

- Biochem. 2004, 91, S. 232-242.
- Stamler, J.S.: Redox Signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994, 78, S. 931-936.
- Tan, E.Q., Gurjar, M.V., Sharmar, R.V., Bhalla, R.C.: Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiovasc. Res.* 1999, 43, S. 788-797.
- Thomas, S.R., Chen, K., Keaney, J.F. Jr: Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, S. 6017-6024.
- Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, Y., Shimamura, T.: The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* O1. *J. Appl. Bacteriol.* 1991, 70, S. 109-112.
- Umegaki, K., Sugisawa, A., Yamada, K., Higuchi, M.: Analytical method of measuring tea catechins in human plasma by solid phase extraction and HPLC with electrochemical detection. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2001, 47, S. 402-408.
- Vinson, J.A., Dabbagh, Y., Serry, M., Jang, J.: Plant flavonoides, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, S. 2800-2802.
- Wehrwein, P.: More evidence that tea is good for the heart. *Lancet* 1999, 353, S. 348.
- Yang, C.S., Chen, L., Lee, M.J., Balentine, D., Kuo, M. C., Schantz S.,P.: Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998, 7, S. 351-354.
- Yang, T.T.; Koo, M.W.: Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis* 2000, 148, S. 67-73.
- Yokozawa, T., Chung, H.Y., He, L.Q., Oura, H.: Effectiveness of green tea tannin on rats with chronic renal failure. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60, S. 1000-1005.
- Yoshioka, H., Akai, G., Yoshinaga, K., Hasegawa, K., Yoshioka, H.: Protecting effect of a green tea percolate and its main constituents against gamma ray induced scission of DNA. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60, S. 117-119.
- Zeihner, A.M.; Fissthaler B.; Schray Utz B.; Busse, R.: Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ. Res.* 1995, 76, S. 980-986.

10. Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen erfolgt keine Veröffentlichung des Lebenslaufs in der online-Version

11. Publikationsliste

Mario Lorenz, Silja Wessler, Elena Follmann, Wanda Michaelis, Thomas Düsterhöft, Gert Baumann, Karl Stangl und Verena Stangl: A constituent of green tea, Epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. J Biol Chem. 2004, 279, S.6190-6195.

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Elena Follmann, an Eides statt, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die verwendeten Hilfsmittel sowie Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 10.06.2008