

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

Dissertation

# **Beteiligte Mechanismen der eNOS- Aktivierung und Vasodilatation durch EGCG**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Nadine Bogen  
aus Berlin

Gutachter:

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

2.: Prof. Dr. med. H. Hauner

3.: Prof. Dr. med. C. Espinola-Klein

Datum der Promotion: 24.02.2012

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Grüner Tee</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Teeinhaltsstoffe</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Bioverfügbarkeit von Katechinen</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Epidemiologische und klinische Daten zu Wirkungen von Tee auf das kardiovaskuläre System</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Effekte auf Prävention und Progression von Herz-Kreislauf-Erkrankungen</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Einfluss auf kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>	<b>6</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Wirkung auf die Endothelfunktion</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Das Endothel</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Allgemeine Funktion für den Organismus</b>	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>Stickstoffmonoxid (NO)</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Historie</b>	<b>11</b>
<b>1.4.2</b>	<b>NO-Effekte auf das kardiovaskuläre System</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Die eNOS</b>	<b>14</b>
<b>1.5.1</b>	<b>Isoformen der NOS</b>	<b>14</b>
<b>1.5.2</b>	<b>Aufbau und Aktivierung der eNOS</b>	<b>15</b>
<b>1.5.3</b>	<b>Regulation der eNOS</b>	<b>17</b>
<b>1.6</b>	<b>Signaltransduktion</b>	<b>19</b>
<b>1.6.1</b>	<b>Kalzium als Aktivator</b>	<b>19</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Die Rolle von Kinasen</b>	<b>19</b>
<b>1.7</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>

---

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Nährmedien und Lösungen</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Kultivierung der Zellen</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2.1</b>	<b>Inkubation</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2.2</b>	<b>Passagierung</b>	<b>23</b>
<b>2.2.2.3</b>	<b>Einfrieren und Auftauen der Zellen</b>	<b>23</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Stimulation der Zellen</b>	<b>24</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Zellyse und Proteinextraktion</b>	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Proteinbestimmung nach Bradford</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Western Blot</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>eNOS-Aktivitätstest in Endothelzellen</b>	<b>29</b>
<b>2.6</b>	<b>Relaxationsversuche an Rattenaortenringen</b>	<b>31</b>
<b>2.7</b>	<b>Aufarbeitung der Aortenringe zur Proteinextraktion</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Zeitkinetik der eNOS-Aktivierung und eNOS-Phosphorylierung durch EGCG</b>	<b>34</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Zeitabhängige eNOS-Aktivierung und eNOS-Phosphorylierung</b>	<b>34</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Optimierung der Versuchsbedingungen des Western Blot und Einfluss von L-Arginin auf die eNOS-Phosphorylierung</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Kalziumabhängigkeit der eNOS-Aktivierung und der eNOS-Phosphorylierung durch EGCG</b>	<b>38</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Intrazellulärer Kalziumgehalt der Zelle und eNOS-Aktivierung</b>	<b>38</b>

---

<b>3.2.2</b>	<b>Einfluss des extrazellulären Kalziumgehaltes auf die eNOS-Aktivierung</b>	<b>39</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Kalziumeinfluss auf die eNOS-Phosphorylierung durch EGCG</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Weitere am Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung beteiligte Kinasen</b>	<b>41</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Einfluss der Src-Kinase auf die Aktivierung und Phosphorylierung der eNOS</b>	<b>42</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Untersuchung der Kalzium-Calmodulin Kinase (CaMK)</b>	<b>45</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Untersuchung der p38 MAPK</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Beteiligung möglicher Rezeptoren an der eNOS-Aktivierung durch EGCG</b>	<b>48</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Untersuchung G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelter Rezeptoren</b>	<b>48</b>
<b>3.5</b>	<b>Relaxationsversuche an Rattenaortenringen</b>	<b>49</b>
<b>3.5.1</b>	<b>EGCG-Konzentrationsreihe</b>	<b>49</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Zeitlicher Ablauf des Relaxationsverhaltens der Rattenaortenringe nach Einmalgabe von EGCG</b>	<b>51</b>
<b>3.6</b>	<b>Mechanismen der EGCG-induzierten Relaxation von Rattenaortenringen</b>	<b>52</b>
<b>3.6.1</b>	<b>eNOS-Phosphorylierung durch EGCG an Rattenaortenringen</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Zeitabhängige eNOS-Aktivierung und eNOS-Phosphorylierung in Endothelzellen</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Zeitliches Zusammenspiel von Kinasen und anderen zellulären Mediatoren bei den endothelzellspezifischen Effekten von EGCG auf die eNOS</b>	<b>55</b>

<b>4.3</b>	<b>Funktionelle Relevanz der EGCG-induzierten eNOS-Aktivierung im Aortenring-Modell</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG AN EIDES STATT</b>	<b>75</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Grüner Tee

### 1.1.1 Allgemeines

Der Tee ist nach Wasser eines der meist verbreiteten Getränke weltweit, jedoch mit lokal unterschiedlicher Verteilung, bedingt durch die verschiedenen Traditionen in den einzelnen Kulturen (GRAHAM 1992). Bereits 2700 v. Chr. kam der ursprünglich aus Assam und Nord-Birma stammende Teestrauch *Camellia sinensis* nach China, wo er zunächst nur als Heilpflanze verwendet wurde. Um 552 n. Chr. wurde er von buddhistischen Mönchen nach Japan gebracht. Erst im 16. Jahrhundert gelangte der Tee durch den Handel nach Europa, zunächst nach Amsterdam, etwa 50 Jahre später nach London, wo das Teetrinken auch heute noch die größte Tradition hat (FELDHEIM 1994).

Tee wird in drei verschiedenen Grundformen hergestellt. Man unterscheidet Grünen Tee, Schwarzen Tee und Oolong Tee.

Den Hauptanteil des hergestellten Tees macht mit 78% der Schwarze Tee aus, nur etwa 20% sind Grüner Tee und weniger als 2% sind Oolong Tee. Während Schwarzer Tee vor allem in Europa und Nordamerika getrunken wird, wird der Grüne Tee vornehmlich in China, Japan, Nordafrika und im mittleren Osten konsumiert (GRAHAM 1992, MC KAY UND BLUMBERG 2002).

Alle drei Grundformen des Tees werden aus den Blättern des Teestrauchs *Camellia sinensis* gewonnen. Die *Camellia* gehört zur Familie der *Theaceae* (Teestrauchgewächse) und zur Gattung der Kameliengewächse. Man unterscheidet zwei in ihrer Erscheinungsform unterschiedliche Varietäten des Teestrauchs, den Assam-Tee (*Camellia sinensis var. assamica*) und den chinesischen Tee (*Camellia sinensis var. sinensis*). Die *Camellia sinensis* hat kleinere zarte Blätter und liefert einen geringeren Ertrag als die *Camellia assamica*. Der aus ihr gewonnene und aufgebühte Tee hat eine hellere Farbe und einen milden aromatischen Geschmack. Assam-Tee hingegen zeichnet sich durch einen kräftigen Geschmack aus (FELDHEIM 1994).

Der Unterschied zwischen Grünem, Schwarzem und Oolong Tee liegt in der weiteren Verarbeitung, die jedem Tee seine charakteristische Farbe, seinen Geschmack und seine Wirkung verleiht.

Der Unterschied in der Herstellung der drei verschiedenen Grundformen des Tees liegt im Vorgang der Fermentierung.

Bei der Verarbeitung der Teeblätter zu Grünem Tee werden die frischen Blätter nach dem Pflücken nur vorsichtig gedämpft und bei hohen Temperaturen von über 100°C getrocknet. Bei chinesischen Tees erfolgt dies durch Anwendung trockener Hitze, beispielsweise durch Anrösten in heißen Pfannen, bei japanischen Tees durch eine Wasserdampfbehandlung. Dabei kommt es durch die Hitze zur Enzyminaktivierung, wodurch die Oxidation der Zellsäfte unterbunden wird und der ursprüngliche Gehalt an Inhaltsstoffen im Tee erhalten bleibt (ENGELHARDT 1998).

Im Gegensatz dazu lässt man die Teeblätter bei der Herstellung von Schwarzem Tee nach dem Pflücken welken, bis ihr Gewicht nur noch etwa 55% des Originalblattgewichts entspricht. Sie verlieren dabei einen Großteil ihrer Feuchtigkeit. Anschließend werden die Teeblätter gerollt und zerdrückt. Dadurch beginnt der Fermentationsprozess (CRESPY UND WILLIAMSON 2004).

Der Fermentationsprozess ist ein Autooxidationsprozess, bei dem die Inhaltsstoffe der Teeblätter oxidiert werden. Dieser Prozess wird durch die Polyphenoloxidase katalysiert, welche in den Teeblättern enthalten ist. Sie wird aktiviert, wenn die Zellstruktur der Teeblätter beim Herstellungsprozess des Schwarzen Tees zerstört wird. Durch diesen Vorgang entstehen weitere für den Schwarzen Tee typische Inhaltsstoffe, die ihm seinen charakteristischen Geschmack und seine typische Farbe verleihen, die Theaflavine und Thearubigine.

Beim Oolong Tee handelt es sich um einen teilfermentierten Tee. Er ist also ein nur teilweise oxidiertes Produkt und nimmt damit eine Mittelstellung bezüglich der Inhaltsstoffe von Grünem und Schwarzem Tee ein (GRAHAM 1992).

### **1.1.2 Teeinhaltsstoffe**

Grüner und Schwarzer Tee sind gekennzeichnet durch den hohen Gehalt an oxidativ wirksamen Polyphenolen. Eine Untergruppe der im Tee enthaltenen Polyphenole stellen die Flavonoide dar. Sie machen etwa 30% des Trockengewichts der Teeblätter aus (GRAHAM 1992).

Die genaue chemische Zusammensetzung unterscheidet sich jedoch zwischen Grünem und Schwarzem Tee.

Grüner Tee enthält neben einem geringen Anteil an polymeren Flavonoiden haupt-

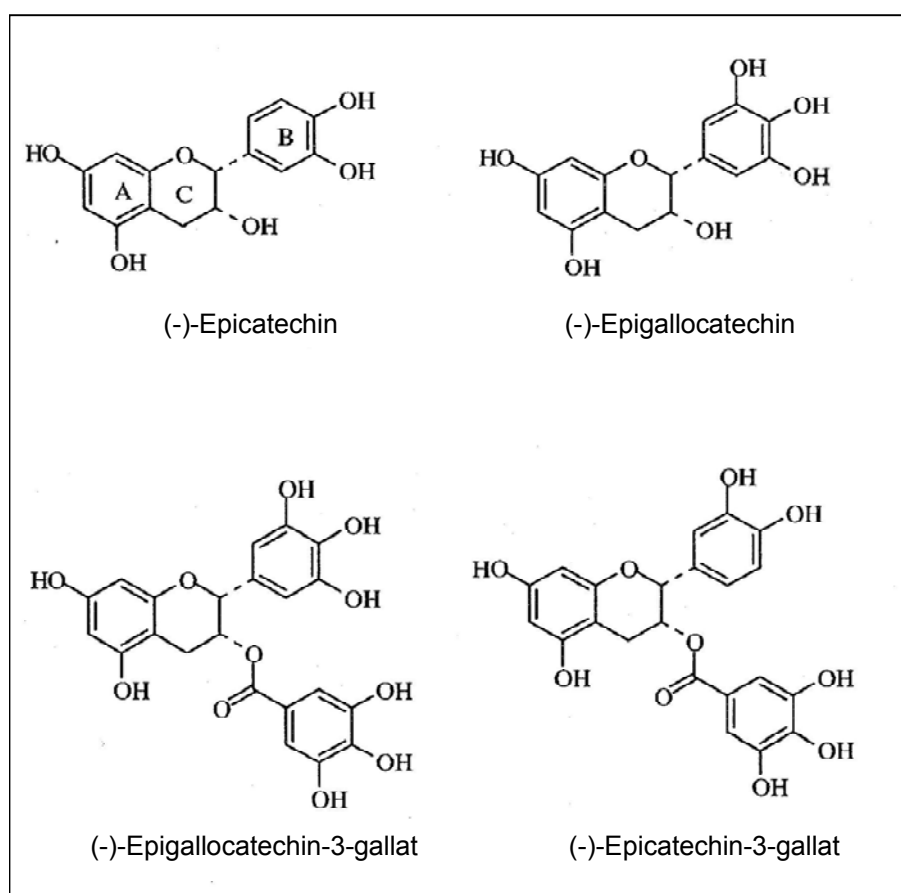


sächlich monomere Flavonoide, die Katechine und Flavonole.

Zu den Katechinen gehören    Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)  
   Epigallocatechin (EGC)  
   Epicatechin-3-gallat (ECG)  
   Epicatechin (EC)

(WISEMAN et al. 2001).

In Abbildung 1 ist die Struktur der einzelnen Katechine dargestellt.



**Abb. 1: Struktur der Teekatechine.** Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechin-3-gallat, Epicatechin-3-gallat (modifiziert nach YANG et al. 2002).

Der Anteil der Katechine an den Gesamtpolyphenolen liegt beim Grünen Tee meist bei über 50%.

Schwarzer Tee enthält hingegen nur einen kleinen Anteil an monomeren Polyphenolen, hier liegt der Anteil der Katechine an den Gesamtpolyphenolen meist nur zwischen 20% und 40%. Er enthält hingegen einen wesentlich größeren Anteil an kom-

plexen oligo- und polymeren Polyphenolen. Hierzu zählen die Theaflavine und die Thearubigine. Diese entstehen durch die Fermentierung bei der Herstellung des Schwarzen Tees. Es sind Oxidationsprodukte der Katechine, katalysiert durch die Polyphenoloxidase. 60% – 80% der in den Teeblättern enthaltenen Katechine werden über diesen Weg in Theaflavine und Thearubigine umgewandelt (BALENTINE et al. 1997, WISEMAN et al. 2001, ENGELHARDT 1998).

Die Extraktion der Flavonoide erfolgt in heißem Wasser. Üblicherweise werden für die Zubereitung von Tee 1 – 1,5 g Trockensubstanz pro 100 ml Wasser eingesetzt. Die Extraktionsausbeute beträgt dabei 30%. Eine Tasse von 150 ml Tee enthält demnach ungefähr 500 mg Feststoffe, von denen etwa 150 – 200 mg Flavonoide sind. Entscheidend für die Menge der im Teeaufguss enthaltenen Inhaltsstoffe sind die Extraktionsbedingungen, die durch die Blattgröße der Teeblätter, die Wassertemperatur und die Ziehzeit bestimmt werden (ENGELHARDT 1998).

### 1.1.3 Bioverfügbarkeit von Katechinen

Die Konzentration an Katechinen im Blutplasma ist im Zeitraum von eineinhalb bis zweieinhalb Stunden nach Teegenuss am höchsten. Dieser Zeitraum der maximalen Plasmakonzentration ist bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen von Katechinen im Tee gleich. Die Absorption der Katechine erfolgt also unabhängig von der Ausgangskonzentration der Katechine im Tee (WISEMAN et al. 2001).

Die maximale Plasmakonzentration an Katechinen liegt bei einem täglichen Teekonsum von acht Tassen bei etwa 1  $\mu\text{M}$  (VAN HET HOF et al. 1999).

Erfolgt der Teekonsum regelmäßig, ist über Nacht auch ein Anstieg der basalen Katechinkonzentration im Plasma feststellbar. Sie liegt bei etwa 0,4  $\mu\text{M}$ . Demnach sind die gemessenen Plasmakonzentrationen der Katechine bei regelmäßigem Teekonsum mit Werten im Mikromolarbereich trotzdem gering.

Wichtig ist bei der Definition der Flavonoid-Effekte auf zelluläre Prozesse die Unterscheidung zwischen konjugierten und nicht-konjugierten Flavonoidformen. In der Mehrzahl der in vitro-Studien handelt es sich um die in freier Form vorkommenden Flavonoide. In vivo liegen insgesamt nur etwa 10% der Flavonoide in freier Form im Blutplasma vor. EGCG aber ist meist nicht konjugiert. Die Konjugation der Katechine erfolgt bei Passage des Gastrointestinaltrakts und der Leber. Den inhibierenden Effekt auf verschiedene zelluläre Mechanismen der Zellproliferation schreibt man nur

den freien, unkonjugierten Formen zu (WISEMAN et al. 2001). Dies könnte ein möglicher Unterschied von Ergebnissen aus in vitro- bzw. in vivo-Studien sein.

### **1.2 Epidemiologische und klinische Daten zu Wirkungen von Tee auf das kardiovaskuläre System**

#### **1.2.1 Effekte auf Prävention und Progression von Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem Genuss von Tee und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit oder dem Schlaganfall, untersucht.

In einigen Studien wurde eine geringere Inzidenz und Prävalenz für kardiovaskulär bedingte Erkrankungen durch Teegenuss beschrieben (HIRANO et al. 2002, SANO et al. 2004, DEBETTE et al. 2008). Es gibt auch Hinweise dafür, dass durch Teekonsum die Progression einer Koronarsklerose beeinflusst wird und ein Fortschreiten möglicherweise gehemmt wird (SASAZUKI et al. 2000, REIS et al. 2010). So wurde im Rahmen der Rotterdam Studie, einer prospektiven Kohortenstudie von Geleijnse et al. in den Niederlanden, der Zusammenhang zwischen Teegenuss und dem Auftreten verschiedener Atherosklerosestadien im Bereich der Aorta abdominalis untersucht. Hier konnte eine inverse Assoziation zwischen dem Trinken von Tee und dem Auftreten eines fortgeschrittenen Atherosklerosestadiums (Länge des kalzifizierten Areals >5 cm) festgestellt werden. Bei leichten und mittleren Atherosklerosestadien wurde noch keine signifikante Reduktion des Atheroskleroseareals durch das Teetrinken beobachtet (GELEIJNSE et al. 1999). Sesso et al. hingegen konnten in einer Kohortenstudie keine signifikante Risikoreduktion für kardiovaskuläre Erkrankungen durch vermehrten Teegenuss feststellen (SESSO et al. 2003).

Verschiedene epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Sterblichkeit infolge kardiovaskulärer Erkrankungen durch den Genuss von Tee gesenkt wird (NAKACHI et al. 2000, ARTS et al. 2001, DE KONING et al. 2010). Andere Studien, wie die Ohsaki-Study und die Prospective Shizuoka Elderly Cohort Study geben zudem Hinweise dafür, dass möglicherweise auch eine inverse Assoziation zwischen der Gesamtmortalität und Teetrinken besteht (KURIYAMA et al. 2006, SUZUKI et al. 2009). Mukamal et al. untersuchten in den USA das Überleben vier Jahre nach einem akuten Myokard-

infarkt, welches durch einen höheren Teekonsum vor dem akuten Ereignis positiv beeinflusst wird. Es gibt demnach auch Hinweise auf ein besseres Langzeitüberleben nach einem akuten Myokardinfarkt durch Teegenuss (MUKAMAL et al. 2002).

Insgesamt ist jedoch bei den Resultaten dieser epidemiologischen Studien zu beachten, dass es sich bei den Probanden mit höherem Teekonsum meist auch um Nichtraucher, schlankere und körperlich aktivere Menschen handelt. Diese Bevölkerungsgruppe hat damit bereits ein geringeres kardiovaskuläres Risikoprofil. Der vermehrte Teekonsum könnte somit auch einen Indikator für einen gesünderen Lebensstil darstellen.

### 1.2.2 Einfluss auf kardiovaskuläre Risikofaktoren

Bei der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen spielen eine Reihe von Risikofaktoren, wie z.B. arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie und Adipositas sowie Diabetes mellitus eine Rolle. Für Teekatechine wurde eine mögliche Beeinflussung verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren beschrieben.

Für die Hyperlipidämie als einer der Hauptrisikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen wurde in tierexperimentellen Untersuchungen eine Verbesserung des Lipidprofils durch Gabe von Grünem bzw. Schwarzem Tee beschrieben (RAEDERSTORFF et al. 2003). Ursächlich wird eine verminderte Lipidabsorption durch die gleichzeitige Aufnahme von Katechinen zur Nahrung diskutiert (CRESPY UND WILLIAMSON 2004).

Auch eine Reduktion des Körpergewichts konnte bei Mäusen durch zusätzliche Fütterung von „green tea powder“ über 16 Wochen registriert werden (ZHENG et al. 2004). Der Zusatz von EGCG verhinderte den durch eine fettreiche Nahrung zu erwartenden Anstieg des Körpergewichts bei Ratten (WOLFRAM et al. 2005). Ebenso beobachteten Nagano et al. in einer doppelblinden Studie mit gesunden, leicht übergewichtigen Männern eine reduzierte Körperfettmasse nach täglicher Katechinaufnahme von 700 mg über 12 Wochen. Dies war assoziiert mit einem signifikant verminderten LDL-Spiegel im Blut (NAGANO et al. 2005). Auch in einer verblindeten, randomisierten Cross-over Studie mit Probanden mit bekannter Hypercholesterinämie konnte nach dreiwöchigem Teekonsum eine Reduktion des Gesamtcholesterin und des LDL nachgewiesen werden (DAVIES et al. 2003). Insgesamt waren die senkenden Effekte auf die Blutfette jedoch moderat, denn in verschiedenen Studien wurde kein veränderter Blutlipidspiegel nach Konsum von Grünem oder Schwarzem Tee beobachtet.

bachtet (BINGHAM et al. 1997, VAN HET HOF et al. 1999).

Die arterielle Hypertonie ist ein weiterer Risikofaktor, der mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert ist. In zahlreichen Studien wurde mit zum Teil kontroversen Ergebnissen der Zusammenhang zwischen Teetrinken und arterieller Hypertonie untersucht. In einer britischen Cross-over Studie mit 65 Teilnehmern hatte der Konsum von mehr als fünf Tassen Tee pro Tag über einen relativ kurzen Zeitraum keinen Einfluss auf den Blutdruck (BINGHAM et al. 1997). Diese Ergebnisse erbrachte auch eine Interventionsstudie von Hodgson et al. in Australien (HODGSON et al. 1999). In verschiedenen Studien, die die langfristigen Effekte des Teetrinkens untersuchten, konnte hingegen ein antihypertensiver Effekt gezeigt werden. In einer epidemiologischen Studie aus Norwegen mit ca. 20.000 Teilnehmern zeigten sich Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem Konsum von Schwarzem Tee und einem niedrigeren systolischen Blutdruck (STENSVOLD et al. 1992). Das regelmäßige Trinken von Grünem Tee oder Oolong Tee über einen Zeitraum von über einem Jahr verminderte in einer Studie von Yang et al. mit etwa 1500 Chinesen das Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie deutlich. Die Risikoreduktion lag bei einem Teegenuss von 120-600 ml Tee pro Tag bei 46% und bei einem Teegenuss ab 600 ml täglich bei 65% (YANG et al. 2004). Möglicherweise führt die kumulative Dosis von Teekatechinen zu einer deutlicheren Blutdruckreduktion. Andererseits handelte es sich um sehr unterschiedliche Nationalitäten, so dass unterschiedliche Lebensgewohnheiten ebenfalls Einfluss auf die Blutdruckregulation haben könnten. In einer randomisierten, doppelblinden, placebo-kontrollierten Parallel-Studie von Nantz et al. in den USA konnte durch die tägliche Einnahme von zwei Kapseln mit einer standardisierten Menge an EGCG und L-Theanin innerhalb von drei Wochen eine Blutdruckregulation erreicht werden (NANTZ et al. 2009). Bei 42 übergewichtigen japanischen Kindern mit erhöhten Blutdruckwerten konnte in einer randomisierten, doppelblinden Studie nach täglicher Einnahme von katechinreichem Grünem Tee über 24 Wochen eine signifikante Reduktion des systolischen Blutdrucks gezeigt werden (MATSUYAMA et al. 2009).

Auch in einer tierexperimentellen Studie mit hypertensiven Ratten konnte der blutdrucksenkende Effekt von Polyphenolen aus Grünem und Schwarzem Tee gezeigt werden. Den Ergebnissen von Negishi et al. zufolge kommt es möglicherweise aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der Teepolyphenole zu einer erhöhten Bio-

verfügbarkeit von NO und somit zur NO-vermittelten Vasodilatation und damit zur Blutdrucksenkung (NEGISHI et al. 2004).

Desweiteren wurden in tierexperimentellen Studien mögliche antidiabetische Effekte von Tee gezeigt. Bei diabetischen Ratten beispielsweise führten Extrakte aus Grünem und Schwarzem Tee zu einer Senkung des Blutglukosespiegels (GOMES et al. 1995). Nach Cheng gibt es Hinweise dafür, dass Grüner Tee die Insulinsensitivität und den Gehalt eines Glukosetransporters steigert und damit die Insulinresistenz verbessert (CHENG 2005). Auch anhand von in vitro-Versuchen wurde eine Steigerung der Insulinaktivität bzw. eine dem Insulin entsprechende Wirkung gezeigt, welche auf die Effekte der im Tee enthaltenen Polyphenole zurückgeführt wurde (BROADHURST et al. 2005). Die ausgeprägtesten Effekte in der Aktivitätssteigerung des Insulins zeigten hierbei die Katechine mit einem Gallatrest, in erster Linie das EGCG (ANDERSON UND POLANSKY 2002). Laut einer Querschnittstudie mit 1371 japanischen Männern liegt die Prävalenzrate von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen bei einem täglichen Genuss von mehr als zehn Tassen Grünem Tee pro Tag deutlich niedriger (NAKACHI UND IMAI 1995). Es existieren demzufolge Hinweise auf mögliche protektive Effekte von Tee auf die Entwicklung oder Progression eines Diabetes mellitus.

### **1.2.3 Wirkung auf die Endothelfunktion**

Die endotheliale Dysfunktion ist ein messbares Frühstadium in der Pathogenese der Atherogenese. Bei der endothelialen Dysfunktion liegt eine Beeinträchtigung der Funktion der Endothelzellen der Tunica intima der Gefäßwand vor. Durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO überwiegen die vom Endothel gebildeten vaso-konstringierenden Faktoren. Bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion ist die endothelvermittelte Vasodilatation eingeschränkt. Das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion korreliert mit dem Risiko für ein koronares Ereignis (SIEGENTHALER UND BLUM 2006). Die endotheliale Dysfunktion begünstigt im frühen Atherosklerosestadium die Ausbildung atherosklerotischer Plaques und ist assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen (DUVALL 2005).

In zahlreichen klinischen Interventionsstudien wurde die Wirkung von Tee auf die Endothelfunktion untersucht. In einer randomisierten, einzeln-verblindeten, kontrollierten Studie von Alexopoulos et al. konnte bei jungen gesunden Probanden eine

akute Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation 30 min nach Genuss von 450 ml Grünem Tee beobachtet werden (ALEXOPOULOS et al. 2008). Auch in einer gezielten Untersuchung der Koronardurchblutung kurz nach Teekonsum wurde ein signifikanter Anstieg des Blutflusses infolge verbesserter Endothelfunktion beschrieben (HIRATA et al. 2004). In einer Studie mit gesunden Probanden führten Grüner als auch Schwarzer Tee gleichermaßen zu einer Verbesserung der shear stress-induzierten Vasodilatation als Ausdruck der Endothelfunktion (JOCHMANN et al. 2008). Grassi et al. konnten in einer randomisierten, doppelblinden Cross-over Studie eine dosisabhängige Verbesserung der Endothelfunktion nach Genuss von Schwarzem Tee nachweisen. Bereits eine Tasse Tee pro Tag führte hier zu einer Verbesserung der Gefäßfunktion. Möglicherweise profitiert somit auch die Mehrzahl der Bevölkerung bei normalem Teekonsum von ein bis zwei Tassen täglich von den potentiell positiven Teeeffekten auf das kardiovaskuläre System (GRASSI et al. 2009).

Andererseits wurde beschrieben, dass es nur in Zusammenhang mit zeitgleich aufgenommener Nahrung zu einer akuten tee-induzierten Verbesserung der Endothelfunktion kommt (HODGSON et al. 2005). Die gleiche Arbeitsgruppe beobachtete aber auch eine mögliche langfristige Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation bei regelmäßigem Teekonsum von vier bis fünf Tassen täglich über mehrere Wochen (HODGSON et al. 2002).

Duffy et al. konnten in einer randomisierten, placebo-kontrollierten Cross-over Studie an Patienten mit Koronarer Herzkrankheit sowohl kurze Zeit nach dem Genuss von Schwarzem Tee, als auch nach einem Zeitraum von vier Wochen eine verbesserte Endothelfunktion nachweisen. Die endothelabhängige Vasodilatation der A. brachialis zeigte sich im Gegensatz zur nitroinduzierten endothelunabhängigen Vasodilatation zu beiden untersuchten Zeitpunkten verbessert. Dies war mit einem entsprechenden Anstieg der Katechinkonzentration im Blutplasma verbunden. Damit könnte auf eine positive Beeinflussung der endothelabhängigen vasomotorischen Funktion der Gefäße durch Tee flavonoide geschlossen werden (DUFFY et al. 2001). In einer aufbauenden Studie wurden die einzelnen Plasmakatechinkonzentrationen untersucht. Hierbei ergab sich nur für Epicatechin-gallat (ECG) nach akutem Teekonsum und für Epicatechin (EC) nach chronischem Teekonsum ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration. Dies korrelierte jedoch nicht mit der beschriebenen Verbesserung der Endothelfunktion. Der fehlende Konzentrationsanstieg von Epigallocatechin-

gallat (EGCG) und Epigallocatechin (EGC) wurde auf die geringe Konzentration in der verwendeten Teerezeptur, der geringen oralen Absorption und der kurzen Halbwertszeit von EGCG und EGC zurückgeführt. Die verbesserte Endothelfunktion nach Schwarzteeegenuss wird somit möglicherweise durch polymere Polyphenole, wie Thearubigine oder synergistische Effekte multipler Teepolyphenole vermittelt und nicht allein durch Katechine, welche auch in geringerer Konzentration in Schwarzem als in Grünem Tee enthalten sind. Außerdem könnte die Katechinkonzentration im Gewebe für die Wirkung auf die Endothelfunktion verantwortlich sein und nicht die gemessene Plasmakonzentration. In dieser Studie konnte nicht eindeutig bewiesen werden, dass die verbesserte Endothelfunktion nach Genuss von Schwarzem Tee auf Katechineffekte zurückzuführen ist (WIDLANSKY et al. 2005). In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von EGCG bei Patienten mit bekannter KHK untersucht. Hier führte die einmalige Gabe von hochdosiertem EGCG zu einer akuten Verbesserung der Endothelfunktion und einem entsprechenden Anstieg der EGCG-Plasmakonzentration (WIDLANSKY et al. 2007). Auch der Genuss von Grünem Tee, welcher wesentlich höhere Katechinkonzentrationen enthält, führte zu einem akuten Anstieg der Plasmakonzentration von EGCG und scheint signifikant die Endothelfunktion bei gesunden Rauchern zu verbessern (NAGAYA et al. 2004). Insgesamt sind diese abweichenden Ergebnisse möglicherweise durch die unterschiedlichen Konzentrationen von EGCG in den verschiedenen Tees zu erklären.

Außerdem ergaben sich in einer Studie von Oyama et al. Hinweise, dass sowohl eine Einmaldosis, als auch die chronische Einnahme von Katechinen aus Grünem Tee bei Rauchern die Endothelfunktion verbessern. Als Ursache werden sowohl eine katechininduzierte Steigerung der NO-Synthese, als auch eine Verminderung von ADMA (Asymmetrical Dimethylarginine), einem endogenen NO-Inhibitor, und die Reduktion von oxidativem Stress diskutiert (OYAMA et al. 2010). Widlansky et al. hingegen schlossen eine Reduktion oxidativen Stresses und inflammatorischer Prozesse durch eine Steigerung der antioxidativen Kapazität des Blutplasmas als Ursache einer verbesserten Endothelfunktion nach Teeegenuss aus (WIDLANSKY et al. 2005). Als weitere mögliche Ursache der tee-induzierten Verbesserung der Endothelfunktion wurde in einer Fall-Kontroll-Studie mit jungen gesunden Rauchern eine signifikante Korrelation zwischen der verbesserten Gefäßfunktion und einem Anstieg zirkulierender Progenitorzellen nach zweiwöchigem Konsum von Grünem Tee beschrieben (KIM et al.



2006). Zusammenfassend scheinen Teepolyphenole insgesamt über unterschiedliche Mechanismen die Gefäßfunktion zu verbessern.

### 1.3 Das Endothel

#### 1.3.1 Allgemeine Funktion für den Organismus

Die Endothelzellen bilden zusammen mit dem subendothelialen Bindegewebe und der Basalmembran die Tunica intima der Gefäße. Die Endothelzellen dienen dabei nicht nur der Auskleidung der Gefäßwand, sondern haben eine wichtige Funktion im Signal- und Stoffaustausch zwischen Blut und Gefäßwand. Das Endothel ist in viele physiologische und pathologische Prozesse involviert. Es reagiert auf Veränderungen hämodynamischer Faktoren, wie Blutdruckänderungen oder anderer Signale, mit der Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wie dem gasförmigen Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO). Es spielt damit eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gefäßhomeostase, indem es relaxierende oder kontrahierende Faktoren freisetzt (DUVALL 2005). Ein gesundes Endothel erhält außerdem durch Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren eine antiatherogene und antithrombotische Umgebung aufrecht. So können Endothelzellen in Abhängigkeit ihrer Lokalisation in der arteriellen Gefäßstrombahn auf unterschiedliche hämodynamische Anforderungen, wie Fließgeschwindigkeit des Blutes oder Wirbelbildung an Gefäßbifurkationen, durch diese endotheliale Aktivität reagieren (BADIMON et al. 2009).

Die Tunica media als Muskelschicht reguliert den Gefäßdurchmesser in Abhängigkeit des Blutdrucks in den Gefäßen. Die Funktion der Adventitia ist durch ihren Aufbau aus Kollagenfasern und elastischen Netzen die Verankerung der Gefäße in ihrer Umgebung.

### 1.4 Stickstoffmonoxid (NO)

#### 1.4.1 Historie

Bei Stickstoffmonoxid (NO) handelt es sich um ein freies Radikal, eine labile Substanz mit kurzer biologischer Halbwertszeit. Es wird als endogenes Nitrat im menschlichen Körper gebildet (LÜSCHER 1992).

Lange Zeit war unklar, durch welche molekularen Mechanismen Stickstoffmonoxid

zur Vasodilatation führt. 1980 wurden von Furchgott und Sawadzki fundamentale Versuche an Kaninchenarterien zur Aufklärung des Mechanismus der Vasodilatation durchgeführt. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Arterienringe mit intakter Gefäßintima schon auf wesentlich geringere Konzentrationen an Acetylcholin mit einer Relaxation reagierten, als Kaninchenarterien, bei denen die Gefäßintima durch die Präparation beschädigt wurde. Daraus schlossen Furchgott und Sawadzki, dass Endothelzellen der Gefäßintima für die Vasorelaxation als Antwort auf Acetylcholin essentiell sind. Sie führten dies auf die Stimulation der Endothelzellen durch Acetylcholin zurück, welche daraufhin einen bislang unbekanntem Mediator freisetzen. Dieser Faktor vermittelt die Relaxation glatter Muskelzellen der Gefäßmedia, so dass es zur Vasodilatation kommt. Daraufhin wurde eine labile Substanz mit kurzer biologischer Halbwertszeit als EDRF (endothelium-derived relaxing factor) benannt, die zur Bildung von cGMP in den Gefäßmuskelzellen führt, deren Biochemie jedoch lange unklar blieb (FURCHGOTT UND SAWADZKI 1980).

1987 stellten Furchgott und unabhängig von ihm auch Ignarro Spekulationen an, dass es sich bei dem Faktor EDRF um das Gas Stickstoffmonoxid handeln müsse. Denn EDRF und NO haben überaus ähnliche biologische und chemische Eigenschaften und gleiche Auswirkungen auf glatte Muskelzellen und Thrombozyten, welche über den gleichen Mechanismus vermittelt werden. Beide aktivieren die lösliche Guanylatcyclase mit nachfolgendem Anstieg von intrazellulärem cGMP (IGNARRO et al. 1987, FURCHGOTT 1987).

Moncada konnte etwa ein Jahr später nachweisen, dass Endothelzellen in Kultur tatsächlich NO freisetzen. Eine gesteigerte NO-Freisetzung erfolgte dabei durch Stimulation mit den Substanzen Bradykinin und Kalzium-Ionophore A 23187. Aber auch unter unstimulierten Bedingungen setzen Endothelzellen ständig in geringeren Mengen NO frei. Das Substrat für die NO-Produktion der Endothelzellen stellt dabei die Aminosäure L-Arginin dar. Die Umsetzung der Aminosäure L-Arginin zu NO erfolgt durch ein Enzym in den Endothelzellen, der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (PALMER et al. 1988).

Das gebildete NO diffundiert aus den Endothelzellen der Tunica intima der Gefäße in die glatten Muskelzellen der Tunica media. Dort aktiviert es die lösliche Guanylatcyclase und führt dadurch zur Bildung von cGMP aus GTP, einem intrazellulären Second messenger (LÜSCHER 1992).

cGMP aktiviert Proteinkinasen und Ionenkanäle und dient damit der interzellulären Informationsweiterleitung. Es wird von der Enzymfamilie der Guanylatcyclasen synthetisiert. Zu den durch cGMP aktivierten Proteinkinasen gehören die cAMP-abhängigen Proteinkinasen, in deren Familie die in den Signaltransduktionsweg der eNOS involvierte Proteinkinase A gehört (KRUMENACKER et al. 2004).

Ein Anstieg der cGMP-Konzentration in den Zellen führt zur Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen und zur Dephosphorylierung der leichten Myosinketten. Dies verursacht eine Relaxation der Gefäßmuskelzellen und führt zur Vasodilatation (DUVALL 2005).

### 1.4.2 NO-Effekte auf das kardiovaskuläre System

Stickstoffmonoxid, synthetisiert von einer der drei bekannten NO-Synthasen, wird von verschiedenen Zellen und Geweben des Körpers freigesetzt. Es hat in Abhängigkeit von der jeweiligen Lokalisation unterschiedliche physiologische Effekte (ALDERTON et al. 2001).

Die Stickstoffmonoxid-Effekte auf das kardiovaskuläre System werden über die Endothelzellen der Gefäße vermittelt, welche NO in Abhängigkeit von physiologischen Reizen freisetzen. Hormone und Substanzen wie Acetylcholin und Bradykinin wirken hierbei über spezifische Rezeptoren auf den Endothelzellen. Physikalische Reize wie auf das Endothel einwirkende Scheerkräfte und erhöhte Fließgeschwindigkeit des Blutes in den Gefäßen führen über die direkte Stimulation der Endothelzellen zur NO-Freisetzung (CALVER et al. 1993).

NO bildet eine wesentliche Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus. Es trägt so zur Aufrechterhaltung des Blutflusses und der Regulation des Blutdrucks im Kreislauf bei (CALVER et al. 1993, MONCADA 1994).

Das vom Endothel freigesetzte NO interferiert mit zirkulierenden Blutzellen, vor allem mit Thrombozyten, aber auch mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Hier führt das durch NO stimulierte cGMP zu einer verminderten Adhäsion der Thrombozyten an den Gefäßwänden sowie zur Hemmung ihrer Aggregation (CALVER et al. 1993, FÖRSTERMANN et al. 1993, MONCADA UND VALLANCE 1994).

Durch Beeinflussung des Adhäsionsmoleküls CD11/CD18 führt NO auch zu einer verminderten Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel (KUBES et al. 1991). Außerdem vermindert es die Proliferation glatter Muskelzellen und die Produktion

von Matrixmolekülen, wie Kollagen und Elastin und verhindert somit die Ausbildung fibröser Plaques an den Gefäßwänden (FÖRSTERMANN et al. 1993).

### 1.5 Die eNOS

#### 1.5.1 Isoformen der NOS

Die NO-Synthasen (NOS) wurden erstmals 1989 beschrieben. In den Jahren 1991 bis 1994 wurden die drei Isoformen der NOS identifiziert (ALDERTON et al. 2001).

Erstmalig konnte die NO-Synthese in neuronalem Gewebe und in verschiedenen Zelltypen, die durch inflammatorische Zytokine oder bakterielle Endo- oder Exotoxine aktiviert wurden, sowie in den Endothelzellen von Blutgefäßen festgestellt werden. Später wurde sie auch in Myokard- und Endokardzellen nachgewiesen (MONCADA UND VALLANCE 1994).

Die Klassifikation erfolgt in drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase mit unterschiedlicher Lokalisation, Regulation und katalytischen Eigenschaften: Die neuronale NO-Synthase (nNOS), endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (ALDERTON et al. 2001).

Die nNOS wird auch als Typ-I-NOS bezeichnet, da sie als erstes Isoenzym der NO-Synthasen isoliert wurde. Sie liegt konstitutiv in hohen Konzentrationen in neuronalem Gewebe und in Skelettmuskelgewebe vor. Ihre Aktivität ist abhängig von der Anwesenheit von Kalzium und Calmodulin. Sie ist im Zytosol lokalisiert. Die NO-Synthese, katalysiert durch die nNOS, erfolgt u.a. nach Stimulation durch Glutamat (KNOWELS UND MONCADA 1994).

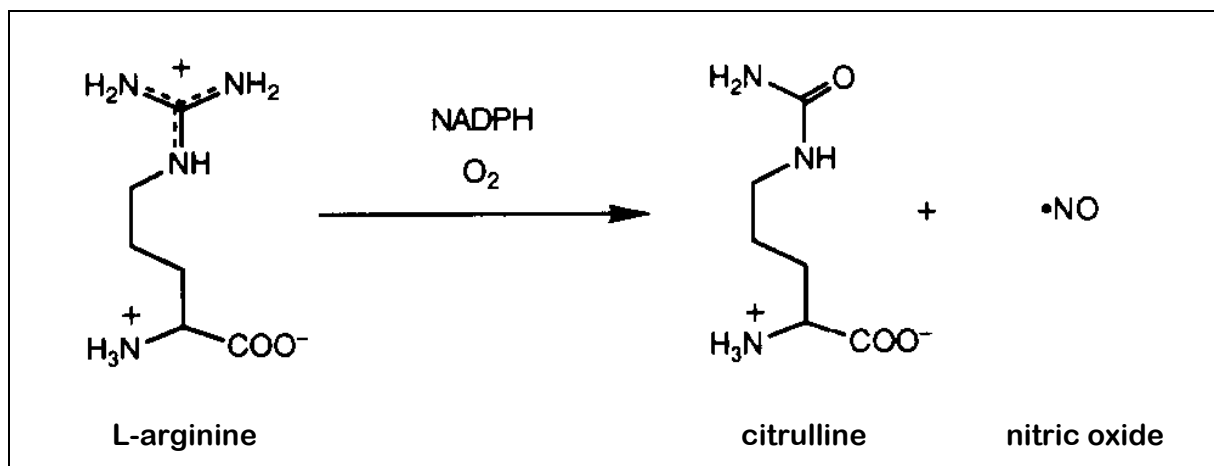
Die iNOS wird auch als Typ-II-NOS bezeichnet. Sie ist durch verschiedene Zytokine in Makrophagen, Hepatozyten und glatten Muskelzellen induzierbar. Ihre Aktivität ist im Gegensatz zur nNOS und eNOS kalzium- und calmodulinunabhängig. Sie liegt nur im Zytosol der entsprechenden Zellen vor (KNOWELS UND MONCADA 1994).

Die eNOS, oder Typ-III-NOS, liegt ebenfalls konstitutiv vor, aber überwiegend in den Endothelzellen von Blutgefäßen. Sie ähnelt funktionell der nNOS, auch ihre Aktivität ist kalzium- und calmodulinabhängig. Im Unterschied zur nNOS liegt sie jedoch sowohl in gelöster Form im Zytosol, als auch membrangebunden in der Zelle vor. Die Stimulation der NO-Synthese durch die eNOS erfolgt durch viele verschiedene Stimuli (KNOWELS UND MONCADA 1994). In dieser Arbeit wird die Signaltransduktion der

eNOS-Aktivierung durch EGCG, einem Katechin aus Grünem Tee, untersucht.

### 1.5.2 Aufbau und Aktivierung der eNOS

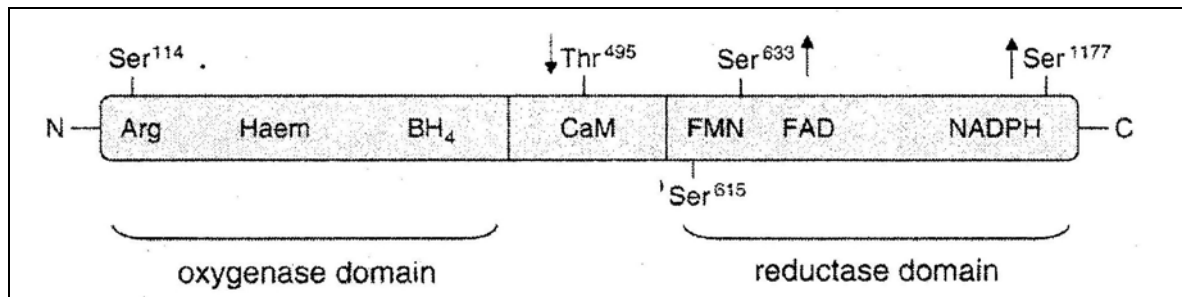
Die eNOS katalysiert die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff unter der Bindung essentieller Kofaktoren (FLEMING UND BUSSE 2003). In Abbildung 2 ist die NO-Synthese dargestellt.



**Abb. 2: NO-Synthese.** Synthese von NO und Citrullin aus L-Arginin und Sauerstoff, katalysiert durch die NOS (modifiziert nach MARLETTA 1993).

Die eNOS ist ein aus zwei identischen Monomeren aufgebautes Homodimer. Jedes Monomer besitzt eine amino-terminale Oxigenasedomäne und eine carboxy-terminale Reduktasedomäne. An beiden Domänen der eNOS befinden sich Bindungsstellen für Kofaktoren der eNOS.

An der N-terminalen Oxigenasedomäne befinden sich Bindungsstellen für die Kofaktoren Häm, Tetrahydropterin (BH<sub>4</sub>) und L-Arginin. An der C-terminalen Reduktasedomäne befinden sich Bindungsstellen für die Kofaktoren FAD, FMN und NADPH. Die Oxigenasedomäne und die Reduktasedomäne sind über eine Calmodulin-Bindungsstelle verbunden (ALDERTON et al. 2001).



**Abb. 3: Aufbau der eNOS.** eNOS-Monomer bestehend aus einer Oxygenase- und einer Reduktase-domäne mit den Bindungsstellen für die Kofaktoren der eNOS (Häm, Tetrahydropterin, L-Arginin, FAD, FMN, NADPH und Calmodulin) und den Phosphorylierungsstellen der eNOS (Ser114, Ser615, Ser633, Ser1177, Thr495) (Modifiziert nach MOUNT et al. 2007).

An beiden Domänen befinden sich die Phosphorylierungsstellen der eNOS. Hierbei handelt es sich um Serin- und Threonin- Aminosäurereste, an denen die eNOS über unterschiedliche Signaltransduktionswege phosphoryliert und damit in ihrem Aktivitätszustand geändert werden kann (Abbildung 3).

Phosphorylierungsstellen der eNOS:

- Serin1179 (Ser1179 bovine/1177 human): Die Phosphorylierungsstelle Ser1179 ist die bekannteste und am meisten untersuchte Phosphorylierungsstelle der eNOS. Sie ist im Bereich der Reduktasedomäne der eNOS lokalisiert. Sie ist im basalen Zustand in unstimulierten Endothelzellen dephosphoryliert. Nach Stimulation durch humorale Faktoren wie Östrogen, VEGF, Insulin, Bradykinin oder durch auf die Endothelzellen einwirkende Scheerkräfte erfolgt eine rasche Phosphorylierung und damit Aktivierung der eNOS. Daraufhin kommt es zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg der NO-Produktion gegenüber der basalen NO-Produktion (FLEMING UND BUSSE 2003). Die Phosphorylierung erfolgt in Abhängigkeit vom einwirkenden Stimulus über unterschiedliche Signaltransduktionswege. Am Signaltransduktionsweg beteiligte Kinasen sind die Akt-Kinase, die Protein Kinase A (PKA), die AMP-activated protein kinase (AMPK), die Kalzium-Calmodulin-Kinase II (CaMKII) und die Proteinkinase G (PKG) (MOUNT et al. 2007).
- Serin635 (Ser635 bovine/633 human): Die Phosphorylierungsstelle Ser635 ist im Bereich des sogenannten „autoinhibitory loop“ lokalisiert. Die Phosphorylierung erfolgt in vitro über die Proteinkinase A, Akt und die Proteinkinase G. Die Phosphorylie-

nung erfolgt nach Stimulation durch die gleichen Faktoren, welche zur Serin1179-Phosphorylierung führen (MOUNT et al. 2007).

- Serin617 (Ser617 bovine/615 human): Die Funktion dieser Phosphorylierungsstelle ist bisher nicht eindeutig geklärt. In verschiedenen Untersuchungen werden ihr sowohl aktivierende als auch inhibierende Eigenschaften nach Phosphorylierung zugeschrieben (MOUNT et al. 2007).
- Serin116 (Ser116 bovine/114 human): Die Phosphorylierungsstelle Ser116 ist als einzige im Bereich der Oxigenasedomäne lokalisiert. Auch ihre Funktion war lange nicht eindeutig geklärt. Li et al. schlossen jedoch auf eine inhibitorische Funktion der Serin116-Phosphorylierung (LI et al. 2007).
- Threonin497 (Thr497 bovine/495 human): Die Phosphorylierungsstelle Thr497 ist im basalen Zustand phosphoryliert. Sie hat eine inhibitorische Funktion, da ihre Phosphorylierung mit einer verminderten Enzymaktivität der eNOS einhergeht. Die Phosphorylierung erfolgt hauptsächlich über die Protein Kinase C (PKC). Die Dephosphorylierung der Thr497-Phosphorylierungsstelle hingegen führt zu einem 10- bis 20-fachen Anstieg der NO-Produktion gegenüber der basalen NO-Produktion (FLEMING UND BUSSE 2003). Stimuliert wird dieser Vorgang durch Substanzen, die die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den Endothelzellen steigern, z. B. Bradykinin, Histamin und Kalzium-Ionophore (MOUNT et al. 2007).

### 1.5.3 Regulation der eNOS

Die Regulation der eNOS erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen:

- Transkriptionale Regulation

Die eNOS liegt zwar als konstitutives Enzym in den Endothelzellen vor, ihre Expression wird aber von verschiedenen Stimuli reguliert. Primär ist die Expression gewebeabhängig. Sie wird vornehmlich in den Endothelzellen großer und mittlerer Gefäße exprimiert. Substanzen wie VEGF, Insulin, Hydrogenperoxid, Östrogen und auf das Endothel einwirkende Scheerkräfte induzieren die Transkription und führen zu einer vermehrten Synthese des eNOS-Proteins. Es sind auch verschiedene Faktoren bekannt, die zu einer verminderten eNOS-Expression führen, z. B. Tumor Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Erythropoietin sowie eine auf das Endothel einwirkende Hypoxie (GOVERS UND RABELINK 2001).

- **Kotranslationale Regulation**

Die kotranslationale Modifikation der eNOS erfolgt durch Myristoylierung an einem Glycinrest, welcher an der N-terminalen eNOS-Domäne lokalisiert ist. Diese Modifikation ist irreversibel. Durch diesen Vorgang wird die Membranbindung der eNOS gewährleistet. Dadurch wird die Nähe zu den essentiellen Kofaktoren für die NO-Synthese hergestellt. Ohne diese Modifikation würde sich die eNOS nahezu ausschließlich im Zytosol befinden (GOVERS UND RABELINK 2001).

- **Posttranslationale Regulation**

Zu den posttranslationalen Modifikationen der eNOS gehört die Palmitoylierung, eine reversible Modifikation an Cysteinresten der N-terminalen eNOS-Domäne, die zur Stabilisierung der Membranassoziation führt (GOVERS UND RABELINK 2001). Diese Membranassoziation ist für die Phosphorylierung der eNOS als Antwort auf unterschiedliche Stimuli, wie VEGF oder Östrogen erforderlich (FLEMING UND BUSSE 2003). Die Änderung im Phosphorylierungszustand der Zelle zählt ebenfalls zur eNOS-Regulation auf posttranslationaler Ebene.

- **eNOS-Regulation durch Protein-Protein-Interaktionen**

Weiterhin tragen Protein-Protein-Interaktionen zur eNOS-Regulation bei. Dabei gibt es sowohl aktivierende, als auch inhibierende Protein-Protein-Interaktionen. Aktivierende Protein-Protein-Interaktionen erfolgen beispielsweise mit Calmodulin, dessen Bindung für die enzymatische Aktivität aller drei Isoformen der NOS essentiell ist. Außerdem durch Bindung des Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) an die eNOS, wodurch es zu einer schnelleren Phosphorylierung und damit Aktivierung der eNOS kommt (ALDERTON et al. 2001, FLEMING UND BUSSE 2003).

Inhibierende Protein-Protein-Interaktionen erfolgen durch Interaktion mit Caveolin-1, welches über eine Verhinderung der Calmodulin-eNOS-Bindung zur direkten Inhibition der eNOS führt (ALDERTON et al. 2001, FLEMING UND BUSSE 2003).



### 1.6 Signaltransduktion

#### 1.6.1 Kalzium als Aktivator

Kalzium ist einer der wichtigsten biologischen Botenstoffe und in viele Signaltransduktionsabläufe von Zellen involviert. Die zelluläre Informationsvermittlung erfolgt dabei über kurzfristige Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration, diese führt beispielsweise zu Vorgängen wie Muskelkontraktion, Sekretion von Hormonen oder neuronalen Übertragungen (CHENG UND LEDERER 2008).

Durch Membrandepolarisation glatter Muskelzellen beispielsweise kommt es zu einer Öffnung von L-Typ-Kalziumkanälen, was zu einem raschen Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Zelle führt. Dies bedingt die Aktivierung glatter Muskelzellen und eine Vasokontraktion (BERRIDGE 2008).

Durch die Kalzium-ATPase wird das Kalzium wieder aus der Zelle transportiert und damit eine niedrige basale intrazelluläre Kalziumkonzentration aufrechterhalten.

Da die Aktivität der eNOS kalziumabhängig ist, wird in dieser Arbeit der Einfluss von Kalzium auf die Aktivitätssteigerung der eNOS durch EGCG untersucht.

#### 1.6.2 Die Rolle von Kinasen

Kinasen sind als Enzyme zentrale Elemente der intrazellulären Signaltransduktion. Sie induzieren eine Phosphorylierung an entsprechenden Akzeptorproteinen und führen so zur Aktivierung. Dies führt zu erhöhter Geschwindigkeit folgender zellulärer Reaktionen. Selektive und nicht-selektive Inhibitoren, welche die Aktivität der jeweiligen Kinase hemmen, werden zur Aufklärung der Funktion der verschiedenen Kinasen eingesetzt. Da der Vorgang der Phosphorylierung auch in viele pathologische Prozesse involviert ist, haben spezifische Proteinkinaseinhibitoren auch im Bereich der Pharmakologie eine große Bedeutung (TARRANT UND COLE 2009).

Wie von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, erfolgt die Aktivierung der eNOS durch EGCG über Proteinkinasen. In Versuchen zur Messung der eNOS-Aktivität und -Phosphorylierung konnte durch Einsatz spezifischer Kinaseinhibitoren gezeigt werden, dass die eNOS über einen PI3-Kinase / PKA- und Akt-Kinase - abhängigen Weg durch Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser 1179 aktiviert wird. Eine vermehrte eNOS-Aktivität durch eine EGCG-induzierte Steigerung der eNOS-Proteinmenge konnte dabei ausgeschlossen werden (LORENZ et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit soll der weitere Signaltransduktionsweg der EGCG-induzierten eNOS-Aktivierung unter Einbeziehung weiterer Kinasen, G-Protein- und rezeptorvermittelter Prozesse untersucht werden.

### **1.7 Ziel der Arbeit**

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die molekularen Mechanismen des Signaltransduktionswegs der eNOS-Aktivierung nach Stimulation durch das Teekatechin Epigallocatechingallat (EGCG) aus Grünem Tee weiter aufzuklären. Hierzu erfolgt der Einsatz von Proteinkinaseinhibitoren in bovinen Aortenendothelzellen (BAEC's) in Zellkulturversuchen im eNOS-Aktivitätstest und im Westernblotverfahren. Anschließend wird die in vivo-Relevanz dieser Ergebnisse im Rattenaortenmodell überprüft. Damit sollen Aussagen über die Mechanismen möglicher protektiver Wirkungen von EGCG auf Endothelzellen bzw. das Gefäßsystem gemacht werden können.

**2 Material und Methoden****2.1 Chemikalien**

Acrylamid	Roth
AP-Puffer (Alkalische Phosphatase-Puffer)	
APS (Ammonium Persulfate)	Serva Feinbiochemica
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolphosphate)	Sigma
Bromphenolblau	Biomol
Complete	Roche
Diclophenac	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DOWEX	Serva
Ethanol	J. T. Baker
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Glukose	Merck
Glycerol	Invitrogen
Hepes-Na-Salz	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck
Magnesiumtetrasulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck
Natronlauge (NaOH)	Merck
Nitro-blue-Tetraekidium (NBT)	Sigma
N, N, N', N'-Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Serva Feinbiochemica
Okadaic acid	Sigma
Pefablock	Boehringer
Phenylephrin	Sigma

Salzsäure (HCL)	Merck
Sodiumdodezylsulfat (SDS)	Serva
Sodium molybdate	Fluka
Sodium vanadate	Fluka
β-Mercaptoethanol	Sigma
Tris	Merck
Tween	Aldrich

## **2.2 Zellkultur**

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um Bovine Aortenendothelzellen (BAEC).

### **2.2.1 Nährmedien und Lösungen**

Die Zellen wurden in EGM-Medium (Endothel Cell Growth Medium) von der Firma Cambrex kultiviert.

EBM-Medium (Endothel Cell Basal Medium) Cambrex

Dem EBM-Medium wurden vor dem Gebrauch folgende Zusätze zugefügt:

5 % FCS (fetales Kälberserum)

0,1 % hEGF(human Epidermal Growth Factor)

0,1 % Hydrocortison

0,1 % Gentamycin / Amphotericin

0,4 % BBE ( bovine brain extract )

Das verwendete Medium wurde vor dem Gebrauch sterilfiltriert.

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) Gibco BRL Life Technologies

Das PBS diente zum Waschen der Zellen vor der Passagierung, bzw. vor der Zelllyse.

Trypsin/EDTA Gibco BRL Life Technologies

Das Trypsin diente durch partiellen Verdau der Zellmembran zum Ablösen der adhären Zellen von der Zellkulturflasche beim Passagieren.

### 2.2.2 Kultivierung der Zellen

#### 2.2.2.1 Inkubation

Die BAEC's wurden bei einer Temperatur von 37°C und unter einer CO<sub>2</sub>-Begasung von 5% in Brutschränken der Firma Hareus Instruments kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte in 75 cm großen Zellkulturflaschen, bzw. in 6 cm großen Zellkulturschalen in denen sich die Zellen als adhärenter Zellmonolayer befanden. In jeder Zellkulturflasche befanden sich 20 ml EGM-Medium auf den Zellen, bzw. 3 ml EGM-Medium auf den Zellen in Kulturschalen. Es erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel.

#### 2.2.2.2 Passagierung

Zur Passagierung der Zellen wurde das alte Medium mittels Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS pro Zellkulturflasche gewaschen. Dadurch wurden Mediumreste, die FCS enthalten, von den Zellen entfernt. Das FCS würde sonst die Wirkung des Trypsins verhindern.

Zum Ablösen der Zellen von der Kulturflasche wurden diese mit 1,5 ml Trypsin bei 37°C für 1,5 min inkubiert, so dass diese anschließend durch Klopfen auf den Flaschenboden abgelöst werden konnten. Anschließend wurden die Zellen sofort in frischem EBM-Medium aufgenommen, was zur Inaktivierung des Trypsins führt. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium zu erhalten, wurden die Zellen mehrmals im Medium hin- und herpipettiert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:4 auf neue Kulturflaschen, bzw. in einem Verhältnis von 1:12 auf Zellkulturschalen aufgeteilt. Die Zellen wurden für die Versuche in den Passagen 4 bis 12 verwendet. Sie wurden bis zur Konfluenz in Zellkulturschalen kultiviert.

#### 2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden sie mit 5 ml PBS gewaschen, anschließend mit 1,5 ml Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst und in 10 ml EGM-Medium aufgenommen. Dann wurden die Zellen in ein 15 ml-Falcon überführt und für 10 min zentrifugiert. Das Medium wurde mittels Pasteurpipette bis zu dem durch die Zentrifugation entstandenen Zellpellet abgesaugt, die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufge-

nommen und darin in ein Kryoröhrchen überführt.

Zum Schutz der Zellen wurden sie für zwei Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem Einfrierbehälter eingefroren. Dieser Einfrierbehälter ist mit Isopropanol gefüllt, was zu einem langsameren Absinken der Temperatur führt, so dass es zu weniger Zellschäden kommt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren und dort weiter gelagert.

Zum Auftauen wurden die bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen entnommen und durch Inkubation im  $37^{\circ}\text{C}$  warmem Wasserbad schnell aufgetaut.

Die Zellen wurden aus dem Kryoröhrchen in 20 ml EBM-Medium aufgenommen und in eine 75 cm Zellkulturflasche überführt, in der sie bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank kultiviert wurden. Ungefähr fünf Stunden nach dem Auftauen der Zellen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um das sich im Einfriermedium befindliche, zellschädigende DMSO zu entfernen.

### **2.2.3 Stimulation der Zellen**

Die Stimulation der Zellen erfolgte in 6 cm großen Zellkulturschalen in Konfluenz.

Vor Stimulation der Zellen mit EGCG wurde das sich auf den Zellen befindliche Medium mittels Pasteurpipette abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit je 1,5 ml warmem HEPES-Puffer gewaschen, daraufhin wurden genau 2 ml HEPES-Puffer auf die Zellen gegeben. Bei Vorbehandlung der Zellen mit einer Substanz wurde diese in den HEPES-Puffer gegeben und die Zellen wurden für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert.

EGCG wurde nach der 30-minütigen Inkubation in den HEPES-Puffer gegeben und die Zellen wurden für weitere 15 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zellyse und Proteinextraktion.

### **2.2.4 Zellyse und Proteinextraktion**

Material:

Stöplösungen: PBS

Hypotonischer Puffer:	1 mM DTT
	1 mM Natrium molybdate
	0,3 mM Natrium vanadate

Lysepuffer :	1 mM Natrium vanadate
	10 mM NaF
	Complete
	100 nM Okadaic Säure
	1 mM Pefablock

Durchführung :

Nach Inkubation der Zellen für die angegebene Zeit mit EGCG wurde die Reaktion gestoppt. Dazu wurde der Hepes-Puffer abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 1,5 ml eiskaltem PBS und einmal mit 1,5 ml eiskaltem Hypotonischen Puffer gewaschen. Die in dem Hypotonischen Puffer enthaltenen Proteaseinhibitoren ermöglichen eine längere und effizientere Aufrechterhaltung der durch EGCG hervorgerufenen Phosphorylierungen der eNOS.

Anschließend wurden die Zellen in den Kulturschalen auf Eis gestellt und mit je 80 µl Lysepuffer überspült. Um zu gewährleisten, dass alle Zellen auf der Schale mit dem Lysepuffer in Kontakt gekommen sind und somit eine optimale Zelllyse erreicht wird, wurde dies ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst und in ein vorgekühltes Eppendorfggefäß überführt.

Das Proteinlysate wurde anschließend bei 14000 U/min und 4°C für 15 min zentrifugiert, um die sich im Lysepuffer befindlichen Proteine von den Zelltrümmern zu trennen. Anschließend wurde der Überstand in ein vorgekühltes Eppendorfggefäß überführt. Das Pellet aus Zelltrümmern wurde verworfen.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteinlysate bei -80°C gelagert.

### **2.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die quantitative Messung der Proteine erfolgte mittels eines kommerziell erworbenen Kits, dem BIO-RAD Protein Assay der Firma BIO RAD München nach der Bradford-Methode.

Bei der Methode nach Bradford erfolgt eine Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue an die Proteine. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbe von 465 nm ohne Protein nach 595 nm mit Protein.

Die Zunahme der Absorption der Farbe bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

### 2.4 Western Blot

Zur qualitativen Analyse der Proteine wurde ein Western Blot angefertigt. Dafür wird zur Auftrennung der Proteine ein SDS-Pagegel nach Lämmli gegossen, welches einen diskontinuierlichen pH-Wert besitzt (Sammelgel pH 6,8 und Trenngel pH 8,8). Zur Denaturierung der Proteine werden diese mit 5x SDS-Probenpuffer aufgekocht. SDS (Sodiumdodecylsulfat) bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, was zur Entstehung negativ geladener SDS-Protein-Komplexe führt. Diese SDS-Protein-Komplexe besitzen ein konstantes Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein bei 1 % SDS-Lösungen). SDS denaturiert Proteine und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Bei der SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli wandert der SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix werden die SDS-Proteinkomplexe dabei nach ihrem Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das anschließende Blotting bedingt die Übertragung der aufgetrennten Proteine des SDS-Gels auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid-) Membran. Durch spezifische Antikörper können sie dann nachgewiesen werden.

Material:

	Trenngel 8%	Sammelgel
1,5 M Tris-HCL	pH 8,8 → 1,56 ml	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
dd H <sub>2</sub> O	3,28 ml	3,65 ml



## Material und Methoden

5xSDS-Probenpuffer :                    1 M Tris-HCL, pH 6,8  
    87% Glycerol  
     $\beta$ -Mercaptoethanol  
    10% SDS  
    Bromphenolblau (BPB)

10xSDS-Laufpuffer, pH 8,3 :            30,3 g Tris  
    144 g Glycin  
    10 g SDS

Für 1x SDS wird eine 1:10 Verdünnung hergestellt.

1xBlotpuffer :                            100 ml 10xSDS-Laufpuffer  
    200 ml Methanol  
    Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

Waschpuffer :                            20x TBS (1 M Tris, 3 M NaCl)  
    10%iges Tween

AP-Puffer (alk. Phosphatase) :        1 M Tris-HCl, pH 9,5  
    5 M NaCl  
    1 M MgCl<sub>2</sub>

AP-Entwicklung der Proteine mit :    10 ml AP-Puffer  
    1ml NBT (Nitro-blue-Tetraekidium) 1mg/ml  
    100  $\mu$ l BCIP (5-bromo-4-chloro-3 in-  
    dolphosphate) 5 mg/ml

Blockierlösung :            Roti-Block            Roth  
    1:10 verdünnt mit PBS

Marker :                            Prestained Protein Marker Broad Range von Biolabs

Erstantikörper:

anti-phospho-eNOS (Ser1177)

Cell Signaling (# 9571)

anti-phospho-eNOS (Ser632)

zur Verfügung gestellt von Bruce Kemp, St.  
Vincent's Institute of Medical Research,

anti-phospho-eNOS (Ser614)	Fitzroy, Australien (Batch R533-267) zur Verfügung gestellt von Bruce Kemp, St. Vincent's Institute of Medical Research, Fitzroy, Australien (Batch R791-776)
anti-phospho-eNOS (Ser116)	Upstate (# 07-357)
anti-phospho-eNOS (Thr495)	Upstate (# 07-384)
anti-eNOS	BD Transduction Laboratories (# 610295)
anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling (# 92719)
anti-Akt	Santa Cruz Biotechnology (# 8312)
anti-phospho-Src (Src527)	Cell Signaling (# 2105)
anti-phospho-Src (Src416)	Cell Signaling (# 2101)
Zweitantikörper:	
anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology (# sc-2004)
anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology (# sc-2005)

### Durchführung:

Bei der Herstellung der Gele richtet sich deren Vernetzungsgrad nach dem zu erwartenden Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins. Bei eNOS handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 140 kDa für das sich ein 8%-iges Trenngel eignet.

Die Proteinextrakte werden zusammen mit dem SDS-Puffer zur Denaturierung der Proteine für drei bis fünf Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend kurz anzentrifugiert. Dann werden die Gele mit dem Marker und den Proteinproben geladen. Die Laufzeit der Gele beträgt eine Stunde bei 30 mA. Nach der Elektrophorese werden die Gele aus der Laufkammer genommen; es folgt das Blotten. Beim Blotten werden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wird das Gel in der Blotkammer auf drei Lagen mit Blotpuffer getränktem Whatmanpapier gelegt, die PVDF-Membran darauf platziert und beides wiederum mit drei Lagen in Blotpuffer getränktem Whatmanpapier bedeckt. Die PVDF-Membran muss dazu vorher kurz in Methanol und anschließend kurz in Blotpuffer geschwenkt werden, da wässrige Lösungen trockene PVDF-Membranen nicht benetzen. Die Blotkammer wird verschlossen und das Blotten erfolgt für 2 - 2,5 Stunden unter konstanter Leistung von



## Material und Methoden

BAPTA-AM gelöst in H <sub>2</sub> O	Calbiochem
PP2 gelöst in DMSO	Calbiochem
PP3 gelöst in DMSO	Calbiochem
KN-93 gelöst in DMSO	Calbiochem
SB 202190 gelöst in DMSO	Calbiochem
SB 203580 gelöst in DMSO	Calbiochem
PTX gelöst in Glycerol	Calbiochem
L-Arginin	Fluka
L-(2,3,4,5 <sup>3</sup> H)Arginin	Amersham Pharmacin Biotech
Szintilationscocktail: Rotiszint eco plus	Carl Roth GmbH & Co

### Durchführung:

Zur Bestimmung der Aktivität der endothelialen NO-Synthase wurde ein eNOS-Aktivitätstest durchgeführt. Dieser eNOS-Aktivitätstest wird in vivo in lebenden Zellen durchgeführt. Während des Tests werden den Zellen keine Kofaktoren zugefügt, so dass der Test unter weitgehend physiologischen Bedingungen abläuft.

Grundlage dieses Enzymaktivitätstest ist die Umwandlung von mit Tritium (<sup>3</sup>H) radioaktiv markiertem L-Arginin als Substrat zu radioaktiv markiertem Citrullin als Produkt durch die eNOS. Die dabei entstehende Citrullinmenge entspricht der entstandenen NO-Menge und ist somit ein Maß für die Aktivität der eNOS.

Dafür werden die auf 6 cm Zellkulturschalen ausplattierten Zellen zweimal mit auf 37°C erwärmtem HEPES-Puffer, dem zuvor Kalzium zugefügt wurde, gewaschen. Dies dient der Entfernung von Argininresten von den Zellen, da dies im Zellkulturmedium in hohen Konzentrationen vorhanden ist. Anschließend werden 2 ml HEPES-Puffer auf die Zellen gegeben. Wurden die Zellen mit einer Substanz vorbehandelt, wird sie dem HEPES-Puffer wieder zugefügt. Es folgt eine Inkubation der Zellen für 30 min bei 37°C. Nach der Inkubation wird zeitlich versetzt zuerst 1 ml HEPES-Puffer abgenommen und dann die Enzymreaktion durch Zugabe des Reaktionsansatzes bestehend aus HEPES-Puffer, 1 mM L-Arginin und <sup>3</sup>H -Arginin gestartet. Das Stimulanz wird dem Reaktionsansatz zugefügt. Bei der Reaktion wird das endogene Arginin der Zellen von dem zugefügten <sup>3</sup>H -markierten Arginin verdrängt. Die Zellen werden für 15 Minuten bei 37°C mit dem Reaktionsansatz inkubiert. Anschließend wird die Enzymreaktion durch Ab-

saugen des Reaktionsgemisches und Zugabe von 2 ml eiskaltem Stoppuffer für eine Minute gestoppt. Hierbei verdrängt L-Arginin das radioaktivmarkierte Arginin und EDTA bindet das Kalzium, so dass es zum Stopp der Reaktion kommt. Anschließend werden 0,5 ml 95%-iges Ethanol zur Lyse auf die Zellen gegeben. Das Ethanol wird abgedampft bis die Zellen trocken sind. Anschließend werden zur Aufnahme der löslichen Zellmetabolite 2 ml Extraktionspuffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Extraktionspuffer inkubiert. Der Überstand wird auf die zuvor mit DOWEX vorbereiteten Säulen überführt.

Bei dem DOWEX handelt es sich um einen Ionenaustauscher dessen pH-Wert auf 5,5 eingestellt ist. Die Säulen werden dafür mit ca. 3,5 ml DOWEX (0,5 g/ml) gefüllt und anschließend einmal mit 20 mM HEPES-Na gewaschen. Aufgrund des sauren pH-Wertes des DOWEX passiert das neutrale radioaktiv markierte Citrullin die Säule und sammelt sich im unter der Säule platzierten Messröhrchen. Das basische Arginin wird vom DOWEX in der Säule gebunden. Zur größeren Citrullinausbeute wird die Säule anschließend zweimal mit je 2 ml doppeldestilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das radioaktiv markierte Citrullin wird anschließend mit je 12 ml Szintilationscocktail pro Röhrchen versetzt, gut gemischt und anschließend im Szintilationscounter der Firma Wallac mit dem Programm Easy Count gemessen. Durch die vom tritiumgelabeltem Citrullin ausgehende  $\beta$ -Strahlung werden im Szintilationscocktail enthaltene Moleküle auf ein höheres Energieniveau gehoben. Kehren diese auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, geben sie Photonen ab, die vom Szintilationscounter gemessen und in cpm angegeben werden. In Abhängigkeit von der entstandenen Menge an tritiumbeladenem Citrullin und der damit ausgesandten Strahlung kann man auf die Aktivität der eNOS schließen.

### **2.6 Relaxationsversuche an Rattenaortenringen**

Material:

Krebs-Henseleit-Lösung:      144 mM NaCl  
   5,9 mM KCl  
   1,6 mM CaCl<sub>2</sub>  
   1,2 mM MgSO<sub>4</sub>  
   1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
   25 mM NaHCO<sub>3</sub>

11,1 mM D - Glukose	
1 $\mu$ M Diclophenac	
Phenylephrin gelöst in NaCl	Sigma
Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) gelöst in H <sub>2</sub> O	Sigma

### Durchführung:

Die Entnahme der Aorten erfolgte von männlichen Wistarratten. Die Ratte wurde dazu mit 2 ml Thiopental, welches intraperitoneal injiziert wurde, anästhesiert. Die Aorten wurden anschließend entnommen und in eine auf 4°C temperierte Krebs-Henseleit-Lösung eingelegt. Dort erfolgte die weitere Präparation der Rattenaorten. Die Aorten wurden fixiert und unter dem Mikroskop durch vorsichtige Präparation mit einer spitzen Pinzette von jeglichen Fett- und Bindegewebsresten befreit. Anschließend erfolgte eine Spülung der Aorten mit der Krebs-Henseleit-Lösung, um das Endothel der Aorten von möglichen Thrombenresten zu befreien. Nach Präparation der Aorten wurden diese in etwa 2 mm breite Ringe geschnitten. Die Ringe wurden an Platinhaken in je ein mit 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Organbad gehangen. Die Organbäder wurden mit 37°C warmem Wasser umspült. Zur Aufrechterhaltung eines pH-Wertes von 7,4 erfolgte die kontinuierliche Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>). Die Aortenringe wurden an den Platinhaken mit 2 g vorgespannt. Zur Testung der Kontraktionsfähigkeit der Ringe wurden diese nach 15 minütiger Äquilibration mit kaliumangereicherter Krebs-Henseleit-Lösung umspült. Bei fehlender Kontraktibilität wurden diese ausgetauscht. Anschließend erfolgte das dreimalige Auswaschen der Lösung mit Standard-Krebs-Henseleit-Lösung; nach einstündiger Pause sollten die Aortenringe die Ausgangsspannung von 2 g wieder erreicht haben.

Die Spannung der Aortenringe wurde von Kraftaufnehmern registriert, digitalisiert und als Kurve auf dem Bildschirm mit der Einheit mg dargestellt. Diese Darstellung erfolgte durch das Programm LabView. Anschließend erfolgte die Hinzugabe des  $\alpha_1$ -Agonisten Phenylephrin, was zu einer Vorkontraktion der Aortenringe führte. Diese Vorkontraktion wurde nach etwa 30 Minuten erreicht. Es erfolgte dann abhängig vom jeweiligen Experiment die kumulative Gabe von EGCG (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) in 30-minütigen Abständen oder eine Einmalgabe von 10  $\mu$ M EGCG ins Organbad.

## **2.7 Aufarbeitung der Aortenringe zur Proteinextraktion**

Material:

Stop-Lösungen: PBS

Hypotonischer Puffer:

1 mM DTT

1 mM Natrium molybdate

0,3 mM Natrium vanadate

Lysepuffer : 1 mM Natrium vanadate

10 mM NaF

Complete

100 nM Okadaic Säure

1 mM Pefablock

Durchführung:

Nach Stimulation der Aortenringe an der Organbadanlage mit verschiedenen EGCG-Konzentrationen wurden die Ringe aus dem Organbad entnommen und vorsichtig von den Platinhaken entfernt. Zum Stoppen der Reaktion wurden sie sofort in 1,5 ml kaltem PBS und anschließend in 1,5 ml kaltem Hypotonischen Puffer gespült. Dann wurden die Aortenringe in Eppendorfgläser überführt und bei  $-195^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Ringe bis zur weiteren Aufarbeitung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zur Aufarbeitung der Aortenringe zu Proteinextrakten wurden diese auf Eis aufgetaut und in 2 ml-Eppendorfgläsern mit je 70  $\mu\text{l}$  Lysepuffer versetzt und je zwei Metallkugeln hinzugegeben. Die Eppendorfgläser mit den Aortenringen und Metallkugeln wurden in eine Schwingmühle MM 300 der Firma Retsch eingelegt, welche für zweimal 30 Sekunden gestartet wurde. Dies führte zur Zertrümmerung und in Kombination mit dem Lysepuffer zur Lysierung der Zellen der Aortenringe und somit zur Proteinextraktion. Im Anschluss wurden die Proteinlysate zentrifugiert, der Überstand von dem entstandenen Zellpellet entfernt und in ein weiteres vorgekühltes Eppendorfglas überführt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung.

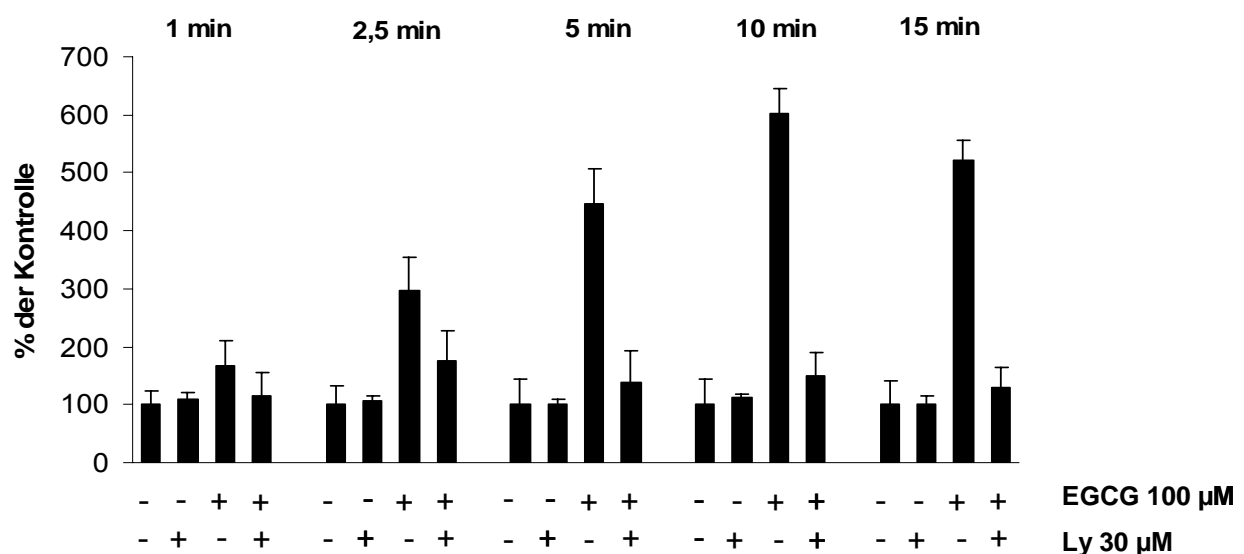
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zeitkinetik der eNOS-Aktivierung und eNOS-Phosphorylierung durch EGCG

Aufbauend auf die bereits publizierten Ergebnisse, die eine durch EGCG induzierte Steigerung der eNOS-Aktivität in BAEC zeigten (LORENZ et al. 2004), wurde die Fragestellung untersucht, ob die eNOS-Aktivierung durch EGCG zeitabhängig ist und ab welchem Zeitpunkt eine Aktivitätssteigerung festzustellen ist.

##### 3.1.1 Zeitabhängige eNOS-Aktivierung und eNOS-Phosphorylierung

Zur Untersuchung der Zeitkinetik der eNOS-Aktivierung durch EGCG wurden BAEC für unterschiedliche Zeiten (1 Minute; 2,5 Minuten; 5 Minuten; 10 Minuten; 15 Minuten) mit EGCG stimuliert und im Anschluss ein eNOS-Aktivitätstest durchgeführt (Abbildung 4).



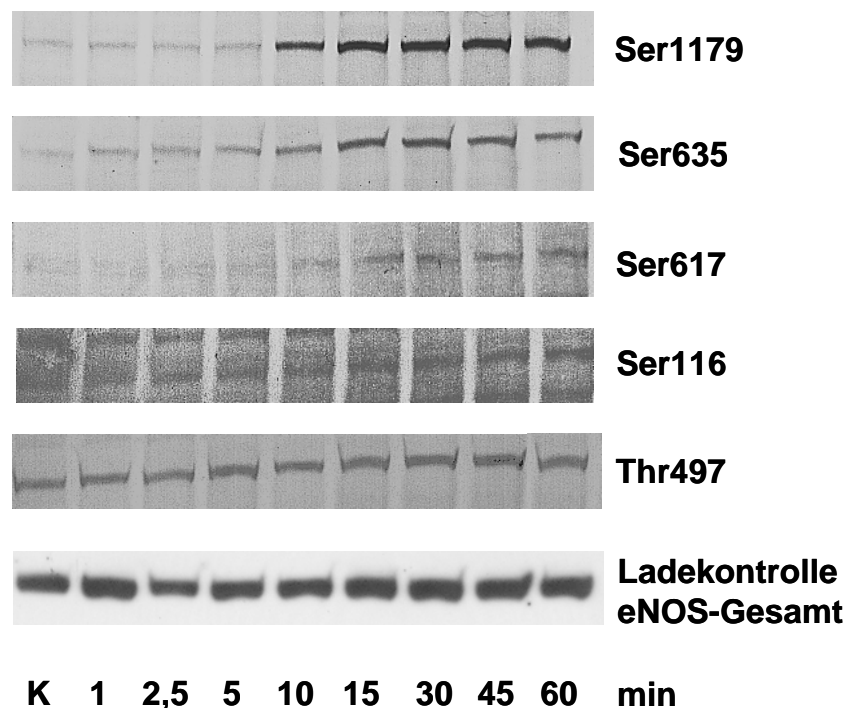
**Abb.4: Zeitabhängige Steigerung der EGCG-induzierten eNOS-Aktivität.** eNOS-Aktivitätstest nach Stimulation von BAEC mit 100 µM EGCG für 1 min, 2,5 min, 5 min, 10 min und 15 min. Ein Teil der BAEC wurden für 30 min mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Ly 294002 vorbehandelt. Als Kontrolle dienten unstimulierte BAEC. Die eNOS-Aktivität ist in Prozent der Kontrolle dargestellt, gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n= 3).



Anhand der Ergebnisse des eNOS-Aktivitätstests mit unterschiedlichen Stimulationszeiten von EGCG wird deutlich, dass schon nach sehr kurzer Stimulationsdauer von ein bis zweieinhalb Minuten durch EGCG eine Steigerung der eNOS-Aktivität erfolgte. Durch den PI3-Kinase-Inhibitor Ly 294002 wird die EGCG-stimulierte eNOS-Aktivität vollständig verhindert.

Die sehr schnelle eNOS-Aktivierung durch EGCG lässt auf eine posttranslationale Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung schließen. Die eNOS ist ein Enzym mit fünf Phosphorylierungsstellen, Ser1179, Ser635, Ser617, Ser116 und Thr497.

Zur Untersuchung des Mechanismus der schnellen eNOS-Aktivierung durch EGCG wurden BAEC in EGM-Medium kultiviert und für die dargestellten Zeiträume mit EGCG in EGM-Medium stimuliert. Anschließend wurden sie lysiert und aus den gewonnenen Proteinextrakten wurden für die genannten fünf Phosphorylierungsstellen der eNOS phosphospezifische Western Blots angefertigt (Abbildung 5).

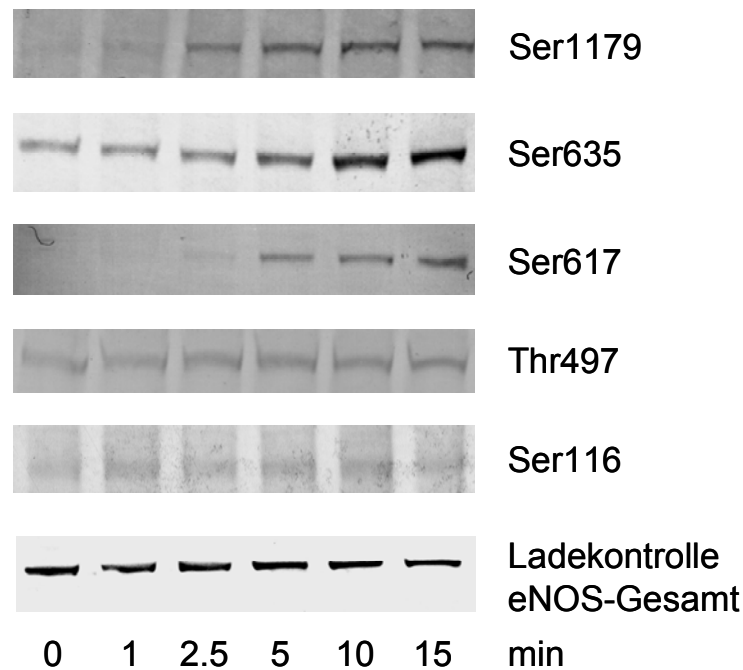


**Abb. 5: Expression der zeitabhängigen eNOS-Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation in BAEC im Western Blot.** Darstellung der eNOS-Phosphorylierung in Proteinextrakten an den eNOS-Phosphorylierungsstellen Ser1179, Ser635, Ser617, Ser116 und Thr497 nach Stimulation der BAEC zu den angegebenen Zeiten mit EGCG (100  $\mu$ M) in EGM-Medium.

Wie im Western Blot verdeutlicht, liegt bereits nach kurzer Stimulationsdauer mit EGCG eine Phosphorylierung der eNOS an verschiedenen Phosphorylierungsstellen vor. An der Phosphorylierungsstelle Ser1179 ist nach zehn Minuten Stimulation die Phosphorylierung durch eine deutliche Bande zu erkennen, an den beiden Phosphorylierungsstellen Ser635 und Ser617 sind nach fünfzehn Minuten Stimulation deutliche Banden zu beobachten. An den Stellen Ser116 und Thr497 wird zu keinem Zeitpunkt eine Phosphorylierung induziert. Allerdings liegen die Zeiten für eine Induktion der eNOS-Phosphorylierung deutlich höher als für die eNOS-Aktivierung.

### **3.1.2 Optimierung der Versuchsbedingungen des Western Blot und Einfluss von L-Arginin auf die eNOS-Phosphorylierung**

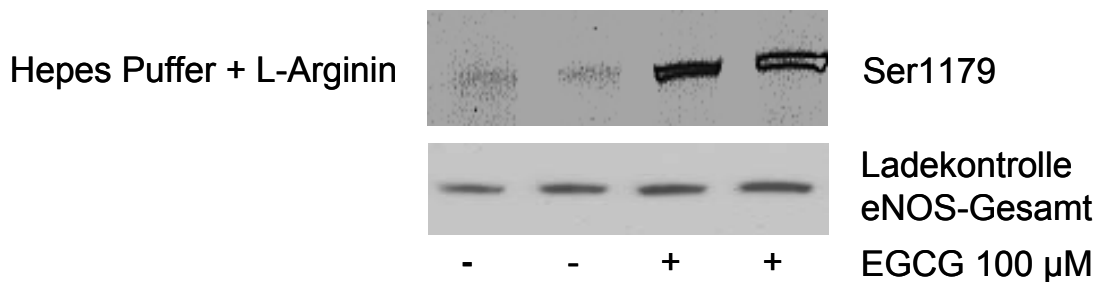
Um die Versuchsbedingungen der Zellbehandlungen für den Western Blot an die des eNOS-Aktivitätstests anzugleichen, wurden die BAEC bis zur Konfluenz in EGM-Medium kultiviert, dann aber wie für den eNOS-Aktivitätstest auf HEPES-Puffer umgesetzt und in diesem mit EGCG für die verschiedenen Zeiträume stimuliert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung zu Proteinextrakten, welche in phosphospezifischen Western Blots analysiert wurden (Abbildung 6). Unter diesen veränderten Versuchsbedingungen erfolgt schon nach einer kürzeren EGCG-Stimulation eine Phosphorylierung der eNOS.



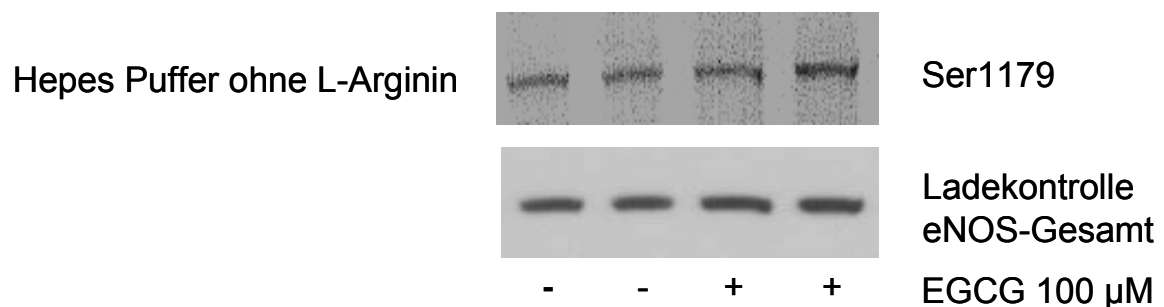
**Abb.6: Induktion der eNOS-Phosphorylierung durch EGCG in BAEC im HEPES-Puffer.** Darstellung der eNOS-Phosphorylierung im Western Blot an den Phosphorylierungsstellen Ser1179, Ser635, Ser617, Ser1116 und Thr497 der eNOS nach der angegebenen Stimulationsdauer mit EGCG (100  $\mu$ M) in HEPES-Puffer.

Die Phosphorylierung der einzelnen Phosphorylierungsstellen ist zeitlich unterschiedlich. Während an der Phosphorylierungsstelle Ser1179 schon nach zweieinhalb Minuten Stimulationsdauer mit EGCG eine Phosphorylierung induziert wird, ist an den Phosphorylierungsstellen Ser635 und Ser617 erst nach fünf Minuten Stimulationsdauer eine Bande zu erkennen. An den Phosphorylierungsstellen Ser1116 und Thr497 wird wiederum keine Phosphorylierung hervorgerufen. Hierbei fiel jedoch auf, dass nur nach Zusatz von L-Arginin in den HEPES-Puffer durch EGCG eine Phosphorylierung der eNOS induziert wurde. Exemplarisch ist in Abbildung 7 die Phosphorylierungsstelle Ser1179 dargestellt.

a)



b)



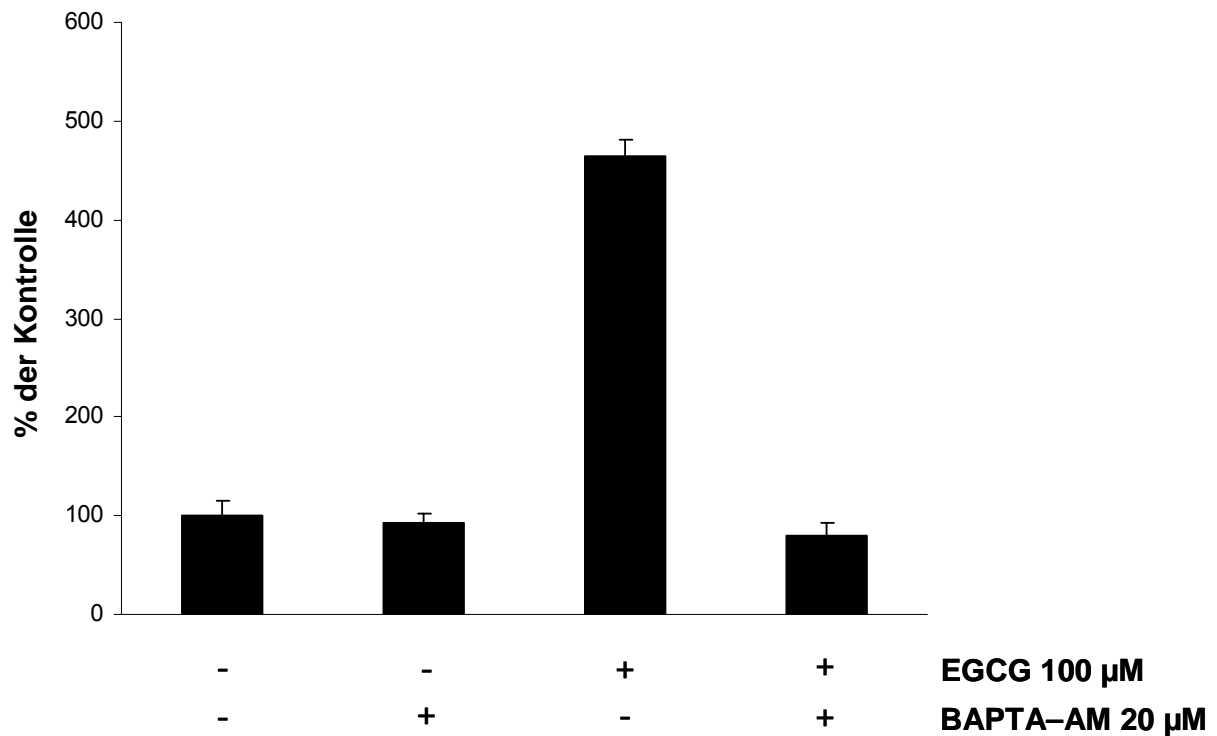
**Abb. 7: Einfluss von L-Arginin auf die eNOS-Phosphorylierung.** Western Blot mit Darstellung der eNOS-Phosphorylierung an der eNOS-Phosphorylierungsstelle Ser1179 nach Inkubation der BAEC in Hepes-Puffer plus L-Arginin und Stimulation mit EGCG (100 µM) für 15 min (a). Fehlende eNOS-Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser1179 nach Inkubation der BAEC in reinem Hepes-Puffer und 15-minütiger EGCG-Stimulation ohne L-Arginin (b).

### 3.2 Kalziumabhängigkeit der eNOS-Aktivierung und der eNOS-Phosphorylierung durch EGCG

Die eNOS liegt in den Endothelzellen als konstitutives Enzym vor und ist in ihrer Aktivität kalziumabhängig (FÖRSTERMANN et al. 1993). Zur Verifizierung der Frage, ob auch die EGCG induzierte Aktivierung und Phosphorylierung der eNOS von der Anwesenheit von Kalzium abhängig ist, wurden die folgenden Versuche durchgeführt. Dabei wurde zwischen dem Einfluss von intra- und extrazellulärem Kalzium unterschieden.

#### 3.2.1 Intrazellulärer Kalziumgehalt der Zelle und eNOS-Aktivierung

Zur Ermittlung der möglichen intrazellulären Kalziumabhängigkeit der eNOS-Aktivierung durch EGCG wurden konfluente BAEC mit BAPTA-AM (20 µM), einem intrazellulären Kalziumchelator, für 30 Minuten bei 37°C vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten mit EGCG stimuliert (Abbildung 8).



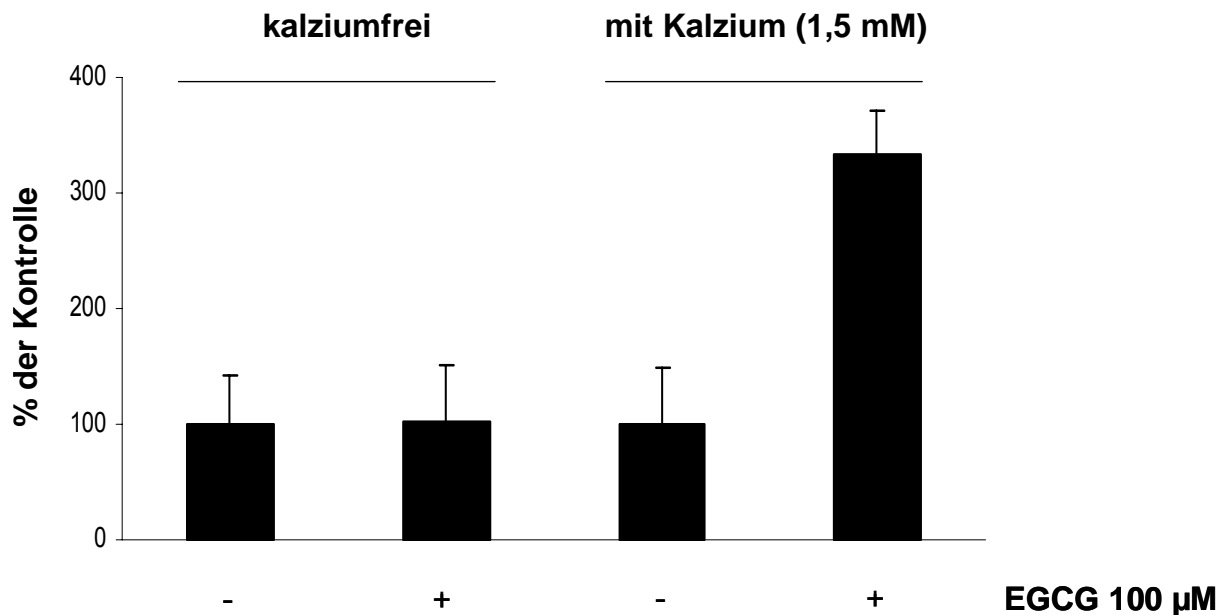
**Abb. 8: eNOS-Aktivitätstest** mit Darstellung der eNOS-Aktivität nach 30-minütiger Vorbehandlung der BAEC mit BAPTA-AM (20 µM), einem intrazellulären Kalziumchelator, und anschließender EGCG-Stimulation (100 µM) für 15 min. Die gemessene eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (n= 3).

Die durch EGCG hervorgerufene Steigerung der eNOS-Aktivität wird durch die Vorbehandlung mit BAPTA-AM vollständig verhindert.

Die eNOS-Aktivierung durch EGCG ist daher vom intrazellulären Kalziumgehalt der Zelle abhängig.

### 3.2.2 Einfluss des extrazellulären Kalziumgehaltes auf die eNOS-Aktivierung

Zur Feststellung des Einflusses von extrazellulärem Kalzium auf die eNOS-Aktivierung wurde auf den Zusatz von Kalzium zum Hepes-Puffer verzichtet. Die BAEC befanden sich so in einem kalziumfreien Milieu und konnten während der Stimulation mit EGCG kein Kalzium aus dem Puffer aufnehmen (Abbildung 9).



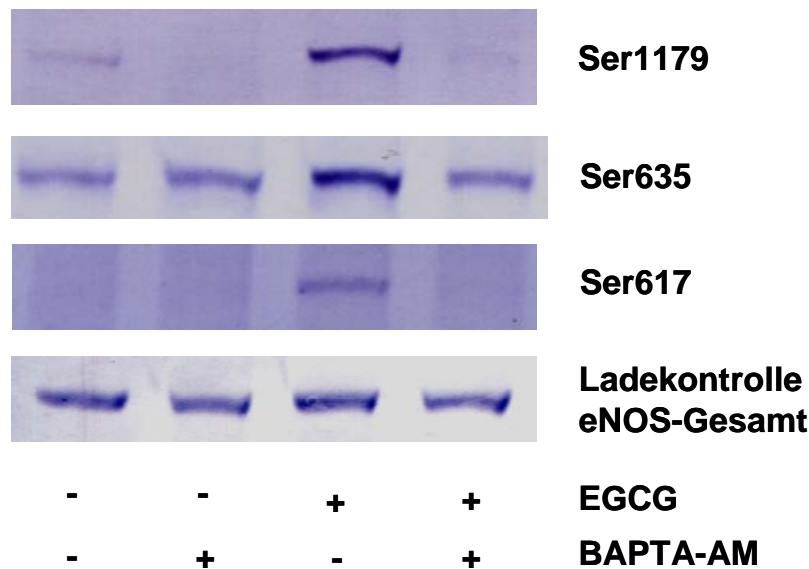
**Abb. 9: eNOS-Aktivitätstest mit Darstellung der eNOS-Aktivität nach Stimulation der BAEC mit EGCG (100 µM) für 15 min.** Es ist die Zellstimulation mit EGCG in kalziumfreiem oder kalziumhaltigem (1,5 mM) Hepes-Puffer gegenübergestellt. Die gemessene eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität ohne Behandlung mit EGCG dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  SEM (n= 3).

Bei BAEC, die in Hepes-Puffer plus Kalzium mit EGCG stimuliert wurden, erfolgte eine Steigerung der eNOS-Aktivität. Bei BAEC in kalziumfreiem Hepes-Puffer wurde durch EGCG keine eNOS-Aktivitätssteigerung induziert.

Zusammenfassend erfolgte die durch EGCG induzierte eNOS-Aktivierung nur in Anwesenheit von intra- und extrazellulärem Kalzium.

### 3.2.3 Kalziumeinfluss auf die eNOS-Phosphorylierung durch EGCG

Zur Untersuchung, ob ein Kalziumentzug auch die eNOS-Phosphorylierung verhindert, wurden BAEC mit dem Kalziumchelator BAPTA-AM (20 µM) für 30 Minuten bei 37°C vorbehandelt und anschließend für 15 min mit EGCG stimuliert. Aus den Proteinextrakten wurden phosphospezifische Westernblots angefertigt (Abbildung 10).



**Abb. 10: BAPTA-AM verhindert die EGCG-induzierte eNOS-Phosphorylierung.** Western Blot mit Darstellung der eNOS-Phosphorylierung an den eNOS-Phosphorylierungsstellen Ser1179, Ser635, Ser617 nach Vorbehandlung der BAEC mit dem Kalziumchelator BAPTA-AM (20  $\mu$ M) für 30 min und anschließender EGCG-Stimulation (100  $\mu$ M) für 15 min.

Die Vorbehandlung der BAEC mit dem Kalziumchelator BAPTA-AM verhindert die durch EGCG hervorgerufene Phosphorylierung der eNOS an allen drei untersuchten Phosphorylierungsstellen Ser1179, Ser635 und Ser617. Die EGCG-induzierte Phosphorylierung der eNOS ist somit ebenfalls kalziumabhängig.

### 3.3 Weitere am Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung beteiligte Kinasen

Von unserer Arbeitsgruppe wurde die Beteiligung der PI3-Kinase, der Akt-Kinase und der Proteinkinase A am Signaltransduktionsweg der eNOS durch EGCG nachgewiesen (LORENZ et al. 2004).

Zur Untersuchung weiterer möglicher beteiligter Kinasen wurden spezifische pharmakologische Inhibitoren eingesetzt. Diese Inhibitoren hemmen die Aktivität entsprechender Proteinkinasen und lassen durch veränderte Zellreaktionen auf deren potentielle Beteiligung schließen. Da die Inhibitoren schnell wirken, können indirekte Signalwege, wie Änderungen der Genexpression, ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung möglicher beteiligter Kinasen wurden konfluente BAEC vor der

EGCG-Stimulation für 30 Minuten bei 37°C mit spezifischen Inhibitoren vorbehandelt. Folgende am Signaltransduktionsweg der eNOS potentiell beteiligte Kinasen wurden untersucht:

Src-Kinase

CaMK

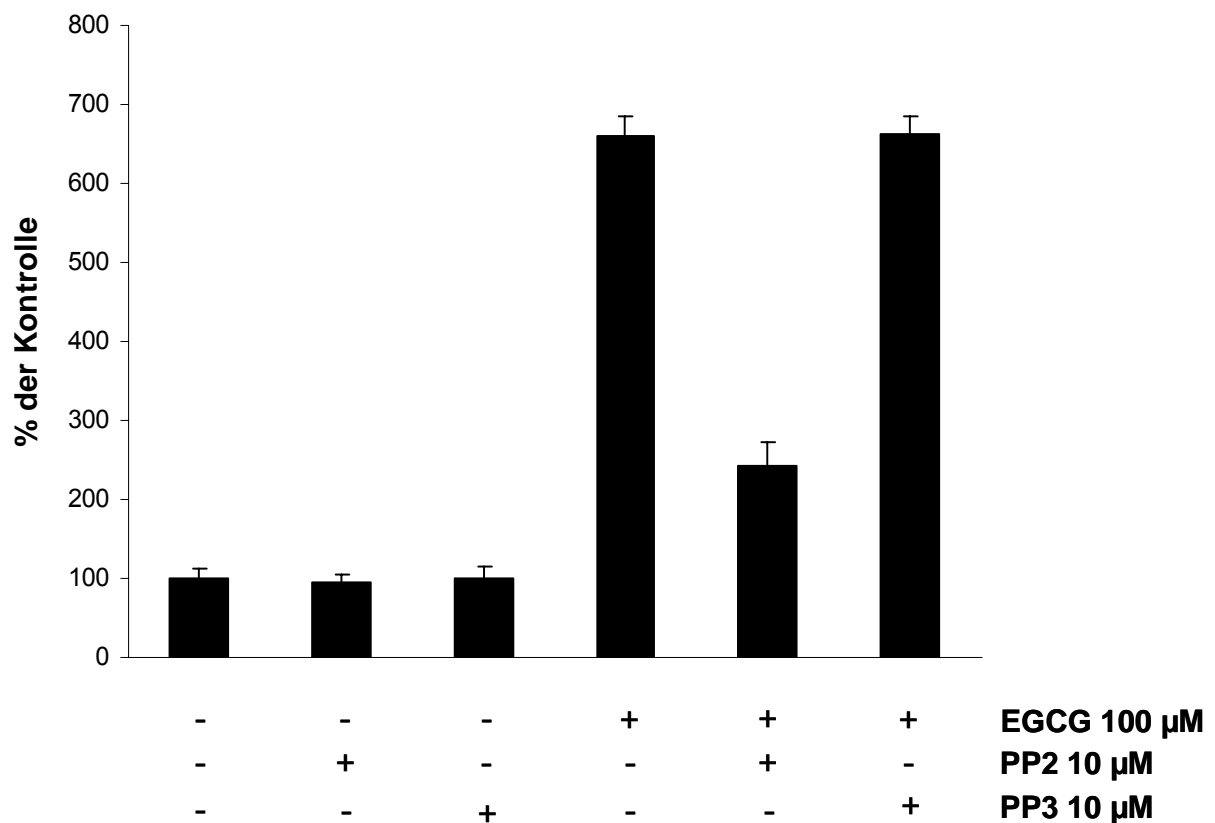
p38 MAPK

### **3.3.1 Einfluss der Src-Kinase auf die Aktivierung und Phosphorylierung der eNOS**

Bei der Src-Kinase handelt es sich um eine non-Rezeptor-Tyrosinkinase, die sich durch den Inhibitor PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo (3,4-d) pyrimidine) hemmen lässt. Bei Einsatz des Inhibitors PP2 zur Hemmung der Src-Kinase wird parallel PP3, eine strukturell ähnliche Substanz wie PP2 jedoch ohne Wirkung auf die Aktivität der Src-Kinase, eingesetzt.

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der Src-Kinase am Signaltransduktionsweg der eNOS durch EGCG wurden BAEC mit 10 µM PP2 bzw. PP3 für 30 min bei 37°C vorbehandelt und anschließend für 15 min im eNOS-Aktivitätstest mit EGCG stimuliert (Abbildung 11).



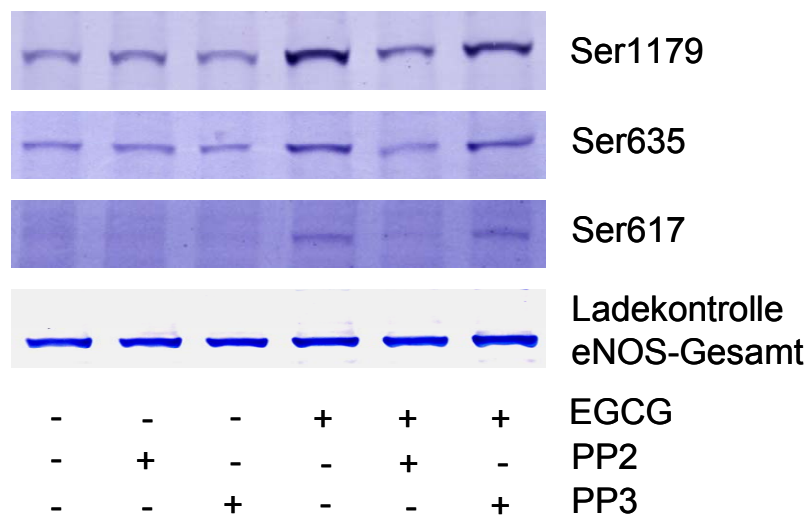


**Abb. 11: Einfluss der Src-Kinase auf die eNOS-Aktivierung.** eNOS-Aktivitätstest mit Darstellung der eNOS-Aktivität nach 30-minütiger Vorbehandlung der BAEC mit dem Inhibitor der Src-Kinase PP2 (10 µM) bzw. PP3 (10 µM) und anschließender EGCG-Stimulation (100 µM) für 15 min. Die gemessene eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität ohne Behandlung dargestellt. Mittelwerte ± SEM (n= 3).

Aus den Ergebnissen des eNOS-Aktivitätstests wird deutlich, dass die durch EGCG induzierte Steigerung der eNOS-Aktivität durch die Vorbehandlung mit 10 µM PP2 weitgehend verhindert werden kann. Durch die Vorbehandlung mit PP3 kommt es zu keiner Minderung der durch EGCG hervorgerufenen Steigerung der eNOS-Aktivität. Die alleinige Behandlung der Zellen mit 10 µM PP2, bzw. 10 µM PP3 hat keinen Effekt auf die eNOS-Aktivität.

Die Src-Kinase ist somit in den Signaltransduktionsweg der eNOS-Stimulierung durch EGCG involviert.

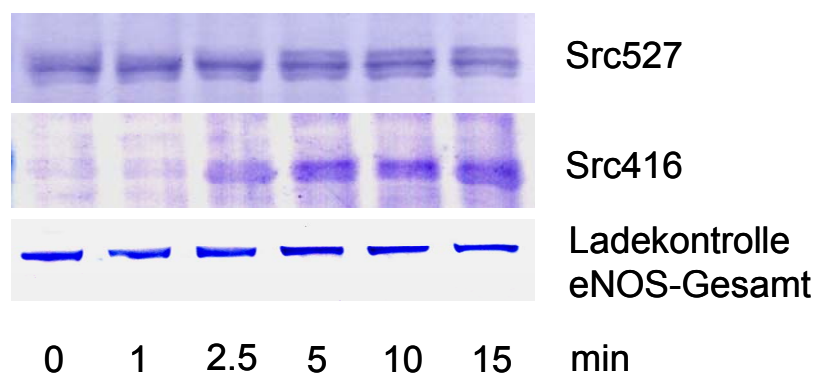
Zur Ermittlung des Einfluss der Src-Kinase auf die eNOS-Phosphorylierung wurden Zellen mit 10 µM PP2 bzw. PP3 vorbehandelt und anschließend mit EGCG für 15 min stimuliert. Phosphospezifische Western Blots für die Phosphorylierungsstellen Ser1179, Ser 635 und Ser 617 der eNOS sind in Abbildung 12 dargestellt.



**Abb. 12: Einfluss der Src-Kinase auf die eNOS-Phosphorylierung.** Western Blot mit Darstellung der eNOS-Phosphorylierung an den eNOS-Phosphorylierungsstellen Ser1179, Ser635, Ser617 nach Vorbehandlung der BAEC mit PP2 (10  $\mu$ M) als Inhibitor der Src-Kinase bzw. PP3 (10  $\mu$ M) für 30 min und anschließender 15-minütiger EGCG-Stimulation (100  $\mu$ M).

An den Phosphorylierungsstellen Ser1179, Ser635 und Ser617 der eNOS verhinderte 10  $\mu$ M PP2 die durch EGCG-Stimulation induzierten Banden, wohingegen 10  $\mu$ M PP3 keinen Einfluss hatte. Die Src-Kinase ist somit in den Aktivierungsweg der eNOS durch EGCG involviert.

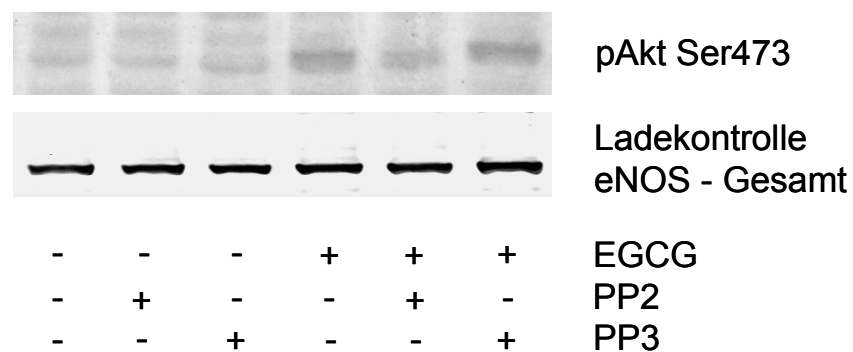
Der Phosphorylierungsstatus der Src-Kinase selbst ist in Abbildung 13 gezeigt.



**Abb. 13: EGCG-induzierte Phosphorylierung der Src-Kinase.** Western Blot mit Darstellung der Src-Phosphorylierung an den Phosphorylierungsstellen Src416 und Src527 nach Stimulation der BAEC mit EGCG (100  $\mu$ M) für 1 min, 2,5 min, 5 min, 10 min und 15 min.

Im phosphospezifischen Western Blot ist schon nach zweieinhalb Minuten EGCG-Stimulation eine deutliche Bande an der Src-Phosphorylierungsstelle Src416 erkennbar, nicht aber an der Phosphorylierungsstelle Src527. Die Src-Kinase ist bereits nach kurzer EGCG-Stimulation phosphoryliert, damit aktiviert und am Signaltransduktionsweg, der zur eNOS-Phosphorylierung durch EGCG führt, beteiligt.

Zur Untersuchung der Position der Src-Kinase im Signaltransduktionsweg der eNOS durch EGCG wurde der Phosphorylierungsstatus der Akt-Kinase im phosphospezifischen Western Blot untersucht. Abbildung 14 zeigt die Phosphorylierung der Akt-Kinase in BAEC, die mit 10 µM PP2 bzw. 10 µM PP3 vorbehandelt und für 15 min mit EGCG stimuliert wurden.



**Abb. 14: Phosphorylierung der Akt-Kinase.** Western Blot mit Darstellung der EGCG-induzierten Akt-Phosphorylierung (Stimulation mit 100 µM für 15 min) an der Ser473-Phosphorylierungsstelle der Akt-Kinase und Einfluss 30-minütiger Vorbehandlung der BAEC mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 (10 µM) bzw. PP3 (10 µM).

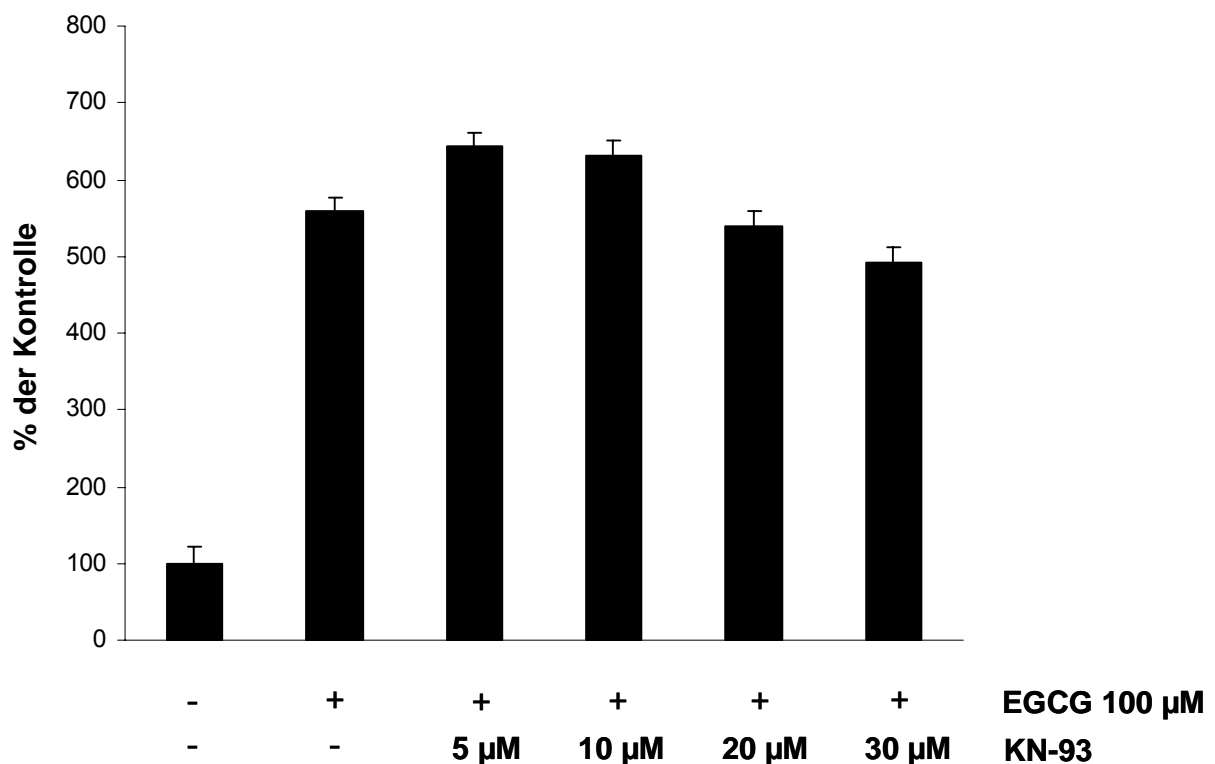
An der Phosphorylierungsstelle der Akt-Kinase ist nach Stimulation der BAEC mit EGCG eine deutliche Bande zu erkennen. PP2 verhindert jedoch die EGCG-induzierte Akt-Phosphorylierung.

### 3.3.2 Untersuchung der Kalzium-Calmodulin Kinase (CaMK)

In die Untersuchungen weiterer möglicher Kinasen im Signaltransduktionsweg der eNOS wurde die CaMK einbezogen. Bei der CaMK handelt es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase. Sie erhielt ihren Namen aufgrund ihrer Sensitivität für Kal-

zium/Calmodulin. Sie wird durch den pharmakologischen Inhibitor KN-93 inhibiert (Cai et al. 2008).

Zur Untersuchung des Einflusses der CaMK am Signaltransduktionsweg der eNOS wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors KN-93 der CaMK (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M ) für 30 Minuten bei 37°C vorbehandelt und anschließend für 15 Minuten mit EGCG im eNOS–Aktivitätstest stimuliert (Abbildung 15).

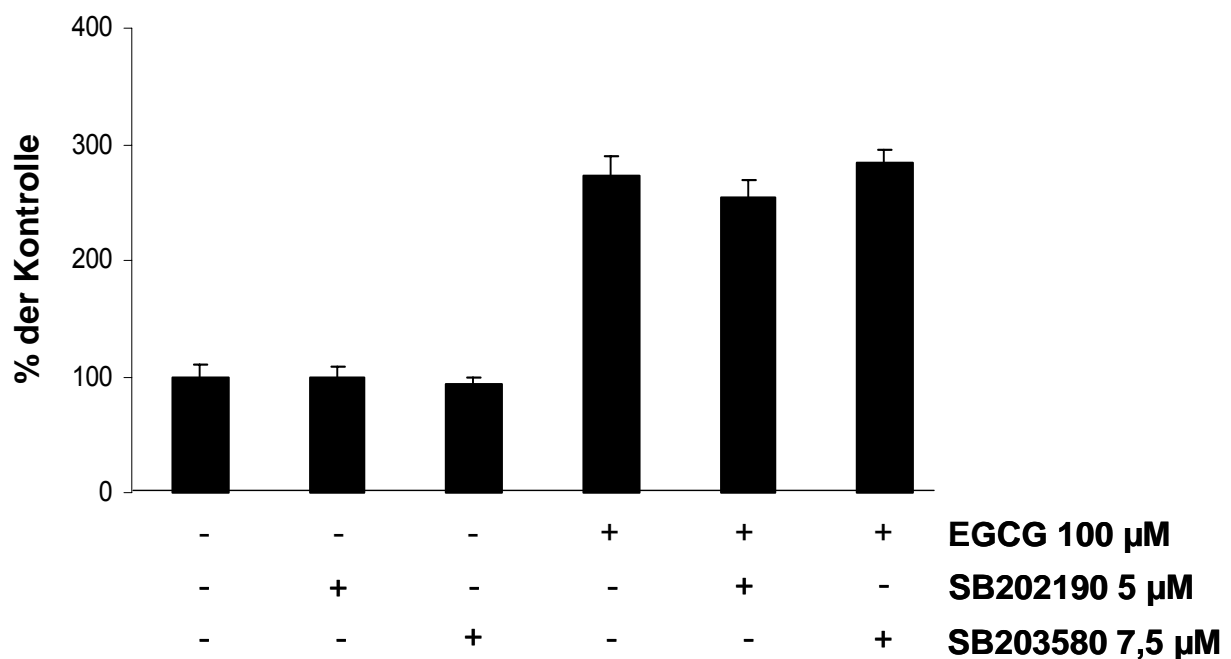


**Abb. 15: Wirkung von KN-93 auf die EGCG-induzierte eNOS-Aktivität.** eNOS-Aktivitätstest mit Darstellung der eNOS-Aktivität nach Vorbehandlung der BAEC mit dem Inhibitor KN-93 der CaMK in steigenden Konzentrationen (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) für 30 min und anschließender EGCG-Stimulation (100  $\mu$ M) für 15 min. Die gemessene eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität ohne Vorbehandlung durch EGCG oder KN-93 dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  SEM (n= 3).

Der Inhibitor KN-93 führte in den eingesetzten Konzentrationen zu keiner signifikanten Verminderung der eNOS-Aktivierung. Die CaMK scheint nicht am Signaltransduktionsweg der eNOS durch EGCG beteiligt zu sein. Es wurden deshalb keine weiteren Versuche zur Untersuchung der eNOS–Phosphorylierung durch die CaMK durchgeführt.

### 3.3.3 Untersuchung der p38 MAPK

Die p38 MAPK ist unter anderem am Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung durch Polyphenole, die in Schwarzem Tee enthalten sind, beteiligt (ANTER et al. 2004). Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der p38 MAPK am Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung durch EGCG wurden Zellen mit den beiden Inhibitoren der p38 MAPK SB202190 und SB203580 in verschiedenen Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$  und 7,5  $\mu\text{M}$ ) für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend im eNOS-Aktivitätstest mit EGCG stimuliert (Abbildung 16).



**Abb. 16: Fehlender Einfluss der p38 MAPK-Inhibitoren auf die EGCG-induzierte eNOS-Aktivierung.** eNOS-Aktivitätstest mit Darstellung der eNOS-Aktivität nach 30-minütiger Vorbehandlung der BAEC mit den Inhibitoren der p38 MAPK SB202190 (5  $\mu\text{M}$ ) und SB203580 (7,5  $\mu\text{M}$ ) und anschließender EGCG-Stimulation (100  $\mu\text{M}$ ) für 15 min. Die eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität der Kontrolle angegeben. Mittelwerte  $\pm$  SEM (n= 3).

Auch in höheren Konzentrationen als bei Versuchen mit Schwarzem Tee eingesetzt, erfolgt durch beide Inhibitoren der p38 MAPK keine Senkung der durch EGCG hervorgerufenen eNOS-Aktivität. Dargestellt sind hier exemplarisch Versuche mit Inhibitor-Konzentrationen, welche eine durch Schwarzen Tee induzierte eNOS-Aktivierung ver-

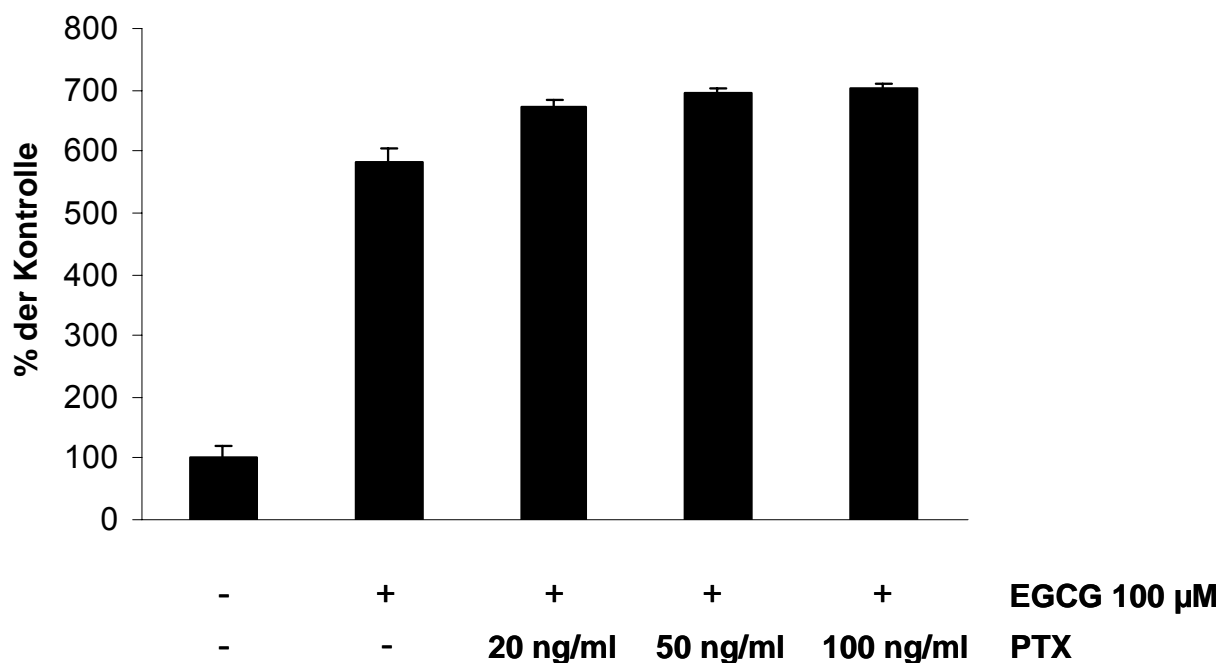
hinderten (ANTER et al. 2004). Die p38 MAPK scheint nicht in den Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung durch EGCG involviert zu sein. Es erfolgten deshalb keine weiteren Versuche zur Untersuchung der eNOS-Phosphorylierung durch die p38 MAPK. Diese Ergebnisse lassen auf unterschiedliche Mechanismen der eNOS-Aktivierung für Schwarzen und Grünen Tee schließen.

### 3.4 Beteiligung möglicher Rezeptoren an der eNOS-Aktivierung durch EGCG

#### 3.4.1 Untersuchung G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Untersuchung G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelter Rezeptoren erfolgte durch den Einsatz von Pertussis Toxin (PTX). PTX katalysiert die Ribosylierung der G<sub>i</sub>-Proteine und führt zur Runterregulation der an die G-Proteine gekoppelten Rezeptoren. Eine mögliche rezeptorvermittelte Signalübertragung wird damit verhindert (COTTON UND CLAING 2009).

Konfluente BAEC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) von Pertussis Toxin für 24 Stunden behandelt und anschließend im eNOS-Aktivitätstest für 15 Minuten mit EGCG stimuliert (Abbildung 17).



**Abb. 17: PTX verhindert nicht die EGCG-induzierte eNOS-Aktivierung.** Vorbehandlung der BAEC mit 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml PTX für 24 Stunden, anschließende EGCG-Stimulation (100 μM) für 15 min im eNOS-Aktivitätstest. Die gemessene eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität ohne Vorbehandlung durch PTX oder EGCG dargestellt. Mittelwerte ± SEM (n= 3).

Unabhängig von der eingesetzten Konzentration hatte PTX keinen Einfluss auf die durch EGCG hervorgerufene Aktivitätssteigerung der eNOS. G<sub>i</sub>-Proteine und damit gekoppelte Rezeptoren scheinen nicht an der durch EGCG vermittelten Aktivierung der eNOS beteiligt zu sein.

Durch Einsatz eines allgemeinen Inhibitors aller Subgruppen der G-Proteine, GDP-β-S, konnte die Beteiligung von G-Proteinen insgesamt an der Signalübertragung durch EGCG ausgeschlossen werden (Daten nicht dargestellt).

### 3.5 Relaxationsversuche an Rattenaortenringen

#### 3.5.1 EGCG-Konzentrationsreihe

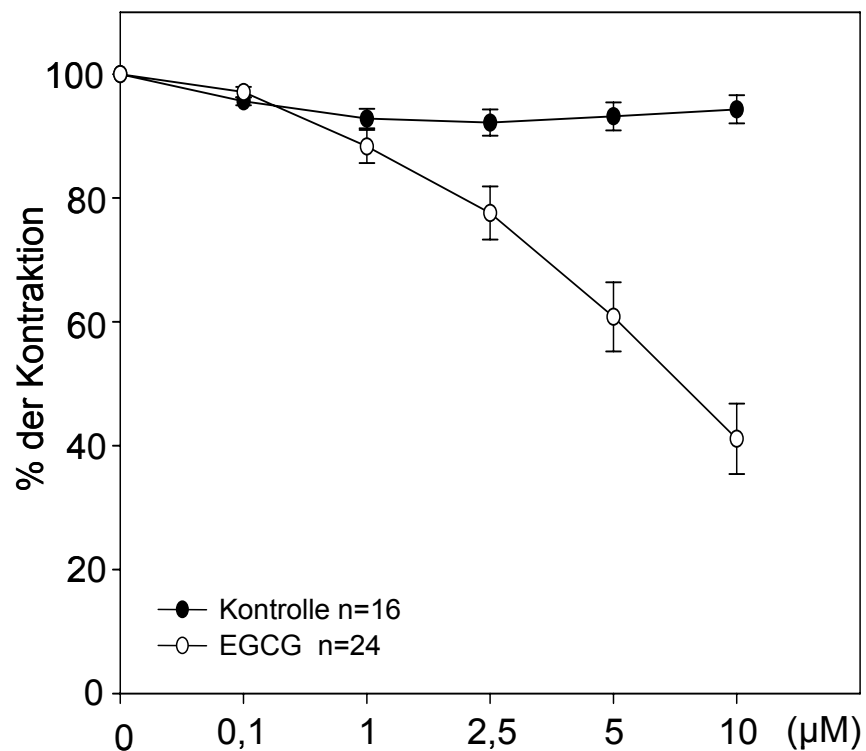
Die Steigerung der eNOS-Aktivität in BAEC erfolgt dosisabhängig. Bei einer Stimulation der Zellen mit 50 μM EGCG ist die Aktivität auf das Doppelte des Basalwertes gestiegen, bei einer Stimulation mit 100 μM EGCG bereits auf das Vierfache (LORENZ et al. 2004). Bei den Zellkulturversuchen wurden stets hohe EGCG-Konzentrationen von 100 μM eingesetzt. Dabei konnten eindeutige Ergebnisse erzielt und die sichersten Aussagen über die Effekte von EGCG sowie verschiedener Inhibitoren auf die Aktivierung der eNOS getroffen werden.

Diese in der Zellkultur eingesetzte EGCG-Konzentration ist um das 100-fache höher, als sie physiologisch nach Teegenuss im humanen Plasma vorliegt. Die Plasma-EGCG-Konzentration nach Genuss von Grünem Tee liegt bei ca. 1 μM (VAN HET HOF et al. 1999). Da die EGCG-Effekte in der hohen Konzentration der Zellkultur physiologisch wenig aussagekräftig sind, haben wir Relaxationsversuche an Rattenaortenringen mit wesentlich niedrigeren Konzentrationen von EGCG durchgeführt. Ziel dieser Versuche war, eine Aussage über die Effekte von EGCG in physiologisch relevanten Konzentrationen machen zu können.

In den bereits publizierten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die nach kumulativer EGCG-Gabe einsetzende Vasorelaxation der Rattenaortenringe nach initialer kurzfristiger Kontraktion dosisabhängig erfolgt und signifikant ab einer EGCG-Konzentration von 10 μM ist (LORENZ et al. 2004).

In Versuchen zur genaueren Untersuchung des physiologisch relevanten EGCG-Konzentrationsbereichs bei der Vasorelaxation der Rattenaortenringe wurde mit

EGCG-Dosen von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  stimuliert (Abbildung 18).



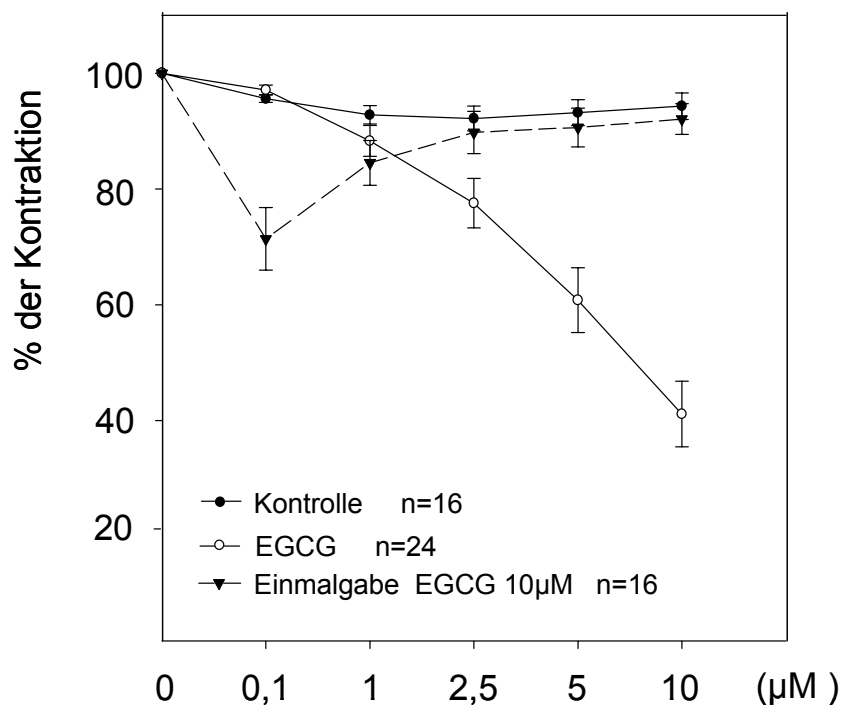
**Abb. 18: EGCG-Effekt auf mit Phenylephrin vorkontrahierte Rattenaortenringe.** Darstellung der Rattenaortenrelaxation bei kumulativer EGCG-Gabe von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  EGCG im Zeitintervall von je 30 min. Als Kontrolle dienten mit Phenylephrin vorkontrahierte unbehandelte Rattenaortenringe. Die Vasorelaxation ist als prozentualer Anteil der durch die Vorbehandlung mit Phenylephrin induzierten Kontraktion der Aortenringe dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  SEM (Kontrolle n= 16, EGCG n= 24 Ringe).

In Abbildung 18 wird der Bereich des Relaxationsverhaltens der Rattenaortenringe nach Stimulation mit geringen EGCG-Dosen zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  gezeigt. Die Aortenringe weisen bereits bei einer EGCG-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , also der physiologischen EGCG-Konzentration im Plasma nach Genuss von Grünem Tee, eine leichte Vasodilatation auf und sind bei einer EGCG-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu 60% relaxiert.



### 3.5.2 Zeitlicher Ablauf des Relaxationsverhaltens der Rattenaortenringe nach Einmalgabe von EGCG

Wie unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte, bleibt die Phosphorylierung der eNOS in der Zellkultur bis zu sechs Stunden nach Einmalgabe von EGCG aufrechterhalten (LORENZ et al. 2004). Um die Korrelation zwischen dem Relaxationsverhalten der Aortenringe und einer zeitlichen Phosphorylierung zu analysieren, wurden die Aortenringe mit einer Einmalgabe von 10  $\mu\text{M}$  EGCG behandelt und anschließend das Relaxationsverhalten verfolgt (Abbildung 19). Vergleichend ist die Relaxation der Aortenringe bei kumulativer EGCG-Gabe in 30-minütigem Abstand dargestellt.



**Abb. 19: EGCG-induzierte Vasorelaxation an Rattenaortenringen.** Darstellung des Relaxationsverhaltens von mit Phenylephrin vorkontrahierten Rattenaortenringen nach einmaliger EGCG-Gabe (10  $\mu\text{M}$ ) über 2,5 Stunden und Darstellung des Relaxationsverhaltens der Rattenaortenringe bei kumulativer EGCG-Gabe von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  im Abstand von je 30 Minuten. Als Kontrolle dienen mit Phenylephrin kontrahierte Rattenaortenringe ohne EGCG-Stimulation. Vergleichend ist die Wirkung der kumulativen EGCG-Gabe, wie in Abb. 18 dargestellt, abgebildet. Die Vasodilatation ist als prozentualer Anteil der Phenylephrin-induzierten Kontraktion der Rattenaortenringe dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  SEM (Kontrolle n= 16, Einmalgabe EGCG n= 16, kumulative EGCG-Gabe n= 24).

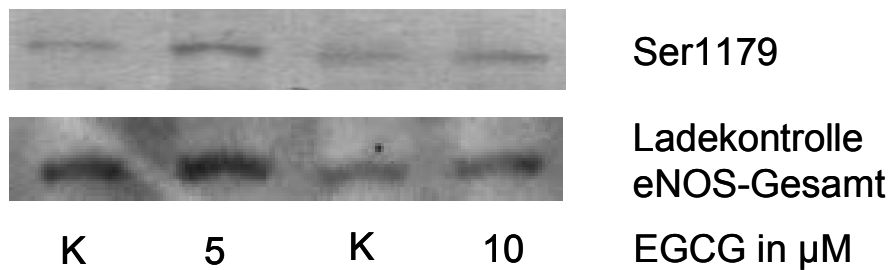
Wie in Abbildung 19 gezeigt, erfolgt nach einmaliger Gabe von 10  $\mu\text{M}$  EGCG eine Relaxation der Aortenringe um etwa 35% der Vorkontraktion. Die Vasodilatation durch eine Einmalgabe von 10  $\mu\text{M}$  EGCG ist damit geringer als die kumulative Gabe von 10  $\mu\text{M}$  EGCG. Die maximale Relaxation nach der EGCG-Einmalgabe wird nach einer halben Stunde erreicht. Diese Relaxation bleibt jedoch nicht wie die Phosphorylierung der eNOS in der Zellkultur bis zu sechs Stunden aufrecht erhalten, sondern ist reversibel und nach etwa zweieinhalb Stunden ist die Ausgangskontraktion erreicht. Das Relaxationsverhalten der Aortenringe korreliert zeitlich nicht mit einer langfristigen Phosphorylierung der eNOS.

### **3.6 Mechanismen der EGCG-induzierten Relaxation von Rattenaortenringen**

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der Relaxation wurden die Aortenringe im Western Blot auf Phosphorylierungen der eNOS untersucht. So können mögliche Gemeinsamkeiten molekularer Mechanismen der eNOS-Aktivierung in der Zellkultur und der Relaxationsversuche an Rattenaortenringen gezeigt werden.

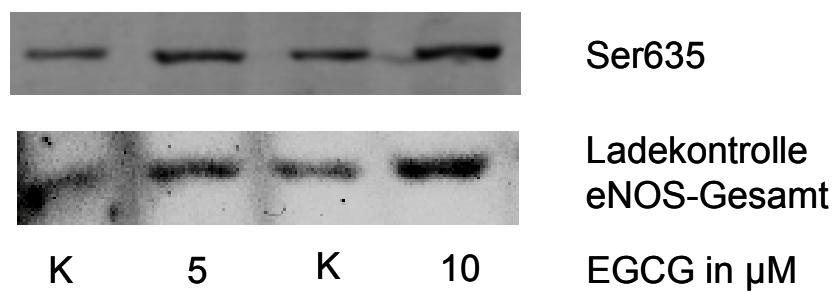
#### **3.6.1 eNOS-Phosphorylierung durch EGCG an Rattenaortenringen**

Zur Klärung der Mechanismen der EGCG-induzierten Vasorelaxation wurden die Rattenaortenringe im Organbad mit EGCG stimuliert, nach 30 Minuten bei maximal erreichter Relaxierung aus dem Organbad entfernt und zu Proteinextrakten aufgearbeitet. Es folgten phosphospezifische Western Blots für die eNOS-Phosphorylierungsstellen Ser1179 (Abbildung 20) und Ser635 (Abbildung 21). Bei diesen Versuchen wurden niedrige EGCG-Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt, um nahezu physiologische Konzentrationen zu untersuchen.



**Abb. 20: Western Blot der eNOS-Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser1179 aus Proteinextrakten von mit 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  EGCG behandelten Rattenaortenringen.**

Als Kontrolle (K) dienten Proteinextrakte von unbehandelten Rattenaortenringen nach 30 Minuten im Organbad.



**Abb. 21: Western Blot der eNOS-Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Ser635 aus Proteinextrakten von mit 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  EGCG behandelten Rattenaortenringen.**

Als Kontrolle (K) dienten Proteinextrakte von unbehandelten Rattenaortenringen nach 30 Minuten im Organbad.

Sowohl an der Phosphorylierungsstelle Ser1179, als auch an der Phosphorylierungsstelle Ser635 wird bei 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  EGCG eine eNOS-Phosphorylierung in den Aortenringen induziert. Diese Konzentrationen sind im Vergleich zur Zellkultur wesentlich niedriger.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zeitabhängige eNOS-Aktivierung und eNOS-Phosphorylierung in Endothelzellen

Die vorliegende Studie analysierte grundlegende Mechanismen der eNOS-Aktivierung durch das Teekatechin EGCG. Es ist bereits bekannt, dass die EGCG-induzierte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase in Endothelzellen über einen PI3-Kinase, PKA und Akt-abhängigen Signalweg erfolgt, welcher zur Phosphorylierung der eNOS führt.

Die bereits nach ein bis zweieinhalb Minuten einsetzende eNOS-Aktivierung durch EGCG lässt auf eine posttranslationale Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung schließen. Die eNOS ist ein homodimeres Enzym mit fünf gut untersuchten Phosphorylierungsstellen: Ser1179, Ser635, Ser617, Ser116 und Thr497.

Von diesen Phosphorylierungsstellen zeigten Ser1179, Ser635 und Ser617 im Western Blot nach kurzer EGCG-Stimulation eine Phosphorylierung. Der Zeitpunkt der beginnenden eNOS-Aktivierung stimmte zeitlich mit der Phosphorylierung überein.

Auch Kim et al. haben die zeitabhängige eNOS-Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation im Western Blot untersucht. In ihren Versuchen zeigten sich jedoch erst nach 15 Minuten Stimulationszeit deutliche Banden an der Phosphorylierungsstelle Ser1179. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen. In den Versuchen von Kim et al. wurden die Endothelzellen über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert, dann mit Inhibitoren vorbehandelt und mit EGCG stimuliert (KIM et al. 2007). Im Unterschied dazu wurden bei unseren Experimenten die BAEC bis zum Versuchsbeginn in Vollmedium kultiviert, die Stimulation erfolgte aber bei uns in Hapes-Puffer.

Auch für andere Stimuli der eNOS-Aktivierung, wie z.B. Grapefruitsaft, Thrombin oder Bradykinin konnte eine teils noch schnellere Aktivierung der eNOS innerhalb einer Minute gezeigt werden (ANSELM et al. 2007, MOTLEY et al. 2007, BAE et al. 2003). Im Gegensatz dazu wurde für andere Substanzen, wie Hydrogen Peroxid oder Testosteron erst eine spätere eNOS-Aktivierung beschrieben (THOMAS et al. 2001, YU et al. 2010). Es scheint demnach eine Stimulierungsabfolge zu existieren.

#### **4.2 Zeitliches Zusammenspiel von Kinasen und anderen zellulären Mediatoren bei den endothelzellspezifischen Effekten von EGCG auf die eNOS**

Bei der eNOS-Aktivierung spielen intra- und extrazelluläre Kalziuminteraktionen eine entscheidende Rolle. Um die Kalziumabhängigkeit der EGCG-induzierten eNOS-Aktivierung zu überprüfen, wurde der intrazelluläre Kalziumchelator BAPTA-AM eingesetzt. Dieser verhinderte vollständig die durch EGCG induzierte eNOS-Aktivierung. Die Steigerung der eNOS-Aktivität erfolgt nur in Anwesenheit von intrazellulärem Kalzium. Der Entzug von extrazellulärem Kalzium verhindert ebenfalls einen Anstieg der eNOS-Aktivität nach EGCG-Stimulation.

Anhand phosphospezifischer Western Blots konnte gezeigt werden, dass sowohl die eNOS-Aktivierung als auch die eNOS-Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation von der Anwesenheit von Kalzium abhängig sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die eNOS-Aktivierung nach EGCG-Stimulation die Anwesenheit von intrazellulärem und extrazellulärem Kalzium essentiell ist.

Das jeweils stimulierende Agens scheint jedoch die Kalziumabhängigkeit der eNOS-Aktivierung zu bestimmen. Montagnani et al. haben in ihren Studien zeigen können, dass die Aktivierung der eNOS nach Stimulation durch Insulin, die ebenfalls über die Phosphorylierung der Akt-Kinase erfolgt, unabhängig von Kalzium ist (MONTAGNANI et al. 2001).

Motley et al. hingegen haben die Mechanismen der eNOS-Aktivierung und -Phosphorylierung durch Thrombin untersucht. Sie sind zu dem Ergebnis gekommen, dass für die eNOS-Aktivierung und -Phosphorylierung nach Stimulation durch Thrombin sowohl der intrazelluläre Kalziumgehalt, als auch der Influx von extrazellulärem Kalzium benötigt werden. Allerdings erfolgte dabei die eNOS-Regulation nicht über einen PI3-Kinase/Akt-abhängigen Weg, sondern über Proteinkinase C (PKC) (MOTLEY et al. 2007).

Um die Zeitkinetik der eNOS-Phosphorylierung und eNOS-Aktivität vergleichen zu können, wurden die Versuchsbedingungen durch Angleichung der Zellkulturmedien angepasst. Während in den ersten Versuchsreihen eine eNOS-Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation in EGM-Medium induziert wurde, war sie nach EGCG-Stimulation in Hepes-Puffer nur nach L-Arginin-Zusatz nachweisbar. Damit kann auf eine L-Arginin-Abhängigkeit der eNOS-Phosphorylierung geschlossen werden. Da L-Arginin in jedem

Zellkulturmedium enthalten ist, muss es nicht zusätzlich hinzugefügt werden.

Der Einfluss weiterer am Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung durch EGCG beteiligter Kinasen wurde in verschiedenen Versuchsreihen analysiert.

Haynes et al. konnten nachweisen, dass die estrogeninduzierte eNOS-Aktivierung über die PI3-Kinase und Akt erfolgt (HAYNES et al. 2000). Die gleiche Arbeitsgruppe fand, dass die Src-Kinase in der estrogeninduzierten eNOS-Aktivierung oberhalb der PI3-Kinase und Akt liegt (HAYNES et al. 2003).

In Anlehnung an diese Ergebnisse und in Anbetracht der bis dahin vorliegenden Ähnlichkeiten des Signaltransduktionsweges der eNOS-Aktivierung durch Estrogen und EGCG, begannen wir die Aufklärung der eNOS-Aktivierung durch EGCG mit der Untersuchung der Src-Kinase.

Durch Src-Kinase-Inhibition ließ sich eine Aktivitätssteigerung der eNOS nach EGCG-Stimulation verhindern. Daraus ergibt sich die Beteiligung der Src-Kinase an der eNOS-Aktivierung durch EGCG. Die phosphospezifischen Western Blots zeigten, dass auch die eNOS-Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation durch Src-Kinase-Inhibition vollständig verhindert wird. Die Src-Kinase selbst wird, wie wir in den Western Blots zeigten, ebenfalls nach EGCG-Stimulation durch Phosphorylierung aktiviert. Sie ist demnach in die eNOS-Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation involviert.

Die Inhibition der Src-Kinase verhinderte auch die Phosphorylierung der Akt-Kinase. Die Src-Kinase ist im PI3-Kinase-/Akt-Signaltransduktionsweg der eNOS demnach oberhalb der Akt-Kinase lokalisiert.

Auch Kim et al. führten entsprechende Untersuchungen durch. Sie kamen zum Ergebnis, dass die Src-Kinase an der eNOS-Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation beteiligt ist. Es handelt sich um das Mitglied der Src-Kinasen-Familie Fyn, die oberhalb der PI3-Kinase im Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung durch EGCG gelegen ist (KIM et al. 2007). Es ist wahrscheinlich, dass noch weitere Kinasen, die oberhalb der Src-Kinase lokalisiert sind, beteiligt sind. Hier sollten weitere Untersuchungen folgen.

Kürzlich wurde eine weitere Phosphorylierungsstelle der eNOS identifiziert, Tyr83. Diese wird nach Stimulation durch verschiedene Agonisten, z. B. Östrogen, VEGF, Bradykinin oder Acetylcholin durch die Src-Kinase direkt phosphoryliert und führt zu einer Steigerung der eNOS-Aktivierung (FULTON et al. 2008). Auch EGCG könnte über eine Src-Kinase vermittelte direkte Tyr83-Phosphorylierung die eNOS-Aktivität steigern. Es

wäre im Weiteren sinnvoll, den Einfluss der EGCG-Stimulation auch auf diese Phosphorylierungsstelle näher zu untersuchen. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht erfolgen, da noch kein Antikörper für diese Phosphorylierungsstelle kommerziell verfügbar ist.

Weiterhin wurde die Beteiligung der CaMK am Signaltransduktionsweg der eNOS durch EGCG geprüft. Im Mechanismus der eNOS-Aktivierung kommt es nach Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels mit nachfolgender Dissoziation des Caveolin-1 und anschließender Bindung des Kalzium-Calmodulin-Komplexes an die eNOS zur katalytischen Aktivierung der eNOS (FLEMING UND BUSSE 2003). Bei der CaMK handelt es sich um eine Proteinkinase mit hoher Sensitivität für den Kalzium-Calmodulin-Komplex.

In den Versuchen dieser Arbeit zur möglichen Beteiligung der CaMK am Signaltransduktionsweg der eNOS wurde die EGCG-induzierte Steigerung der eNOS-Aktivität durch CaMK-Inhibition nicht beeinflusst. Die CaMK ist demnach höchstwahrscheinlich nicht in den Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung durch EGCG involviert.

In anderen Studien konnte hingegen gezeigt werden, dass die CaMK bei anderen Stimulantien wie Bradykinin oder Acetylcholin, die auch über einen kalziumabhängigen Weg zur eNOS-Aktivierung führen, an einer Induktion der NO-Synthese beteiligt ist (CAI et al. 2008, SCHNEIDER et al. 2003).

Eine Aktivierung der eNOS erfolgt auch durch Polyphenole, die in Schwarzem Tee enthalten sind. Sie erfolgt über die p38 MAPK, gefolgt von PI3-Kinase und Akt-Kinase. Die durch Schwarzen Tee induzierte eNOS-Aktivierung wird über eine Phosphorylierung der eNOS-Phosphorylierungsstelle Ser1177 und Dephosphorylierung von Thr495 vermittelt (ANTER et al. 2004). Im Signaltransduktionsweg der eNOS durch EGCG sind ebenfalls sowohl die PI3-Kinase, als auch die Akt-Kinase involviert. EGCG und Schwarzer Tee induzieren eine Phosphorylierung von eNOS-Ser1177. Die Dephosphorylierung von Thr495 nach Stimulation durch Schwarzen Tee scheint auf einem von der Akt-Kinase unabhängigen Weg über eine Induktion der intrazellulären Kalziumfreisetzung zu erfolgen (ANTER et al. 2004). Anhand unserer Versuche lässt sich eine Beteiligung der p38 MAPK an der eNOS-Aktivierung durch EGCG nicht bestätigen. Auch Kim et al. kommen in ihren Untersuchungen zum Ergebnis, dass die p38 MAPK nicht am Signaltransduktionsweg der eNOS durch EGCG beteiligt ist (KIM et al. 2007).

Offensichtlich scheint es Unterschiede in der eNOS-Aktivierung durch Polyphenole, die

im Schwarzen bzw. Grünen Tee enthalten sind, zu geben. Diese Unterschiede sollten in weiteren Untersuchungen näher herausgearbeitet werden.

Bei der eNOS-Aktivierung könnten auch G-Proteine eine Rolle spielen. Bei G-Proteinen handelt es sich um Heterotrimere mit drei Untereinheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Untereinheit). Man unterscheidet vier Familien von G-Proteinen:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/12}$  und  $G_{12/13}$  (COTTON UND CLAING 2009), welche über eine Bindung an gekoppelte Rezeptoren an der Vermittlung dieser Effekte eine Rolle spielen könnten.

Andreeva et al. konnten zeigen, dass eine Untereinheit aus der Familie der G-Proteine ( $G_\alpha$ ) zur Steigerung der eNOS-Aktivität führt. Dies erfolgt jedoch nicht durch eine rasche Phosphorylierung, sondern durch einen Anstieg des eNOS-Proteins durch Verlängerung der Halbwertszeit der eNOS-mRNA (ANDREEVA et al. 2006). Die eNOS-Aktivierung nach Stimulation des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors auf Endothelzellen erfolgte jedoch über die Kopplung an eine  $G_i$ -Protein-Untereinheit ( $G_{ai}$ ), mit nachfolgender Phosphorylierung der Src-Kinase und Akt-Kinase sowie einer eNOS-Aktivierung (CICCARELLI et al. 2007).

Aus diesem Grunde haben wir die  $G_i$ -Proteine untersucht. Durch den Einsatz von Pertussis Toxin wurden nur diese erfasst, andere G-Proteine werden dabei nicht berücksichtigt. Wir fanden jedoch keinen Hinweis dafür, dass  $G_i$ -Proteine und daran gekoppelte Rezeptoren einen Einfluss auf die durch EGCG vermittelte eNOS-Aktivierung haben, da Pertussis Toxin die EGCG-induzierte eNOS-Aktivierung nicht verhinderte.

Ein weiterer Rezeptor scheint an den EGCG-vermittelten Effekten beteiligt zu sein. So haben Tachibana et al. die anticancerogenen Effekte von EGCG untersucht und den 67 kDa-Laminin-Rezeptor auf Tumorzellen identifiziert. Durch Antikörper gegen den Laminin-Rezeptor kommt es zur Inhibition der EGCG-Bindung an die Tumorzellen. Weiterhin konnten sie zeigen, dass der natürliche Ligand des Laminin-Rezeptors zu einer Reduktion der Interaktion zwischen EGCG und diesem Rezeptor führt. Daraus haben sie geschlussfolgert, dass EGCG an den 67 kDa-Laminin-Rezeptor auf Tumorzellen bindet und damit die anticancerogene Wirkung von EGCG vermittelt (TACHIBANA et al. 2004).

Wir konnten in den Zellkulturversuchen durch den Einsatz von Laminin keine reproduzierbare Minderung der EGCG-vermittelten Steigerung der eNOS-Aktivität feststellen (Daten nicht gezeigt). Somit können wir einen Einfluss des 67 kDa-Laminin-Rezeptors für die eNOS-Aktivierung durch EGCG nicht zweifelsfrei bestätigen. Da es uns nicht ge-



lang, einen Rezeptor auf Endothelzellen zu finden, der die NO-produzierenden und vasodilatativen Eigenschaften des EGCG vermittelt, sollten dazu weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Kim et al. haben ebenfalls den Einfluss des Laminin-Rezeptors auf die eNOS-Aktivierung und -Phosphorylierung nach EGCG-Stimulation untersucht. Auch sie sind zu dem Ergebnis gekommen, dass der 67 kDa-Laminin-Rezeptor nicht die vasodilatatorischen Eigenschaften des EGCG vermittelt (KIM et al. 2007). Gloe et al. kamen zu dem Ergebnis, dass der 67 kDa-Laminin-Rezeptor die Steigerung der eNOS-Expression nach Scheer-Stress vermittelt. Die Steigerung der NO-Produktion erfolgt dabei auf der Ebene der Proteinexpression und nicht wie nach EGCG-Stimulation auf posttranslationaler Ebene durch Phosphorylierung (GLOE et al. 1999).

### **4.3 Funktionelle Relevanz der EGCG-induzierten eNOS-Aktivierung im Aortenring-Modell**

Um die Ergebnisse der in vitro-Versuche auf funktioneller Ebene zu untersuchen, bietet sich das Rattenaortenringmodell an, mit dem EGCG-induzierte Effekte in physiologisch relevanten Konzentrationen überprüft wurden.

Das Relaxationsverhalten der Rattenaortenringe bei physiologisch relevanten EGCG-Konzentrationen zeigte, dass schon eine EGCG-Konzentration von 1  $\mu$ M zu einer leichten Vasorelaxation führt. In der Originalregistrierung des Relaxationsverhaltens eines Rattenaortenrings nach EGCG-Gabe zeigte sich eine initiale kurzfristige und reversible Kontraktion des Aortenrings, der dann eine Vasorelaxation folgt (LORENZ et al. 2004).

Auch in anderen Studien wurden die Effekte von Teekatechinen an Aortenringen untersucht. So konnten Huang et al. zeigen, dass es durch Teekatechine zu einer Vasorelaxation an vorkontrahierten Rattenarterien kommt. Diese Effekte wurden dabei jedoch nach Einsatz wesentlich höherer Katechindosen erzielt (HUANG et al. 1998).

Sanae et al. hingegen fanden, dass der Einsatz niedriger EGCG-Konzentrationen bis 10  $\mu$ M einen potenzierenden Effekt auf die mit Phenylephrin vorkontrahierten Gefäßringe hat. Erst hohe Konzentrationen führten zur Vasodilatation. Sie führen dies auf eine Inaktivierung der endothelabhängigen NO-Produktion zurück (SANAE et al. 2002). Eine mögliche Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse könnte die unterschiedliche Behandlungszeit der Aortenringe mit EGCG sein. In unseren Versuchen wurden die

Aortenringe für jeweils 30 Minuten mit EGCG behandelt, bevor die nächste EGCG-Gabe erfolgte. Bei Sanae et al. wurden die Gefäßringe nur für 15 Minuten mit EGCG inkubiert. Auch bei unseren Versuchen kam es initial zu einer Vasokontraktion, die jedoch reversibel war und in eine Vasorelaxation mündete. Möglicherweise erfolgte bei Sanae et al. die EGCG-Inkubation der Gefäßringe für eine zu kurze Zeitspanne, so dass die Phase der Vasorelaxation noch nicht erreicht war und dementsprechend nicht registriert wurde.

In einer Studie von Alvarez-Castro et al. von 2004 wurde gezeigt, dass auch hohe EGCG-Konzentrationen, im Bereich zwischen 100 und 300  $\mu\text{M}$ , ausschließlich zu einer Vasokontraktion an isolierten Rattenaortenringen führt (ALVAREZ-CASTRO et al. 2004). Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt aber 2006 auch einen biphasischen Verlauf der EGCG-Wirkung an Rattenaortenringen. Nach initialer Vasokontraktion folgte ein vasorelaxierender Effekt, jedoch erst im Bereich zwischen 30  $\mu\text{M}$  und 1 mM EGCG (ALVAREZ et al. 2006).

Eine Erklärung für die transiente vasokonstriktorische Wirkung von EGCG kann im Moment nicht gegeben werden. Möglicherweise spielt ein endothelunabhängiger Mechanismus über einen EGCG-induzierten Kalziumeinstrom in glatten Muskelzellen eine Rolle. Das unterschiedliche Kontraktionsverhalten der Aortenringe könnte von der Kalziumkonzentration der Umgebungslösung abhängig sein (ALVAREZ-CASTRO et al. 2004). Andererseits wurde auch eine EGCG-induzierte Vasokontraktion bei Aortenringen in kalziumfreier Umgebung beschrieben, so dass auch die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern eine Rolle spielen könnte (SHEN et al. 2003).

Bereits nach Behandlung mit EGCG-Dosen, die im Bereich der physiologischen EGCG-Konzentration im Blutplasma nach Genuss von Grünem Tee liegen, reagierten die Aortenringe in unserer Studie mit einer Vasorelaxation. Diese liegt bei ca. 1  $\mu\text{M}$  (VAN HET HOF et al. 1999). Damit konnte auch eine mögliche in vivo-Relevanz von EGCG nachgewiesen werden.

Es gab jedoch Unterschiede in der zeitlichen Abfolge der eNOS-Phosphorylierung in der Zellkultur im Vergleich zum Relaxationsverhalten der Rattenaortenringe. Während eine Phosphorylierung in den Zellkulturversuchen bereits nach zweieinhalb Minuten vorlag, konnte eine maximale Relaxation der Aortenringe erst nach 30 Minuten registriert werden.

Der Zeitverlauf der Dilatation der Rattenaortenringe nach einmaliger EGCG-Applikation stimmte nicht mit der Dauer der eNOS-Phosphorylierung der Endothelzellen im Zellkulturversuch überein, die über sechs Stunden anhält. Eine mögliche Ursache für die zeitliche Differenz der eNOS-Phosphorylierung und damit Aktivierung im Zellkulturversuch einerseits und des Relaxationsverhaltens der Rattenaortenringe nach einmaliger EGCG-Stimulation andererseits, könnten unterschiedliche Versuchsbedingungen sein. In den Aortenringen befinden sich die Zellen im Gewebeverband, so dass die Vasodilatation durch das Zusammenspiel mit dem umgebenden Gewebe beeinflusst wird, während in der Zellkultur ein Zellmonolayer vorliegt.

In unseren Untersuchungen der Mechanismen der EGCG-induzierten Vasorelaxation konnte bei Aortenringen, analog den Zellkulturversuchen, eine Phosphorylierung der eNOS nachgewiesen werden. Wir schließen daraus, dass in den Aortenringen, wie in der Zellkultur, eine Phosphorylierung der eNOS zur eNOS-Aktivierung führt. Im Unterschied zur Zellkultur lässt sich die Phosphorylierung der eNOS in den Aortenringen jedoch schon bei wesentlich niedrigeren, physiologischen Konzentrationen nachweisen. In Versuchen von Kim et al. konnte ebenfalls die eNOS-Phosphorylierung im Aortenringmodell nachgewiesen werden, jedoch erst ab einer EGCG-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  (KIM et al. 2007).

Der Mechanismus der EGCG-induzierten Vasorelaxation scheint also endothelabhängig zu sein. Auch Huang et al. beschrieben die durch Teekatechine induzierte Vasodilatation der vorkontrahierten Rattenarterien als Folge des vom Endothel freigesetzten NO (HUANG et al. 1998). Alvarez et al. dagegen gehen von einem endothelunabhängigen Mechanismus der EGCG-induzierten Vasorelaxation aus. Ihren Untersuchungen zufolge kommt es bei höheren EGCG-Konzentrationen über Inhibition verschiedener PDE-Isoformen zur Relaxation glatter Muskelzellen (ALVAREZ et al. 2006).

Es wäre demnach möglich, dass die EGCG-induzierte Vasorelaxation konzentrationsabhängig über unterschiedliche Mechanismen erfolgt.

In weiteren Versuchsreihen sollte daher eine detailliertere Aufklärung der molekularen Mechanismen der EGCG-induzierten Vasodilatation erfolgen.

### 5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die molekularen Mechanismen der Signaltransduktion der eNOS-Aktivierung in bovinen Endothelzellen und der Vasodilatation in Aortenringen durch EGCG untersucht. Es konnte in Versuchen zur Zeitkinetik erstmals gezeigt werden, dass die Steigerung der eNOS-Aktivität bereits wenige Minuten nach EGCG-Stimulation durch die Phosphorylierung der eNOS erfolgt. Dabei werden drei der fünf eNOS-Phosphorylierungsstellen durch EGCG phosphoryliert.

In weiteren Versuchen konnte die Kalziumabhängigkeit der EGCG-induzierten eNOS-Aktivierung gezeigt werden. Es wird dazu sowohl intra- als auch extrazelluläres Kalzium benötigt. Überdies ist die Anwesenheit von extrazellulärem L-Arginin notwendig.

Durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren konnte die Beteiligung der Src-Kinase am Signaltransduktionsweg der eNOS-Aktivierung nach EGCG-Stimulation nachgewiesen werden. Sie ist oberhalb der Akt-Kinase lokalisiert. Ein Mitwirken der CaMK und der p38MAPK konnte dabei nicht bestätigt werden. Es gelang damit ein weiterer Schritt in der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Signaltransduktionskaskade der eNOS-Aktivierung.

G<sub>i</sub>-Proteine sowie der Lamininrezeptor wurden als mögliche Rezeptoren für EGCG auf Endothelzellen untersucht. Sie sind jedoch höchstwahrscheinlich nicht in den Signaltransduktionsweg der eNOS nach EGCG-Stimulation involviert.

Im Rattenaortenringmodell konnte die in vivo-Relevanz der Versuchsergebnisse belegt werden. Schon geringe, physiologisch relevante EGCG-Konzentrationen führten zur Vasorelaxation. Die Stimulation mit EGCG führte in den Aortenringen ebenso wie in den Zellkulturversuchen zu einer Induktion der eNOS-Phosphorylierung.

**6 Literaturverzeichnis**

- ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. (2001): Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J.* Vol 357, 593-615.
- ALEXOPOULOS, N., VLACHOPOULOS, C., AZNAOURIDIS, K., BAOU, K., VASILIADOU, C., PIETRI, P., XAPLANTERIS, P., STEFANADI, E., STEFANADIS, C. (2008): The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* Vol 15, 300-305.
- ALVAREZ, E., CAMPOS-TOIMIL, M., JUSTINIANO-BASARAN, H., LUGNIER, C., ORALLO, F. (2006): Study of the mechanism involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. *Br J Pharmacol.* Vol 147, 269-280.
- ALVAREZ-CASTRO, E., CAMPOS-TOIMIL, M., ORALLO, F. (2004): (-)- Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-independent mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Vol 369, 496-506.
- ANDERSON, R. A., POLANSKY, M.M. (2002): Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem.* Vol 50, 7182-7186.
- ANDREEVA, A. V., VAISKUNAITE, R., KUTUZOV, M.A., PROFIROVIC, J., SKIDGEL, R.A., VOYNO-YASENETSKAYA, T. (2006): Novel mechanisms of G protein-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase. *Mol Pharmacol.* Vol 69, 975-982.
- ANSELM, E., CHATAIGNEAU, M., NDIAYE, M., CHATAIGNEAU, T., SCHINI-KERTH, V.B. (2007): Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res.* Vol 73, 404-413.
- ANTER, E., THOMAS, S.R., SCHULZ, E., SHAPIRA, O.M., VITA, J.A., KEANEY, J.F. JR. (2004): Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem.* Vol 279, 46637-46643.
- ARTS, I.C., HOLLMAN, P.C., FESKENS, E.J., BUENO DE MESQUITA, H.B., KROMHOUT, D. (2001): Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr.* Vol 74, 227-232.
- BADIMON, J.J., IBANEZ, B., CIMMINO, G. (2009): Genesis and dynamics of atherosclerotic lesions: Implications for early detection. *Cerebrovasc Dis.* Vol 27, 38-47.
- BAE, S.W., KIM, H.S., CHA, Y.N., PARK, Y.S., JO, S.A., JO, I. (2003): Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol 203, 981-987.
- BALENTINE, D.A., WISEMAN, S.A., BOUWENS, L.C. (1997): The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* Vol 37, 693-704.
- BERRIDGE, M.J. (2008): Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* Vol 586, 5047-5061.
- BINGHAM, S. A., VORSTER, H., JERLING, J.C., MAGEE, E., MULLIGAN, A., RUNSWICK, S.A., CUMMINGS, J.H. (1997): Effects of black tea drinking on blood lipids, blood pressure and aspects of bowel habit. *Br J Nutr.* Vol 78, 41-55.
- BROADHURST, C. L., POLANSKY, M.M., ANDERSON, R.A. (2005): Insulin-like biological ac-

- tivity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem.* Vol 48, 849-852.
- CAI, H., LIU, D., GARCIA, J.G. (2008): Ca M Kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* Vol 77, 30-34.
- CALVER, A., COLLIER, J., VALLANCE, P. (1993): Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol.* Vol 78, 303-326.
- CHENG, H., LEDERER, W.J. (2008): Calcium sparks. *Physiol Rev.* Vol 88, 1491-1545.
- CHENG, T.O. (2005): All teas are not created equal. The chinese green tea and the cardiovascular health. *Int J Cardiol.* Vol 108, 301-308.
- CICCARELLI, M., CIPOLETTA, E., SANTULLI, G., CAMPANILE, A., PUMIGLIA, K., CERVERO, P., PASTORE, L., ASTONE, D., TRIMARCO, B., IACCARINO, G. (2007): Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of G<sub>i</sub> and SRC. *Cell Signal.* Vol 19, 1949-1955.
- COTTON, M., CLAING, A. (2009): G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cell Signal.* Vol 21, 1045-1053.
- CRESPY, V., WILLIAMSON, G. (2004): A review of the health effects of green tea catechins in vivo animal models. *J Nutr.* Vol 134, 3432S-3440S.
- DAVIES, M. J., JUDD, J.T., BAER, D.J., CLEVIDENCE, B.A., PAUL, D.R., EDWARDS, A.J., WISEMAN, S.A., MUESING, R.A., CHEN, S.C. (2003): Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults. *J Nutr.* Vol 133, 3298S-3302S.
- DEBETTE, ST., COURBON, D., LEONE, N., GARIÉPY, J., TZOURINO, CH., DARTIGUES, J-F., BARBERGER-GATEAU, P., RITCHIE, K., ALPÉROVITCH, A., AMOUYEL, P., DUCIMETIÈRE, P., ZUREIK, M. (2008): Tea Consumption Is Inversely Associated With Carotid Plaques in Women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Vol 28, 353-359.
- DE KONING GANS, J.M., UITERWAAL, C., VAN DER SCHUOW, Y.T., BOER, J.M.A., GROBBEE, D.E., VERSCHUREN, W.M.M., BEULENS, J.W.J. (2010): Tea and Coffee Consumption and Cardiovascular Morbidity and Mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1-7.
- DUFFY, S. J., KEANEY, J.F. JR., HOLBROOK, M., GOKCE, N., SWERDLOFF, P.L., FREI, B., VITA, J.A. (2001): Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* Vol 104, 151-156.
- DURAK, I., KACMAZ, M., CIMEN, M.Y., BÜYÜKKOCAK, U., OZTÜRK, H.S. (2001): Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. *Int J Cardiol.* Vol 77, 293-297.
- DUVALL, W.L. (2005): Endothelial dysfunction and antioxidants. *Mt Sinai J Med.* Vol 72, 71-80.
- ENGELHARDT, U. (1998): Grüner und Schwarzer Tee – Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee.* Braunschweig.
- FELDHEIM, W. (1994): Tee und Teerzeugnisse, aus: *Die Teepflanzen Camellia sinensis und Camellia assamica.* Deutscher Teeverband e.V.
- FLEMING, I., BUSSE, R. (2003): Molecular mechanisms involved in the regulation of the

- endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Vol 284, R1-R12.
- FÖRSTERMANN, U., NAKANE, M., TRACEY, W.R., POLLOCK, J.S. (1993): Isoforms of nitric oxide synthase: Functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J*. Vol 14, 10-15.
- FULTON, D., RUAN, L., SOOD, S.G., LI, C., ZHANG, Q., VENEMA, R.C. (2008): Agonist-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation and vascular relaxation. Role of eNOS phosphorylation at Tyr83. *Circ Res*. Vol 102, 497-504.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. (1980): The obligatory role of endothel cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature*. Vol 288, 373-376.
- FURCHGOTT, R.F. (1987): in: *Mechanism of Vasodilation*, Hrsg.: Vanhoutte, P.M., Raven, New York. Vol 4.
- GELEIJNSE, J. M., LAUNER, L.J., HOFMAN, A., POLS, H.A., WITTEMAN, J.C. (1999): Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: The Rotterdam Study. *Arch Intern Med*. Vol 159, 2170-2174.
- GLOE, T., RIEDMAYR, S., SOHN, H.Y., POHL, U. (1999): The 67kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide expression. *J Biol Chem*. Vol 274, 15996-16002.
- GOMES, A., VEDASIROMONI, J.R., DAS, M., SHARMA, R.M., GANGULY, D.K. (1995): Anti-hyperglycemic effect of black tea (*Camellia sinensis*) in rat. *J Ethnopharmacol*. Vol 45, 223-226.
- GOVERS, R., RABELINK, T.J. (2001): Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*. Vol 280, F193-F206.
- GRAHAM, H.N. (1992): Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*. Vol 21, 334-350.
- GRASSI, D., MULDER, T.P., DRAIJER, R., DESIDERI, G., MOLHUIZEN, H.O., FERRI, C. (2009): Black tea consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation in healthy males. *J Hypertens*. Vol 27, 774-781.
- HAYNES, M.P., SINHA, D., RUSSELL, K.S., COLLINGE, M., FULTON, D., MORALES-RUIZ, M., SESSA, W.C., BENDER, J.R. (2000): Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI-3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*. Vol 87, 677-682.
- HAYNES, M.P., LI, L. SINHA, D., RUSSELL, K.S., HISAMOTO, K., BARON, R., COLLINGE, M., SESSA, W.C., BENDER, J.R. (2003): Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem*. Vol 278, 2118-2123.
- HIRANO, R., MOMIYAMA, Y., TAKAHASHI, R., TANIGUCHI, H., KONDO, K., NAKAMURA, H., OHSUZU, F. (2002): Comparison of green tea intake in Japanese patients with and without angiographic coronary artery disease. *Am J Cardiol*. Vol 90, 1150-1153.
- HIRATA, K., SHIMADO, K., WATANABE, H., OTSUKA, R., TOKAI, K., YOSHIYAMA, M., HOMMA, S., YOSHIKAWA, J. (2004): Black tea increases coronary flow velocity reserve in healthy male subjects. *Am J Cardiol*. Vol 93, 1384-1388.

- HODGSON, J.M., PUDDEY, I.B., BURKE, V., BEILIN, L.J., JORDAN, N. (1999): Effects on blood pressure of drinking green and black tea. *J Hypertens.* Vol 17, 457-463.
- HODGSON, J.M., PUDDEY, I.B., BURKE, V., WATTS, G.F., BEILIN, L.J. (2002): Regular ingestion of black tea improves brachial artery vasodilator function. *Clin Sci.* Vol 102, 195-201.
- HODGSON, J.M., BURKE, V., PUDDEY, I.B. (2005): Acute effects of tea on fasting and postprandial vascular function and blood pressure. *J Hypertens.* Vol 23, 47-54.
- HUANG, Y., ZHANG, A., LAU, C.W., CHEN Z.Y. (1998): Vasorelaxant effect of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* Vol 63, 275-283.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E., CHAUDHURI, G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol 84, 9265-9269.
- JOCHMANN, N., LORENZ, M., KROSIGK, A., MARTUS, P., BÖHM, V., BAUMANN, G., STANGL, V. (2008): The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr.* Vol 99, 863-868.
- KIM, W., JEONG, M.H., CHO, S.H., YUN, J.H., CHAE, H.J., AHN, Y.K., LEE, M.C., CHENG, X., KONDO, T., MUROHARA, T., KANG, J.C. (2006): Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. *Circ J.* Vol 70, 1052-1057.
- KIM, J., FORMOSO, G., LI, Y., POTENZA, M.A., MARASCIULO, F.L., MONTAGNANI, M., QUON, M.J. (2007): Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem.* Vol 282, 13736-13745.
- KNOWELS, R. G., MONCADA, S. (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* Vol 298, 249-258.
- KRUMENACKER, J.S., HANAFY, K.A., MURAD, F. (2004): Regulation of nitric oxide and soluble guanyl cyclase. *Brain Res Bull.* Vol 62, 505-515.
- KUBES, P., SUZUKI, M., GRANGER, D.N. (1991): Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol 88, 4651-4655.
- KURIYAMA, S., SHIMAZU, T., OHMORI, K., KIKUCHI, N., NAKAYA, N., NISHINO, Y., TSUBONO, Y., TSUJI, I. (2006): Green Tea Consumption and Mortality Due to Cardiovascular Disease, Cancer and All Causes in Japan. *JAMA* Vol 296, 1255-1265.
- LI, C., RUAN, L., SOOD, S.G., PAPAPETROPOULOS, A., FULTON, D., VENEMA, R.C. (2007): Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* Vol 47, 257-264.
- LORENZ, M., WESSLER, S., FOLLMANN, E., MICHAELIS, W., DÜSTERHÖFT, T., BAUMANN, G., STANGL, K., STANGL, V. (2004): 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.* Vol. 279, 6190-6195.
- LÜSCHER, T.F. (1992): Von Thomas Lauder-Brunton zu den endogenen Nitraten.



- Schweiz Rundschau Med. Vol 82, 1148-1152.
- MC KAY, D.L., BLUMBERG, J.B. (2002): The role of tea in human health: An update. *J Am Coll Nutr.* Vol 21, 1-13.
- MARLETTA, M. A. (1993): Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* Vol 268, 12231-12234.
- MATSUYAMA, T., TANAKA, Y., KAMIMAKI, I., NAGAO, T., TOKIMITSU, I. (2009): Catechin safely improved higher levels of fatness, blood pressure, and cholesterol in children. *Obesity.* Vol 16, 1338-1348.
- MONCADA, S., VALLANCE, P. (1994): Nitric oxide – from mediator to medicines. *J R Coll Physicans Lond.* Vol 28, 209-219.
- MONCADA, S. (1994): Nitric oxide. *J Hypertens. Suppl.* Vol 12, 35-39.
- MONTAGNANI, M., CHEN, H., BARR, V.A., QUON, M.J. (2001): Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem,* Vol 276, 30392-30398.
- MOTLEY, E. D., EGUCHI, K., PATTERSON, M.M., PALMER, P.D., SUZUKI, H., EGUCHI, S. (2007): Mechanism of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and activation by thrombin. *Hypertension.* Vol 49, 577-583.
- MOUNT, P. F., KEMP, B.E., POWER, D.A. (2007): Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS-phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* Vol 42, 271-279.
- MUKAMAL, M. A., MACLURE, M., MULLER, J.E., SHERWOOD, J.B., MITTLEMAN, M.A. (2002): Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation.* Vol 105, 2476-2481.
- NAGANO, T., KOMINE, Y., SOGA, S., MEGURO, S., HASE, T., TANAKA, Y., TOKIMITSU, I. (2005): Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr.* Vol 81, 122-129.
- NAGAYA, N., YAMAMOTO, H., UEMATSU, M., ITOH, T., NAKAGAWA, K., MIYAZAWA, T., KANGAWA, K., MIYATAKE, K. (2004): Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Heart.* Vol 90, 1485-1486.
- NAKACHI, K., IMAI, K. (1995): Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ.* Vol 310, 693-696.
- NAKACHI, K., MATSUYAMA, S., MIYAKE, S., SUGANUMA, M., IMAI, K. (2000): Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors* Vol 13, 49-54.
- NANTZ, M.P., ROWE, C.A., BUKOWSKI, J.F., PERCIVAL, S.S. (2009): Standardized capsule of *Camellia sinensis* lowers cardiovascular risk factors in a randomized, double blind, placebo-controlled study. *Nutrition.* Vol 25, 147-154.
- NEGISHI, H., XU, J.W., IKEDA, K., NJELEKELA, M., NARA, Y., YAMORI, Y. (2004): Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* Vol 134, 38-42.
- OYAMA, J., MAEDA, T., KOUZUMA, K., OCHIAI, R., TOKIMITSU, I., HIGUCHI, Y., SUGANO, M.,

- MAKINO, N. (2010): Green tea catechins improve human forearm endothelial dysfunction and have antiatherosclerotic effects in smokers. *Circ J*. Vol 74, 578-588.
- PALMER, R.M., ASHTON, D.S., MONCADA, S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-Arginine. *Nature*. Vol 333, 664-666.
- RAEDERSTORFF, D.G., SCHLACHTER, M.F., ELSTE, V., WEBER, P. (2003): Effects of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem*. Vol 14, 326-332.
- REIS, J.P., LORIA, C.M., STEFFEN, L.M., ZHOU, X., VAN HORN, L., SISCOVICK, D.S., JACOBS, D.R., CARR, J.J. (2010): Coffee, Decaffeinated Coffee, Caffeine, and Tea Consumption in Young Adulthood and Atherosclerosis Later in Life The CARDIA Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1-8.
- SANAE, F., MIYAICHI, Y., KIZU, H., HAYASHI, H. (2002): Effects of catechins on vascular tone in rat thoracic aortic with endothelium. *Life Sci*. Vol 71, 2553-2562.
- SANO, J., INAMI, S., SEIMIYA, K., OHBA, T., SAKAI, S., TAKANO, T., MIZUNO, K. (2004) : Effects of Green Tea Intake on the Development of Coronary Artery Disease. *Circ J*. Vol 68, 665-670.
- SASAZUKI, S., KODAMA, H., YOSIMASU, K., LIU, Y., WASHIO, M., TANAKA, K., TOKUNAGA, S., KONO, S., ARAI, H., DOI, Y., KAWANO, T., NAKAGAKI, O., TAKADA, K., KOYANGAI, S., HIYAMUTA, K., Nii, T., SHIRAI, K., IDEISHI, M., ARAKAWA, K., MOHRI, M., TAKESHITA, A. (2000): Relation between Green Tea Consumption and the Severity of Coronary Atherosclerosis among Japanese Men and Women. *Ann Epidemiol*. Vol 10, 401-408.
- SCHNEIDER, J.C., EL KABIR, D., CHEREAU, C., LANONE, S., HUANG, X.L., DE BUYS ROESSINGH, A.S., MERCIER, J.C., DALL'AVA-SANTUCCI, J., DINH-XUAN, A.T. (2003): Involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Vol 284, H2311-H2319.
- SESSO, H., PAFFENBARGER, R.S. JR., OGUMA, Y., LEE, I.M. (2003): Lack of association between tea and cardiovascular disease in college alumni. *Int J Epidemiol*. Vol 32, 527-533.
- SHEN, J-Z, ZHENG, X-F, WEI, E-Q, KWAN, C-Y (2003) : Green tea catechins evoke a phasic contraction in rat aorta via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated multiple-signalling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Vol 30, 88-95.
- SIEGENTHALER, W., BLUM, H. (2006): *Klinische Pathophysiologie*. Thieme-Verlag, 679.
- STENSVOLT, I., TVERDAL, A., SOLVOLL, K., FOSS, O.P. (1992): Tea consumption. Relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev Med*. Vol 21, 546-553.
- SUZUKI, E., YORIFUJI, T., TAKAO, S., KOMATSU, H., SUGIYAMA, M., OHTA, T., ISHIKAWA-TAKATA, K., DOI, H. (2009): Green Tea Consumption and Mortality among Japanese Elderly People: The Prospective Shizuoka Elderly Cohort. *Ann Epidemiol*. 1-8.
- TACHIBANA, H., KOGA, K., FUJIMURA, Y., YAMADA, K. (2004): A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol*. Vol 11, 380-381.

- TARRANT, M.K., COLE, P.A. (2009): The Chemical Biology of Protein Phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* Vol 78, 797-825.
- THOMAS, S.R., CHEN, K., KEANEY JR., J.F. (2001): Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling pathway. *J Biol Chem.* Vol 277, 6017-6024.
- VAN HET HOF, K.H., WISEMAN, S.A., YANG, C.S., TIJBURG, L.B. (1999): Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc Soc Exp Biol Med.* Vol 220, 203-209.
- WIDLANSKY, M.E., DUFFY, S.J., HAMBURG, N.M., GOKCE, N., WARDEN, B.A., WISEMAN, S., KEANEY, J.F. JR., FREI, B., VITA, J.A. (2005): Effects of black tea consumption on plasma catechins and markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med.* Vol 38, 499-506.
- WIDLANSKY, M.E., HAMBURG, N.M., ANTER, E., HOLBROOK, M., KAHN, D.F., ELLIOTT, J.G., KEANEY, J.F. JR, VITA, J.A. (2007): Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Nutr.* Vol 26, 95-102.
- WISEMAN, S., MULDER, T., RIETVELD, A. (2001): Tea flavonoids: Bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. *Antioxid Redox Signal.* Vol 3, 1009-1021.
- WOLFRAM, S., RAEDERSTORFF, D., WANG, Y., TEIXEIRA, S.R., ELSTE, V., WEBER, P. (2005): TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann Nutr Metab.* Vol 49, 54-63.
- YANG, C.S., MALIAKAL, P., MENG, X. (2002): Inhibition of Carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Vol 42, 25-54.
- YANG, Y., LU, F.H., WU, J.S., WU, C.H., CHANG, C.J. (2004): The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Arch Intern Med.* Vol 614, 1534-1540.
- YU, J., AKISHITA, M., ETO, M., OGAWA, S., SON, B.K., KATO, S., OUCHI, Y., OKABE, T. (2010): Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *Endocrinology*, Vol 151, 1822-1828.
- ZHENG, G., SAYAMA, K., OKUBO, T., OGUMI, L.R. (2004): Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In vivo*, 55-62.

**7 Abkürzungsverzeichnis**

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AMPK	AMP-Activated protein kinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAEC	Bovine aortic endothel cell
BAPTA-AM	1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraantiacid
BBE	Bovine brain extract
BCIP	5-bromo-4-chloro-3indolphosphat
BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
BMI	Body mass index
BPB	Bromphenolblau
CaMK II	Kalzium Calmodulin Kinase II
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAG	Diacylglycerin
dd H <sub>2</sub> O	Doppeltdestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiolthreitol
EBM	Endothel cell basal medium
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallate
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallate
EGM	Endothel cell growth medium
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase

FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
<sup>3</sup> H	Tritium
HDL	High density lipoprotein
HSP 90	Heat shock protein 90, Hitzeschockprotein 90
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
KN-93	(2-(N-(2-Hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzemesulfonyl))amino-N-methylbenzylamin)
LDL	Low density lipoprotein
Ly294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumtetrasulfat
m-RNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotin amid adenin dinukleotid phosphat
NaF	Natriumfluorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitro-blue-Tetraekidium
NCEP	National Cholesterol Education Program
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	Nitric Oxide-Synthase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platlet Derived Growth Factor
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PKG	Protein Kinase G
PP2	4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-( -butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SB202190	(4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl) 1H-imidazole)
SB203580	(4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsufinylphenyl)-5-(4-pyridyl) 1H-imidazole)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris Buffered Saline
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Vascular Endothel Growth Factor

## **8 Danksagung**

Ich danke Frau Professor Dr. med. Verena Stangl dafür, dass sie sich meiner Dissertation angenommen hat und Herrn Dr. rer. nat. Mario Lorenz für die hervorragende Betreuung und die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise. Des Weiteren danke ich Herrn Professor Dr. med. Gert Baumann für die Ermöglichung der wissenschaftlichen Arbeit im kardiologischen Forschungslabor der Charité – Campus Mitte. Außerdem möchte ich Frau Angelika Vietzke und Frau Wanda Michaelis und den anderen Mitarbeitern des Forschungslabors für die Einarbeitung in die Methodik und Hilfe bei der experimentellen Arbeit danken. Zudem danke ich meinem Mann und meiner Familie für die ständige Unterstützung und Ermunterung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



**10 Erklärung an Eides statt**

Ich, Nadine Bogen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Beteiligte Mechanismen der eNOS-Aktivierung und Vasodilatation durch EGCG" selbst ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst, dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten übernommen habe.

Nadine Bogen

Berlin, am