

***In vitro* Studien zur Aktivität von
Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen:
Neuraminidase-inhibierende
sowie vasorelaxierende Effekte**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

STEFANIE JASMIN QUOSDORF

Berlin 2015

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Kolodziej

am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. H. Kolodziej

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. G. Weindl

Tag der Disputation: 07.12.15

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klassifizierung der Polyphenole	1
1.1.1	Phenolcarbonsäuren	1
1.1.2	Flavan-3-ole	2
1.1.3	Proanthocyanidine (kondensierte Gerbstoffe)	3
1.1.4	Ellagitannine	3
1.2	Polyphenole und ihre biologische Aktivität	4
1.2.1	Antigrippales Potential von Polyphenolen	5
1.2.1.1	Neuraminidase und Pathogenese einer Influenzavirus-Infektion	5
1.2.1.2	Therapie	6
1.2.1.3	Polyphenole als Neuraminidase-inhibierende Agenzien	7
1.2.2	Vasodilatatorisches Potential von Polyphenolen	8
1.2.2.1	Blutgefäße	8
1.2.2.2	Vasoaktive Prozesse im vaskulären Gefäß	9
1.2.2.2.1	Phosphoinositid-3-Kinase/ Akt-Signalweg	9
1.2.2.2.2	NO/cGMP-Signalweg	10
1.2.2.2.3	Endothelium derived hyperpolarization factor	10
1.2.2.2.4	Einfluss von Ca ²⁺ und deren Rezeptoren	11
1.2.2.2.5	Reaktive Sauerstoffspezies	11
1.2.2.3	Pathogenese der endothelialen Dysfunktion	12
1.2.2.4	Therapie	12
1.2.2.5	Polyphenole als vasodilatatorische Agenzien	13
1.2.3	Vasoprotektives Potential von Polyphenolen	14
1.2.3.1	Lipopolysaccharid und Pathogenese der endothelschädigenden Wirkung	14
1.2.3.2	Therapie	15
1.2.3.3	Polyphenole als vasoprotektive Agenzien	16
1.3	Zielsetzung	17
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Apparative Gerätschaften und Software	20
2.2	Chemikalien	22
2.3	Kits	26
2.4	Wasser	26
2.5	Proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fractionen	27
2.6	Untersuchungen zur Inhibition der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1) (MuNANA-Fluoreszenz-Assay)	28
2.6.1	Vorbereitung und Durchführung	28

2.6.2	Auswertung	29
2.7	Genexpression, Proteinreinigung sowie Ko-Kristallisation und Erfassung der Röntgenstrukturdaten.....	31
2.7.1	Vorbereitung und Durchführung.....	31
2.7.2	Auswertung	34
2.7.3	Ermittlung der Enzymkinetik der exprimierten <i>V. cholerae</i> Neuraminidase.....	34
2.7.3.1	Vorbereitung und Durchführung	34
2.8	Computergestützte Untersuchung der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und der Influenzavirus A... Neuraminidase (N1) sowie der Wechselwirkung zwischen den Neuraminidasen und deren... Inhibitoren	35
2.8.1	Wechselwirkungen der Neuraminidase-Inhibitoren in der <i>V. cholerae</i>	
	Neuraminidase bzw. Influenzavirus A Neuraminidase (N1).....	36
2.8.1.1	Vorbereitung und Durchführung	36
2.8.1.2	Auswertung	36
2.9	Experimente an isolierten Koronararterien des Schweins (Organbadstudien).....	37
2.9.1	Vorbereitung und Durchführung.....	37
2.9.1.1	Überprüfung des vasorelaxierenden Potentials und Charakterisierung der beteiligten Signalkaskade(n)	38
2.9.1.2	Experimente im Ca ²⁺ -freien Medium	39
2.9.1.3	Überprüfung des vasoprotektiven Potentials.....	39
2.9.2	Auswertung	39
2.10	Statistik	39
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Inhibition der Neuraminidase durch polyphenolische Testsubstanzen: Evaluation des	
	MuNANA-Fluoreszenz-Assays und Herkunft des Enzyms	42
3.1.1	Optimierung der Inkubationszeit	42
3.1.2	Neuraminidase-inhibierendes Potential polyphenolischer Substanzen	43
3.1.2.1	Inhibierendes Potential gegenüber der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase.....	46
3.1.2.2	Inhibierendes Potential gegenüber der Influenzavirus A Neuraminidase (N1).....	48
3.1.2.3	Vergleich des inhibierenden Potentials gegenüber der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und der	
	Influenzavirus A Neuraminidase (N1).....	49
3.1.2.1	Inhibierendes Potential von Wirkstoffkombinationen	50
3.2	Ko-Kristallisation der Neuraminidase-Inhibitoren und der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase sowie deren Röntgenstrukturanalyse.....	54
3.2.1	Enzymkinetik der exprimierten <i>V. cholerae</i> Neuraminidase	54

3.2.2	Ko-Kristallisation und Datensammlung	55
3.3	Computergestützte Analyse der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und der Influenzavirus A	
	Neuraminidase (N1) sowie der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den	
	Neuraminidasen und deren Inhibitoren	57
3.3.1	Vergleich der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase mit der Influenzavirus A	
	Neuraminidase (N1)	57
3.3.2	Analyse der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Neuraminidasen	
	und deren Inhibitoren	58
3.3.2.1	Wechselwirkungen zwischen der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und Zanamivir bzw.	
	Oseltamivircarboxylat	58
3.3.2.2	Wechselwirkungen zwischen der Influenzavirus A Neuraminidase (N1) und Zanamivir bzw.	
	Oseltamivircarboxylat	59
3.3.2.3	Vergleich der Wechselwirkungen der NA-Inhibitoren mit der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und	
	der Influenzavirus A Neuraminidase (N1).....	60
3.4	Experimente an isolierten Schweinekoronararterien (Organbadstudien)	63
3.4.1	Einfluss flavanoider Testsubstanzen auf vorkontrahierte Koronararteriensegmente	63
3.4.2	Dilatierender Effekt der <i>Diospyros</i>-Proanthocyanidine und des	
	Procyanidin-B2-3-O-gallats	64
3.4.3	Charakterisierung der Signalkaskade(n) der endothelabhängigen Relaxation	65
3.4.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies.....	65
3.4.3.1.1	ROS-Scavenger	65
3.4.3.1.2	Superoxidanion	66
3.4.3.1.3	Xanthin- und NADPH-Oxidase	66
3.4.3.1.4	Mitochondriale Atmungskette	67
3.4.3.1.5	Superoxiddismutase	67
3.4.3.2	Proteinkinasen	67
3.4.3.2.1	Proteinkinase B.....	67
3.4.3.2.2	Mitogen-aktivierende Protein-Kinase	68
3.4.3.3	NO/cGMP-Signalweg	68
3.4.3.4	Phosphodiesterase-3	69
3.4.3.5	Einfluss von K ⁺ -Kanälen	69
3.4.3.5.1	Ca ²⁺ -abhängiger K ⁺ -Kanal	70
3.4.3.5.2	Spannungsaktivierter K ⁺ -Kanal	70
3.4.3.5.3	Einfluss der endothelialen Ca ²⁺ -abhängigen K ⁺ -Kanäle und der eNOS.....	70
3.4.3.6	Gap junctions	71
3.4.3.7	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	72
3.4.3.8	Einfluss von Ca ²⁺	72
3.4.3.8.1	SOCCs und IP ₃ -Rezeptor	73
3.4.3.8.2	Transient receptor potential vanilloid channel	73
3.4.3.8.3	Ca ²⁺ -Pumpe des sarko-/endoplasmatischen Retikulums und des Ryanodin-Rezeptors.....	74

3.4.3.8.4	Einfluss der L-Typ Ca ²⁺ -Kanäle	74
3.4.3.9	Estrogenrezeptor	75
3.4.4	Dilatierender Effekt der <i>Diospyros</i>-Proanthocyanidine an Arterien mit mechanisch entferntem Endothel.....	75
3.4.5	Einfluss proanthocyanidinhaltiger Substanzen auf Lipopolysaccharid-behandelte Arteriensegmente.....	78
3.4.5.1	Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit dem Lipopolysaccharid und proanthocyanidinhaltigen Substanzen.....	78
3.4.5.2	Funktionalität des Endothels nach der Inkubation mit dem Lipopolysaccharid und den proanthocyanidinhaltigen Testsubstanzen	81
4	Diskussion.....	84
4.1	Antigrippales Potential polyphenolischer Substanzen	85
4.1.1	Beurteilung des Testsystems	86
4.1.2	Inhibition der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase	86
4.1.3	Inhibition der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase durch Wirkstoffkombinationen.....	89
4.1.4	Inhibition der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)	91
4.1.5	Vergleich der Inhibition der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)	93
4.1.6	Wechselwirkungen von Zanamivir und Oseltamivircarboxylat in der Bindungstasche der <i>V. cholerae</i> und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1).....	95
4.1.6.1	Dreidimensionaler Aufbau der Neuraminidase	95
4.1.6.2	Wechselwirkungen von Zanamivir und Oseltamivircarboxylat in der <i>V. cholerae</i> Neuraminidase und Influenzavirus A Neuraminidase (N1).....	96
4.2	Vasorelaxierendes Potential polyphenolischer Substanzen	100
4.2.1	Screening von Flavan-3-olen und Procyanidinen auf vasorelaxierendes Potential an Koronararterien des Schweins.....	100
4.2.2	Charakterisierung der Signalkaskade(n) der endothelabhängigen Relaxation durch <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidine und Procyanidin B2-3-O-gallat.....	101
4.2.2.1	Beteiligung des NO/cGMP-Signalwegs.....	102
4.2.2.2	Beteiligung von K ⁺ -Kanälen.....	102
4.2.2.2.1	Beteiligung des EDHF-Signalwegs.....	103
4.2.2.3	Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies	103
4.2.2.4	Beteiligung von Redox-sensitiven Kinasen.....	105
4.2.2.5	Beteiligung von Ca ²⁺	105
4.2.2.6	Beteiligung der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	107
4.2.2.7	Beteiligung des Estrogenrezeptors.....	108
4.2.2.8	Beteiligung der Phosphodiesterase-3.....	108
4.2.2.9	Beteiligung von gap junctions	108
4.2.3	Charakterisierung der Signalkaskade(n) der endothelunabhängigen Vasodilatation	109

4.3	Vasoprotektives Potential polyphenolischer Substanzen.....	110
4.3.1	Hemmung einer Lipopolysaccharid-induzierten, vaskulären iNOS-Expression durch proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen	111
4.3.2	Protective Wirkung proanthocyanidinhaltiger Extrakte/Fraktionen auf das Endothel....	113
4.4	Fazit und Ausblick.....	114
5	Zusammenfassung	115
6	Summary	117
7	Anhang.....	119
8	Literatur- und Abbildungsverzeichnis	122
8.1	Literaturverzeichnis.....	122
8.2	Abbildungsverzeichnis	136
9	Danksagung	138
10	Eidesstattliche Erklärung.....	139

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Akt	Proteinkinase B
BK _{Ca}	„big conductance“ Kaliumionen-Kanal
[Ca ²⁺] _i	Freie, intrazelluläre Calciumionen-Konzentration
Ca ²⁺	Calciumionen
Ca _v	„voltage gated calcium ion selective channel“ = spannungsgesteuerter Calciumionen-Kanal
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	„combination index“ = Kombinationsindex
CI _{wt}	Gewichteter Kombinationsindex
CTX	Charybdotoxin
D	Dosis
(D)HHDP	(Dehydro)Hexahydroxydiphenoyl-Element
D _m	Mittlere Wirkstoffdosis
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀ , pEC ₅₀	„effective concentration“ (bzw. negativer dekadischer Logarithmus) = effektive Konzentration, bei der 50 % des Maximizeffektes erreicht wird
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDHF	„endothelium derived hyperpolarization factor“ = endothelialer hyperpolarisierender Faktor
EDRF	„endothelium derived relaxing factor“ = endothelialer vasodilatierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E _{max}	Maximaleffekt
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
<i>f_a</i>	„fraction affected“ = beeinflusster Anteil
<i>f_u</i>	„fraction unaffected“ = unbeeinflusster Anteil
IC ₅₀	„inhibitory concentration“ = Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird
IK _{Ca}	„intermediate conductance“ Kaliumionen-Kanal
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
K ⁺	Kaliumionen
K _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumionen-Kanal
K _{Ca} -Kanal	Calciumionen-abhängiger Kaliumionen-Kanal
KHS	Modifizierte Krebs-Henseleit Lösung
K _{ir} -Kanal	„inward-rectifier“ Kaliumionen-Kanal
K _{tr}	Kontrolle
K _v -Kanal	Spannungsabhängiger Kaliumionen-Kanal
LB-Medium	Lysogeny-Broth-Medium
L-NAME	N ^G -Nitro-L-argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzung	Erläuterung
m	Im Fall: <ul style="list-style-type: none"> • lineare Regression: Maß für die Steigung der Konzentrations-Wirkungskurve • nicht lineare Regression: Maß für die Sigmoidizität der Konzentrations-Wirkungskurve (Hill-Koeffizient)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MnTMPyP	Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-porphyrin
MuNANA	2´-(4-Methylumbelliferyl)- <i>n</i> -D- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NA	Neuraminidase
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natriumionen-Kaliumionen-Adenosintriphosphatase
NADPH-Oxidase	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NAC	<i>N</i> -Acetylcystein
NfκB	“nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells”
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ODQ (TEMED)	1 <i>H</i> -[1,2,4]oxadiazolo[4,3- <i>a</i>] chinoxalin-1-on
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit
p38-MAPK	p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase
p-Akt	Phosphorylierte Proteinkinase B
PDB (ID)	Protein-Data-Base (Identifikation)
PDE	Phosphodiesterase
p-eNOS	Phosphorylierte endotheliale NO-Synthase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
<i>r</i>	Korrelations-/Regressionskoeffizient
rFU	Relative Fluoreszenzeinheit
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	“sodium dodecyl sulfate” = Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	„sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ = Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA	Sarko-/endoplasmatisches Retikulum Calciumionen-ATPase
sGC	„soluble guanylyl cyclase“ = lösliche Guanylylcyclase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SOCC	„store operated calcium ion channel“ = speicheraktivierender Calciumionen-Kanal
SOD	Superoxiddismutase
TB-Medium	Terrific-Broth-Medium
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TRAM	1-[(2-Chlorophenyl)-diphenylmethyl]-1 <i>H</i> -pyrazol
TRPV-Kanal	„transient receptor potential vanilloid“-Kanal
U	Unit
<i>v</i> _{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
vRNP	viraler Ribonukleoproteinkomplex
VOCC	„voltage operated calcium ion channel“ = spannungsgesteuerter Calciumionen-Kanal

Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code
Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Cystein	Cys
Glutamin	Gln
Glutaminsäure	Glu
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Try
Valin	Val

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Klassifizierung der Polyphenole

Polyphenole bezeichnet eine chemisch heterogene Stoffklasse von aromatischen Verbindungen mit mindestens zwei phenolischen Hydroxygruppen, deren Vertreter zu den Produkten des Sekundärstoffwechsels gezählt werden. Allein mehr als 8.000 Flavonoide wurden 2013 gelistet, sodass die Gesamtzahl der bekannten polyphenolischen Sekundärstoffe heute bei fast 10.000 zu vermuten ist (Mushtaq und Wani, 2013). Mehrere Hundert Polyphenole sind in essbaren Pflanzen identifiziert worden, doch auch hier dürfte das Spektrum der erfassten Vertreter gegenwärtig deutlich höher liegen (Manach et al., 2004, Landete, 2012). Ähnlich mannigfaltig ist deren biologische Aktivität. Therapieerfolge bzw. gesundheitsfördernde Effekte sind unter anderem bei Krankheiten wie Arteriosklerose, Krebs, Diabetes, neurodegenerativen Erkrankungen und Osteoporose beschrieben worden (Aviram und Fuhrman, 1998, Scalbert et al., 2005). Unter Berücksichtigung der vorliegenden Arbeit werden im Folgenden aus dieser Pflanzenstoffgruppe Phenolcarbonsäuren, Flavan-3-ole, Proanthocyanidine und Ellagitannine betrachtet. In diesem Zusammenhang wird kurz auf die chemische Struktur und das Vorkommen im Pflanzenreich eingegangen.

1.1.1 Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäuren sind Analoga der Hydroxybenzoesäure und Hydroxyzimtsäure (Manach et al., 2004, Mushtaq und Wani, 2013). Größtenteils sind diese Verbindungen ester- oder etherartig an weitere Pflanzeninhaltsstoffe geknüpft, wie z.B. die Zellwandbestandteile Lignin oder Zellulose, aber auch an andere Komponenten des Primär- sowie des Sekundärstoffwechsels (Herrmann und Nagel, 1989). Die Hydroxybenzoesäure sowie deren Strukturanaloga weisen einen C₆-C₁-Grundkörper auf. Vertreter sind unter anderem die Gallussäure, die Protocatechusäure, die Syringasäure und die Vanillinsäure (Abb. 1) (Watzl, 2001, Landete, 2012). Das Vorkommen in größeren Mengen beschränkt sich in freier Form auf einige wenige essbare Pflanzen. In verschiedenen Früchten sind die Hydroxybenzoesäure sowie deren Analoga, insbesondere Gallussäure, an Gallotannine und Ellagitannine gebunden (Manach et al., 2004). Demgegenüber sind die Phenylpropanabkömmlinge (Hydroxyzimtsäure und deren Analoga) in höheren Mengenanteilen zu finden. Beispielhaft seien die *p*-Cumar-, die Kaffee-, die Ferula und die Sinapinsäure genannt (Abb. 1) (Watzl, 2001, Mushtaq und Wani, 2013). In freier Form eher selten vorkommend sind sie hauptsächlich mit China-, Shikimi- und Weinsäure verknüpft (Manach et al., 2004).

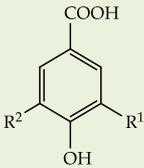
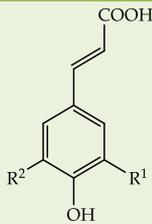
				
Vertreter Hydroxybenzoesäure		Vertreter Hydroxyzimtsäure		
	R ¹	R ²		
Gallussäure	OH	OH	p-Cumarsäure	H
Protocatechussäure	OH	H	Ferulasäure	H
Syringasäure	OCH ₃	OCH ₃	Sinapinsäure	OCH ₃
Vanillinsäure	OCH ₃	H	Kaffeesäure	OH

Abb. 1 Beispiele für Phenolcarbonsäuren

1.1.2 Flavan-3-ole

Flavan-3-ole (C₆-C₃-C₆-Grundgerüst) gehören zur Gruppe der Flavonoide und sind die biogenetischen Vorstufen der Proanthocyanidine (vgl. Kapitel 1.1.3) (Mushtaq und Wani, 2013). Die wichtigsten Vertreter mit Relevanz für die vorliegende Arbeit sind in Abb. 2 aufgeführt. Während Catechin und Epicatechin weitverbreitet in Früchten vorkommen, sind Galocatechin, Epigallocatechin und Epigallocatechin-3-O-gallat besonders in Weintrauben und Tee enthalten. Glykosidierungen wie bei anderen Flavonoiden sind dabei kaum zu finden. Interessanterweise nehmen Flavan-3-ole in grünen Teeblättern bis zu 30 % der Trockenmasse ein, wovon allein ein Drittel auf Epigallocatechin-3-O-gallat entfällt (Graham, 1992, Manach et al., 2004).

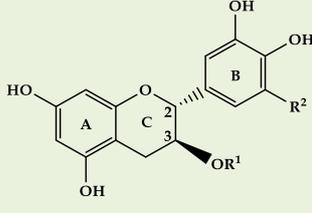
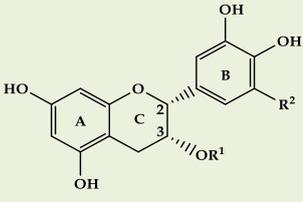
				
1-4		5-8		
Flavan-3-ole		R ¹	R ²	Konfiguration
1	(+)-Catechin	H	H	2R, 3S
2	(+)-Galocatechin	H	OH	
3	(+)-Catechin-3-O-gallat	galloyl	H	
4	(+)-Galocatechin-3-O-gallat	galloyl	OH	
5	(-)-Epicatechin	H	H	2R, 3R
6	(-)-Epigallocatechin	H	OH	
7	(-)-Epicatechin-3-O-gallat	galloyl	H	
8	(-)-Epigallocatechin-3-O-gallat	galloyl	OH	

Abb. 2 Beispiele für Flavan-3-ole

1.1.3 Proanthocyanidine (kondensierte Gerbstoffe)

Proanthocyanidine sind Oligomere ($n = 2 - \text{ca. } 7$) der Flavan-3-ole. Die Kondensationsprodukte aus Catechin-Bausteinen mit $R^2 = H$ werden als Procyanidine bezeichnet, diejenigen mit $R^2 = OH$ als Prodelphinidine (Abb. 3a). Die Monomere sind dabei über [4,6]- oder [4,8]-Interflavanylbindungen miteinander verknüpft (Typ B). In oligomeren Strukturen tritt gelegentlich eine zusätzliche Etherbrücke zwischen dem C-2 und dem C-7 der nächsten Flavan-3-ol-Einheit auf (Typ A) (Abb. 3b) (Aron und Kennedy, 2008). Proanthocyanidine sind weit verbreitet in Pflanzen mit holzigem Habitus und in zahlreichen Nahrungs- und Genussmitteln zu finden. Zudem enthalten viele Phytopharmaka Proanthocyanidine, welche an der therapeutischen Wirkung beteiligt sind (Rasmussen et al., 2005).

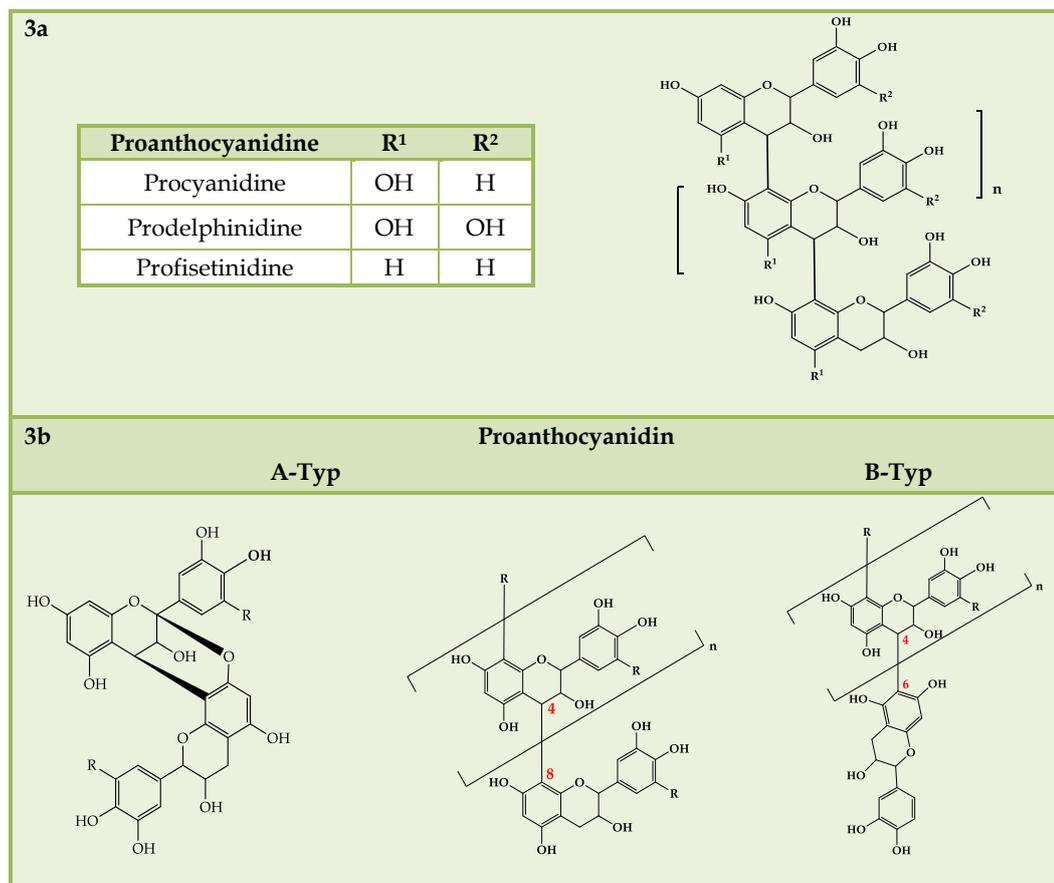


Abb. 3 Beispiele für Proanthocyanidine

1.1.4 Ellagitannine

Ellagitannine gehören zu den hydrolysierbaren Gerbstoffen und sind charakterisiert durch die Anwesenheit von (Dehydro)Hexahydroxydiphenoylresten (DHHDP bzw. HHDP) an einem Glukosebaustein (Landete, 2012). Dieses Strukturelement wird biogenetisch aus zwei räumlich benachbarten Galloylresten durch eine C-C-Verknüpfung gebildet (Abb. 4). Zusätzlich finden sich häufig noch O-Galloylierungen an der zentralen Glukose-Einheit. Die in der Arbeit verwendeten Dehydroellagitannine (z.B. Geraniin) zeichnen sich durch das Vorliegen einer halbacetalischen

D-Glukose aus. Bei den C-glykosidischen Vertretern (z.B. Vescalagin) liegt der Glukosebaustein in offenkettiger Form vor (Tab. 26). Das Vorkommen von Ellagitanninen ist sowohl in Nahrungsmitteln als auch in medizinisch traditionell genutzten Heilpflanzen bekannt (Clifford und Scalbert, 2000, Okuda et al., 2009).

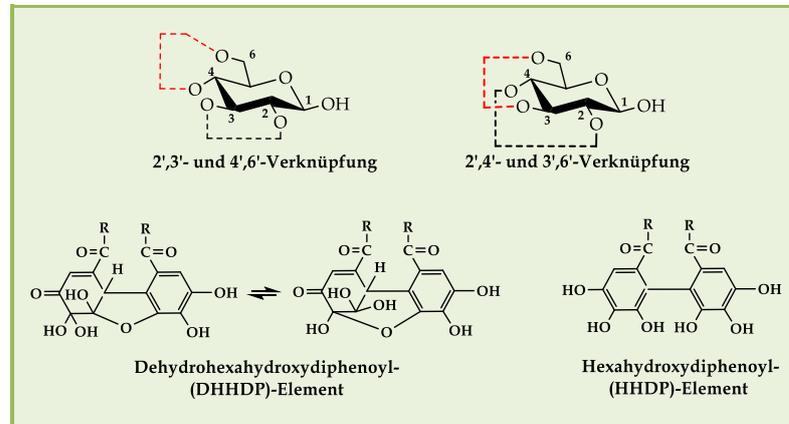


Abb. 4 Beispiele für Verknüpfungen von D-Glukose mit (D)HHDP-Elementen

1.2 Polyphenole und ihre biologische Aktivität

Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit Polyphenolen und deren Verbreitung, Chemie sowie deren biologischer Aktivität. So stehen auch die Bioverfügbarkeit, der Metabolismus und die Unbedenklichkeit im Fokus (Clifford und Scalbert, 2000, Manach et al., 2004, Okuda et al., 2009, Grienke et al., 2012, Landete, 2012, Mushtaq und Wani, 2013). Demzufolge bieten diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe ideale Voraussetzungen für die Erforschung ihres therapeutischen Potentials. 2013 waren bei der pflanzlichen Selbstmedikation die Indikationen Husten/Erkältung (382 Mio. Euro) und Herz/Kreislauf (230 Mio. Euro) die umsatzstärksten Bereiche in Deutschland (Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V., 2013). Die hohe Nachfrage nach pflanzlichen Arzneimitteln und die Notwendigkeit neuer Wirkstoffe mit neuen Wirkmechanismen stützen das Bemühen um optimierte Phytopharmaka und die Suche nach neuen Leitstrukturen. Doch auch neue Erkenntnisse über altbekannte Verbindungen können einen medizinischen Fortschritt sein und Einblicke in gesundheitsfördernde Nahrungsmittel erlauben.

Entsprechend der Themenstellung in der vorliegenden Arbeit wird nachfolgend auf das antigrippale und vasoaktive Potential von polyphenolischen Substanzen eingegangen. In diesem Zusammenhang wird kurz die Pathogenese und die etablierten Therapieoptionen der jeweiligen Erkrankung beschrieben.

1.2.1 Antigrippales Potential von Polyphenolen

1.2.1.1 Neuraminidase und Pathogenese einer Influenzavirus-Infektion

Die Neuraminidase (NA), auch Sialidase genannt, wird den Glykosidasen (EC.3.2.1.) zugeordnet (Grienke et al., 2012). Viral, bakteriell, parasitär und human vorkommend, hydrolysiert diese α -2,3-, α -2,6- und α -2,8-glykosidische terminale Sialinsäurebindungen. Bevorzugt erfolgt dies an Oligosacchariden, Glykoproteinen, Glykolipiden und synthetischen Substraten (Öhman et al., 1970, Varghese et al., 1983, Crennell et al., 1993, Schenkman et al., 1994). Während die N-Acetylneuraminsäure (Neu-5-Ac) ein Substrat ist, inhibiert die 2-Desoxy-2,3-didehydro-N-Acetylneuraminsäure (Neu-5-Ac-2-en) das Enzym (Abb. 5) (Moustafa et al., 2004).

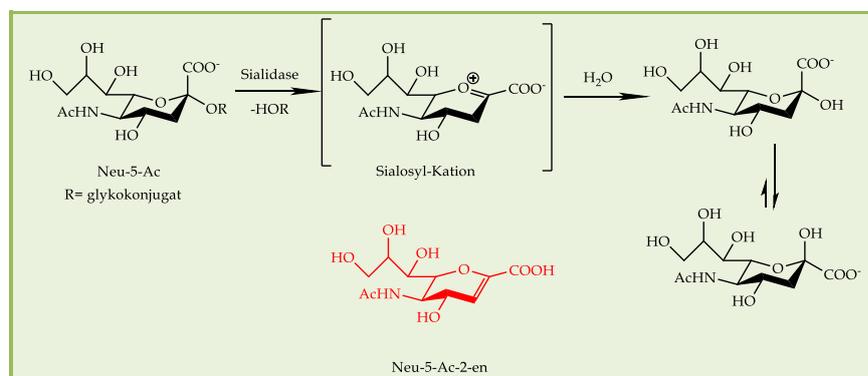


Abb. 5 Hydrolyse eines Sialinsäurerestes durch eine NA (Sialidase)
(adaptiert nach Moustafa et al., 2004)

Auf der Lipiddoppelmembran des Influenzavirus A befinden sich Hämagglutinin und die NA, zwei Schlüsselenzyme für die Virusreplikation. Im Wirtsorganismus entfernt die NA Decoy-Rezeptoren auf der oberflächlichen Schleimschicht, den Zilien und der Glykokalyx (Matrosovich et al., 2004). Diese Demaskierung erleichtert die Hämagglutinin-vermittelte Virus-Adhäsion an Sialinsäurereste der Wirtszellmembran. Im Anschluss an die passive Phagozytose erfolgt das Uncoating und die Freisetzung des viralen Ribonukleoproteinkomplexes (vRNP). Im Rahmen eines komplexen Ablaufs erfolgen daraufhin die Transkription und die Replikation der viralen Ribonukleinsäure und der Proteine. Im Schritt der Selbstassemblierung werden diese zu einem neuen Virion zusammengesetzt und im Zuge der Knospung freigesetzt. Dabei enthält die Lipidhülle des Virons Teile der Wirtszellmembran. Die endgültige Ablösung von der Wirtszelle erfolgt durch die NA-katalysierte Hydrolyse terminaler Sialinsäureverknüpfungen (Varghese et al., 1983).

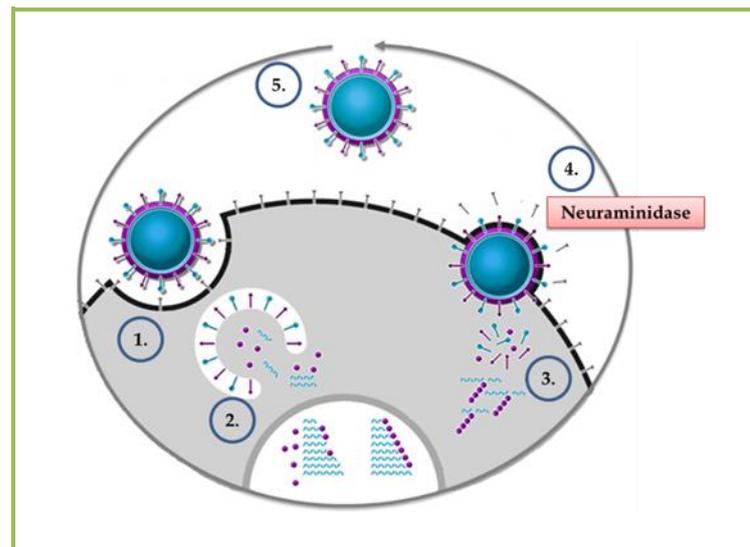


Abb. 6 Replikation des Influenzavirus A

(adaptiert nach Gubareva et al., 2000)

1) Adsorption des Viruspartikels an der Zellmembran und Phagozytose, 2) Freisetzung des vRNPs sowie anschließende Transkription und Replikation 3) Selbstassemblierung 4) Knospung 5) freigesetzter Virion

1980 legte die Weltgesundheitsbehörde die derzeit gültige Nomenklatur der Influenzaviren fest. Diese setzt sich aus dem Buchstaben des Virustyps, dem Ort der ersten Isolierung, einer fortlaufenden Nummerierung sowie dem Jahr der ersten Isolierung zusammen (World Health Organization, 1980). Ergänzend werden beim Virustyp A die Antigene Hämagglutinin und NA bezeichnet. Aktuell sind 16 Hämagglutinin- und neun NA-Serotypen bekannt. Beispielfhaft sei das für diese Arbeit relevante Influenzavirus A/California/04/2009 [H1N1] genannt.

Zudem spielt die NA eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der *Vibrio cholerae*-Infektion. Die Zellmembran humaner Enterozyten enthält Ceramide, deren terminale Tri- bzw. Disialoganglioside NA-katalysiert abgebaut werden. Das pathogene Cholera-Toxin adsorbiert an das entstandene Monosialogangliosid, wodurch der Eintritt in die intestinale Epithelzelle initiiert wird (Holmgren et al., 1975).

1.2.1.2 Therapie

Bereits 1948 hielten Forschergruppen die NA für einen effektiven Angriffspunkt für Arzneistoffe (Gubareva et al., 2000). Die Weltgesundheitsbehörde empfahl im Rahmen der H1N1 Pandemie 2009 die NA-Inhibitoren Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®) für den therapeutischen Einsatz (Abb. 7) (World Health Organization, 2009). Beide Strukturen wurden in den 1990er Jahren durch Röntgenspektroskopie und rationales Wirkstoffdesign von Neu-5-Ac und Neu-5-Ac-2-en (Tab. 26) abgeleitet und weiterentwickelt (von Itzstein et al., 1993, Kim et al., 1997). Die orale Einnahme von Oseltamivir erfolgt in Form des Carbonsäureethylesters, welchen körpereigene hepatische Esterasen zum pharmakologisch aktiven Oseltamivircarboxylat metabolisieren. Der Einsatz der NA-Inhibitoren erfolgt vorrangig im viralen Bereich, allerdings wurde zudem die Hemmung der bakteriellen

Enzymvariante belegt (Soong et al., 2006). Von Dezember 2008 bis Januar 2009 wurden in 30 Ländern virale Resistenzen gegenüber Oseltamivircarboxylat festgestellt (World Health Organization, 2009). Die therapeutische Anwendung beider NA-Inhibitoren ist kritisch zu betrachten. Aufgrund geringer oraler Bioverfügbarkeit erfolgt die Verabreichung von Zanamivir pulmonal. Dies ist vor allem bei Patienten mit Atemwegserkrankungen problematisch. Zudem legen zwei Cochrane-Studien nahe, dass Tamiflu® und Relenza® weder die Anzahl der Krankenhauseinweisungen reduzieren noch schwere Komplikationen einer Influenza-Infektion unterbinden (Heneghan et al., 2014, Jefferson et al., 2014). Neben diesen beiden global zugelassenen NA-Inhibitoren sind Laninamivir (Inavir®) auf dem japanischen und Peramivir (Rapiacta®/Rapivab®) auf dem japanischen sowie amerikanischen Markt verfügbar (Sugaya, 2011, Food and Drug Administration, 2014).

Prophylaktisch kann auf Grippeimpfstoffe zurückgegriffen werden. 2013 erfolgte die Zulassung des ersten rekombinanten Impfstoffes (Flubok®), welcher drei vorsaisonale Hämagglutinin-Varianten enthält (Mullard, 2014).

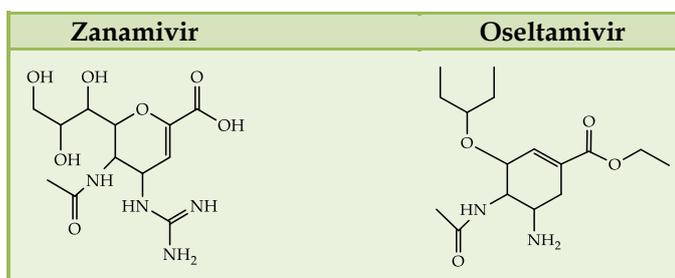


Abb. 7 Beispiele für NA-Inhibitoren

Zur Testung und Etablierung neuer potenter Wirkstoffe stehen verschiedene standardisierte Methoden zur Verfügung. Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-basierte Testkits, Zellkultur-gestützte Assays oder *in silico*-Studien liefern effizient und kostengünstig Ergebnisse über die inhibitorische Eigenschaft von Substanzen (Grienke et al., 2012). Je nach Forschungshintergrund und -ziel wurden dafür bakterielle oder virale NA verwendet (Ray und Simmons, 1972, Potier et al., 1979, von Itzstein et al., 1993, Buxton et al., 2000).

1.2.1.3 Polyphenole als Neuraminidase-inhibierende Agenzien

Grienke et al. (2012) geben eine Zusammenfassung publizierter *in vitro*-Daten (2000-2011) über die inhibitorische Aktivität von Pflanzeninhaltsstoffen gegenüber viralen NAs. Interessanterweise entfallen zwei Drittel der genannten Testsubstanzen auf die Stoffgruppe der Flavonoide. Liu et al. (2008) erstellten anhand von 25 flavonoiden Substanzen und ihrer IC_{50} -Werte folgende Struktur-Wirkungsbeziehung in absteigender Potenz: Aurone < Flavan(ol)e < Isoflavone < Flavanon(ol)e < Flavan(ol)e. Dabei klassifizierten die Autoren in gutes (IC_{50} -Wert < 40 μ M), moderates (IC_{50} -Wert: 40-80 μ M) und schwaches (IC_{50} -Wert > 80 μ M) Potential. Die essentiellen aktivitätssteigernden

Strukturmerkmale sind die Hydroxylierungen an C-4' und C-7, die Carbonylfunktion an C-4 sowie die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3. Das Glykosidierungsmuster hat hingegen keinen Einfluss. Ähnliches postulierten auch Rakers et al. Zudem beobachtete diese Forschergruppe mittels Moleküldynamik-Simulationen stabilisierende Wasserstoffbrücken zwischen dem flavonoiden Grundkörper und den Aminosäuren, die sich außerhalb der viralen Bindungstasche befanden (Rakers et al., 2014). Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Kombination von Wirkstoffen. So dokumentieren Haidari et al. eine antivirale Wirkung für eine Zusammensetzung aus dem Ellagitannin Punicalagin und Oseltamivir (Haidari et al., 2009).

Neben polyphenolischen Reinsubstanzen werden in der vorliegenden Arbeit auch proanthocyanidinhaltige Pflanzenextrakte und Fraktionen überprüft. *In vitro*- und *in vivo*-Studien belegen, dass der *Pelargonium*-Extrakt (EPs® 7630) inhibitorische Aktivität gegenüber der viralen NA (N1) aufweist (Theisen und Muller, 2012, Helfer et al., 2014). Zwar erschwert die komplexe Zusammensetzung die Bestimmung der aktiven Komponente/n, allerdings wurden mittels Fraktionierung Proanthocyanidine mit einer Mindestkettenlänge von drei Einheiten als wirksamkeitsbestimmend ermittelt (Janecki, 2012, Theisen und Muller, 2012). Zudem konnte an Stress ausgesetzten, H1N1-infizierten Mäusen durch die Gabe eines polyphenolischen Apfelextraktes eine konzentrations-abhängige Steigerung der Überlebensrate beobachtet werden (He et al., 2011).

1.2.2 Vasodilatatorisches Potential von Polyphenolen

1.2.2.1 Blutgefäße

Arterielle Gefäße bestehen histologisch betrachtet aus drei Schichten: der Tunica intima (Intima), Tunica media (Media) und Tunica adventitia (Adventitia).

Die Tunica intima ist die innerste Schicht und kleidet die Blutgefäße aus. Der dreiteilige Aufbau besteht aus einreihigen Endothelzellen und einer subendothelialen sowie elastischen Schicht (Furchgott und Zawadzki, 1980, Pugsley und Tabrizchi, 2000). Durch die anionische Aufladung der luminalen Glykokalyx werden polykationische Moleküle wie Poly-L-Arginin gebunden und über entsprechende Kanäle dem endothelialen Stickstoffmonoxid-(NO)-Stoffwechsel zugeführt (Siegel et al., 1996). Zudem aktivieren oberflächliche Heparansulfate durch Mechanotransduktion den NO-Signalweg (Yen et al., 2015). Die Endothelzelle sezerniert Autakoide wie den plättchenaktivierenden Faktor, Prostaglandine und Endothelin, welche unter anderem an der Plättchenkoagulation, Thrombolyse, Vasomotorik und Immunantwort beteiligt sind (Pohl und Busse, 1990, Sumpio et al., 2002).

Die Tunica media, bestehend aus glatten Muskelzellen und Elastinfasern, reguliert das Gefäßlumen. Die kontraktile Elemente Aktin und Myosin umgeben in länglichen Bündeln gitterförmig den

Nukleus, wodurch die Zelle während der Kontraktion eine rundliche Form annimmt (Silverthorn und Weber, 2009).

Die äußerste Gefäßwand (Tunica adventitia) ist eine elastische Schicht, die aus Bindegewebe mit eingebetteten Blutgefäßen und Nervenendigungen besteht (Pugsley und Tabrizchi, 2000).

Proteinkomplexe wie gap-, adherens- und tight junctions sind Bindeglieder zwischen zwei angrenzenden Zellen und dienen dem Zell-Zell-Kontakt (Dejana, 2004). Gap junctions weisen zwei Connexon-Einheiten auf, die aus jeweils sechs Untereinheiten (Connexine) bestehen. Über diesen Kanal erfolgt der zelluläre Austausch von Metaboliten, Ionen, sekundären Botenstoffen, H₂O und elektrischen Impulsen (Söhl und Willecke, 2004). Myoendotheliale gap junctions dienen der Übertragung von physikalischen (Calciumionen [Ca²⁺], Inositol-1,4,5-trisphosphat [IP₃]) und/oder elektrischen Stimuli (Übertragung von Depolarisation/Hyperpolarisation) von der Endothel- auf die glatte Muskelzelle (Félétou und Vanhoutte, 2009). Während adherens junctions zur Gewebestabilität beitragen, dichten tight junctions den Interzellularraum ab und erhalten die Zellpolarität (Dejana, 2004).

1.2.2.2 Vasoaktive Prozesse im vaskulären Gefäß

Die Relaxation der glatten Muskelzelle ist ein multifaktorieller Prozess, an dem mehrere Signalkaskaden parallel beteiligt sein können. Nachfolgend wird ein Überblick über die für diese Arbeit relevanten Signalwege gegeben.

1.2.2.2.1 Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalweg

Scherstress, Hormone und Wachstumsfaktoren induzieren die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche membranverankerte Phosphatidylinositole phosphoryliert. Das entstandene Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat besitzt eine Bindungsdomäne für die zytosolische Serin/Threoninkinase (Proteinkinase B/Akt), welche zur Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) am Ser 1177 (Aktivator-Domäne) befähigt ist (p-eNOS). Für H₂O₂ und Polyphenole aus schwarzem Tee ist darüber hinaus die Dephosphorylierung des Thr 495 (Inhibitor-Domäne) beschrieben (Schini-Kerth et al., 2010). Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an den genannten spezifischen Stellen erhöht die enzymatische Aktivität der eNOS (Anter et al., 2004). Zudem sind intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und die p38-mitogen-aktivierende Proteinkinase (p38-MAPK) gleichfalls Mediatoren des PI3K/Akt-Signalwegs (Anselm et al., 2007, Schini-Kerth et al., 2010). Die Funktionalität der eNOS wird ferner unabhängig vom PI3K/Akt-Signalweg reguliert. Bei einer physiologisch ausreichenden intrazellulären Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i bindet der Ca²⁺/Calmodulin-Komplex an ein Calmodulin-bindendes Motiv der eNOS. Dies ermöglicht einen Elektronenfluss von der Reduktase- zur Oxygenasedomäne, wodurch die aktivierte

eNOS nachfolgend NO produziert (Mc Cabe et al., 2000). Bei einem endothelial niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ unterbleibt die stimulusabhängige Bindung von Calmodulin an die eNOS (Ndiaye et al., 2005).

1.2.2.2 NO/cGMP-Signalweg

Furchgott und Zawadzki entdeckten 1980 einen vasodilatierenden Botenstoff, welcher dem Endothel entstammt und daher endothelium derived relaxing factor (EDRF) genannt wurde (Furchgott und Zawadzki, 1980). Unabhängig voneinander spekulierten Furchgott und Ignarro, dass EDRF und NO identisch seien, bis 1987 der Beweis dafür erbracht wurde (Ignarro et al., 1987, Palmer et al., 1987). Die Generierung von NO erfolgt durch NOS aus L-Arginin. Dabei fungieren Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und molekularer Sauerstoff als Ko-Substrate (Marletta, 1994). Die drei bekannten Isoformen sind aufgrund ihrer Lokalisation und Ca^{2+} -Abhängigkeit unterscheidbar. Sowohl die im Gehirn vorkommende neuronale als auch die in der Vaskulatur endothelial vorliegende NOS sind Ca^{2+} -abhängig. So stimulieren unter anderem Autakoide, der PI3K/Akt-Signalweg, $[Ca^{2+}]_i$, Ca^{2+} /Calmodulin oder Scherstress die eNOS zur Produktion von NO (Simon et al., 1999). Dieses diffundiert in die glatte Muskelzelle und aktiviert die lösliche Guanylylcyclase (sGC), welche Guanosintriphosphat in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt. Nachfolgend vermittelt die cGMP-abhängige Proteinkinase G die Senkung der $[Ca^{2+}]_i$, wodurch die glatte Muskelzelle dilatiert (Denninger und Marletta, 1999, Vanhoutte, 2004, Hun Kim et al., 2014). Die Expression der Ca^{2+} -unabhängigen induzierbaren NOS (iNOS) in Makrophagen/Monozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen initiieren inflammatorische Stimuli wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) (Karima et al., 1999).

1.2.2.3 Endothelium derived hyperpolarization factor

Neben dem NO/cGMP-Signalweg ist der endothelium derived hyperpolarization factor (EDHF) ein weiterer wichtiger vasodilatierender Signalstoff. Hierunter wird heute nicht ein einzelner Botenstoff verstanden, sondern vielmehr verschiedenartige endothelial freigesetzte Mediatoren. Beispielsweise seien Kohlenmonoxid, Schwefelwasserstoff, ROS, Peptide, Kaliumionen (K^+) aber auch Metabolite aus dem Arachidonsäurestoffwechsel genannt. Die endotheliale Hyperpolarisation und die nachgeschaltete Erregungsleitung zur glatten Muskelzelle erfolgt über die Aktivierung verschiedener K^+ -Kanäle (Félétou und Vanhoutte, 2009).

Eine große Rolle spielt dabei der endotheliale Ca^{2+} -aktivierte K^+ -(K_{Ca})-Kanal. Während der small-conductance (SK_{Ca})-Kanal an gap junctions benachbarter Endothelzellen vorkommt, tritt der intermediate-conductance (IK_{Ca})-Kanal bevorzugt an myoendothelialen gap junctions auf. Beide spannungsabhängige Kanäle ermöglichen einen endothelialen K^+ -Efflux, wodurch die Zellmembran der Endothel hyperpolarisiert. Die anschließende Übertragung auf die glatte Muskelzelle erfolgt über gap junctions und/oder die erhöhte interzelluläre Akkumulation von K^+ . Dies aktiviert K_{IR} -Kanäle und/oder die Na^+/K^+ -ATPase. Der resultierende intrazelluläre K^+ -Anstieg führt zum Senken des

$[Ca^{2+}]_i$, wodurch die glatten Muskelzelle relaxiert (Nelson und Quayle, 1995, Glitsch, 2001, Félétou und Vanhoutte, 2009).

Die zumeist glattmuskulär lokalisierten big-conductance-(BK_{Ca})-Kanäle sind häufig indirekt mit dem transient receptor potential vanilloid channel 4 (TRPV4) assoziiert. Der Ca²⁺-Influx via TRPV4 stimuliert auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) befindliche Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Dies induziert ein vermehrtes Freisetzen von Ca²⁺-Sparks, welche die Öffnungswahrscheinlichkeit von BK_{Ca}-Kanälen steigert. Der resultierende K⁺-Efflux führt zum Hyperpolarisieren der Zellmembran, wodurch voltage operated Ca²⁺ channels (VOCCs) und voltage dependent calcium channels (Ca_vs) schließen und der verminderte Ca²⁺-Influx zum Dilatieren der glatten Muskelzelle beiträgt (Sobey, 2001, Félétou und Vanhoutte, 2009).

1.2.2.2.4 Einfluss von Ca²⁺ und deren Rezeptoren

Ca²⁺ spielen im Hinblick auf den Gefäßtonus sowohl in der Endothel- als auch glatten Muskelzelle eine entscheidende Rolle. Während die physiologische intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration ca. 100 nM beträgt, liegt die extrazelluläre im mM Bereich (1-2 mM). Zelluläre Speicherorte für Ca²⁺ sind, neben dem endo-/sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR), die Mitochondrien (Clapham, 1995). Während die Aufnahme in die Mitochondrien über Diffusion und Ionenkanäle/-transporter erfolgt, pumpt die ATP-abhängige Ca²⁺-Pumpe (SERCA) kontinuierlich Ca²⁺ in das ER und SR (Berridge et al., 2003).

Endothelial erhöhte $[Ca^{2+}]_i$, die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Tyrosinkinase stimulieren die Phospholipase C, welche den second messenger IP₃ generiert. Sowohl IP₃ als auch Ca²⁺ induzieren über ER-membranäre IP₃-Rezeptoren sowie RyR eine intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung (Clapham, 1995, Lewis, 2007, Félétou und Vanhoutte, 2009). Dies steigert zum einen die Öffnungswahrscheinlichkeit der K_{Ca}-Kanäle, aktiviert zum anderen die eNOS (Griendling et al., 2000, Anter et al., 2004, Dal-Ros et al., 2009, Félétou und Vanhoutte, 2009).

Wie beschrieben ist für die Aktivierung der eNOS und der K_{Ca}-Kanäle ein endothelial erhöhter Ca²⁺-Spiegel erforderlich. Währenddessen das glattmuskuläre Relaxieren mit einer erniedrigten Ca²⁺-Konzentration im Zusammenhang steht. Das Dilatieren wird über mehrere Mechanismen gesteuert. Einerseits wird zytosolisches Ca²⁺ durch die SERCA in das ER/SR und durch die plasmamembranständige Ca²⁺-abhängige ATPase und den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in den Extrazellularraum gepumpt. Andererseits induziert das Hyperpolarisieren der glatten Muskelzellmembran das Schließen der VOCCs und Ca_vs, wodurch der Ca²⁺-Einstrom vermindert wird (vgl. Kapitel 1.2.2.2.3) (Webb, 2003, Félétou, 2011).

1.2.2.2.5 Reaktive Sauerstoffspezies

ROS kommen ubiquitär im humanen Organismus vor und umfassen eine Gruppe von Verbindungen, die radikalischen und nichtradikalischen Sauerstoff enthalten. Beispielfhaft seien das Superoxidanion

(O_2^-), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxyl-Radikal, das Hydroperoxyl-Radikal, das Peroxyl-Radikal, die Hypochlorige Säure und das Ozon genannt. Das NO und das Peroxynitrit-Anion werden den reaktiven Stickstoffspezies zugeordnet (Cai und Harrison, 2000, Touyz und Schiffrin, 2004). Das O_2^- spielt physiologisch als auch pathophysiologisch eine Schlüsselrolle. Eine Quelle ist unter anderem die NADPH-Oxidase, welche NADPH oxidiert und das Elektron auf molekularen Sauerstoff transferiert (Griendling et al., 2000). Die Reduktion des O_2^- zu H_2O_2 erfolgt spontan oder mittels Superoxiddismutase (SOD) (Faraci und Didion, 2004, Touyz und Schiffrin, 2004). Aufgrund der agonistischen Effekte von O_2^- und H_2O_2 auf die MAPK und die Proteinkinase B und C, nehmen diese einen indirekten Einfluss auf das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Apoptose, auf zelluläre Redox-sensitive Prozesse und den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Griendling et al., 2000, Touyz und Schiffrin, 2004). Ferner wird die Expression inflammatorischer Mediatoren durch Aktivierung des nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B) gefördert (Karima et al., 1999).

1.2.2.3 Pathogenese der endothelialen Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion liegt z.B. bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose, Bluthochdruck und koronarer Herzkrankheit vor. Ein Kennzeichen ist die verminderte Bioverfügbarkeit von NO infolge einer eingeschränkten eNOS-Aktivität und/oder eines vermehrten Abfangens durch ROS (Cai und Harrison, 2000, Félétou und Vanhoutte, 2009, Hun Kim et al., 2014). Aufgrund des NO-Mangels ist das vaskuläre Gleichgewicht zugunsten der Vasokonstriktion verschoben (Davignon und Ganz, 2004). Oftmals treten zusätzlich proinflammatorische, proliferative und prokoagulative Prozesse auf, die die gesamte arterielle Gefäßwand betreffen. Auch das vermehrte Vorhandensein und verstärkte Ansprechen auf endothelium derived contracting factors wie Endothelin, Thromboxan A2 und Prostaglandin H2 tragen zur Konstriktion bei (Virdis et al., 2010). Ferner stimulieren Endothelin und Angiotensin II die glatte Muskelzellproliferation und die Plaquebildung (Davignon und Ganz, 2004). Ein weiterer Mediator ist oxidativer Stress (Sies, 1991). Eine über das physiologische Maß hinaus gesteigerte Produktion an ROS liegt z.B. bei einer vermehrten Expression der NADPH-Oxidase vor (Hun Kim et al., 2014). Selbst die eNOS generiert ROS, insofern ein Mangel des Ko-Faktors Tetrahydrobiopterin und/oder des Substrates L-Arginin vorliegt (Félétou, 2011). Des Weiteren sind im kleineren Ausmaß die Xanthin-Oxidase, die Cyclooxygenasen, das Cytochrom P450 und die mitochondriale Atmungskette ROS-Lieferanten (Taniyama und Griendling, 2003, Sarr et al., 2006, Virdis et al., 2010).

1.2.2.4 Therapie

Eine effektive Behandlung einer fortschreitenden Degeneration des arteriellen Gefäßsystems gibt es zurzeit nicht, da bereits eingetretene Veränderungen nur zum Teil reversibel sind. Als primäres Ziel gilt es gefäßverändernde Risikofaktoren wie z.B. Diabetes, Hypertonie und Hypercholesterinämie

optimal zu therapieren. Auch die Normalisierung des Gewichts und der Verzicht auf Nikotin leisten einen Beitrag. Neben Beta-Blockern, ACE-Hemmern und Statinen werden gefäßerweiternde Wirkstoffe wie Glyceroltrinitrat eingesetzt (Dietz und Rauch, 2003). Körper eigene Esterasen spalten dieses, wodurch Nitrit und letztlich NO entsteht. Von Nachteil ist, dass kein direkter Einfluss auf die Progression der jeweiligen Grunderkrankung genommen werden kann und bei kontinuierlicher Gabe eine sogenannte Nitrattoleranz auftritt. Aufgrund dessen erfolgt der Einsatz nitrobasierter Wirkstoffe bevorzugt in Akutstadien. Möglicherweise bietet der Einsatz von Polyphenolen eine Ergänzung zu den etablierten Behandlungsstrategien. Erste Hinweise bzgl. eines vasodilatatorischen Potentials werden in Kapitel 1.2.2.5 aufgeführt.

1.2.2.5 Polyphenole als vasodilatatorische Agenzien

Studien belegen, dass Polyphenole unterschiedlicher chemischer Struktur an vorkontrahierten Arteriensegmenten verschiedener Spezies eine konzentrationsabhängige Vasodilatation induzieren (Martin et al., 2002, Ndiaye et al., 2003, Nagaoka et al., 2007). Neben endothelabhängigen wurden endothelunabhängige Relaxationen beschrieben, wenn auch in höheren Konzentrationen (Novakovic et al., 2006, Gojkovic-Bukarica et al., 2008, Kaufeld, 2015). Die Vielzahl der endothelvermittelten Dilatationen erfolgen über den PI3K/Akt-, den NO/cGMP- und/oder den EDHF-Signalweg. Nachfolgend werden hierzu einige Beispiele aufgeführt.

Ndiaye et al. (2005) belegten mithilfe von Organbadstudien für Rotweinpolyphenole eine Redox-sensitive, endothelabhängige Relaxation über den PI3K/Akt-Signalweg. Dies erfolgte unter Verwendung des PI3K-Inhibitors Wortmannin. Komplementierende Western-Blots zeigten eine Akt-abhängige Phosphorylierung der eNOS am Ser 1177 und Dephosphorylierung am Thr 495. In Zellkulturstudien konnte mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie eine endotheliale NO-Produktion und mithilfe eines Immunoassays ein gesteigerter cGMP-Spiegel nachgewiesen werden. In Ergänzung dazu dokumentierten Martin et al. die Beteiligung von Ca^{2+} an der Rotweinpolyphenol-induzierten Vasodilatation. So zeigten Endothelzellen der Rinderaorta in Anwesenheit dieser Polyphenole einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (Martin et al., 2002). Für Schwarztee polyphenole konnte eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Induktion der eNOS nachgewiesen werden (Anter et al., 2004). Auch das Flavon Apigenin zeigte eine Aktivierung der eNOS, welche von intra- und extrazellulären Ca^{2+} abhängig war (Chen et al., 2010). Organbadstudien in Anwesenheit der K_{Ca} -Kanal-Inhibitoren Charybdotoxin (CTX) und Apamin belegen eine Rotweinpolyphenol-induzierte Vasodilatation über den EDHF-Signalweg. Forscher vermuteten die Beteiligung von Redox-sensitiven Prozessen, welche durch Experimente mit dem SOD-Mimetikum MnTMPyP bestätigt wurden. Zudem erfolgte in kultivierten Endothelzellen in Anwesenheit von Rotweinpolyphenolen der Nachweis einer O_2^- -Generierung. Ndiaye et al. (2003) postulierten als mögliche Quellen die Flavin-abhängige NADPH-Oxidase und die eNOS.

Neben den exemplarisch beschriebenen endothelabhängigen Vasodilatationen wurde für das polyphenolische Phytoalexin Resveratrol eine endothelunabhängige Relaxation dokumentiert. So konnte an Arterien mit entferntem Endothel ein Resveratrol-induziertes Relaxieren in Gegenwart des K_v-Kanal-Inhibitors 4-AP inhibiert werden (Novakovic et al., 2006, Gojkovic-Bukarica et al., 2008).

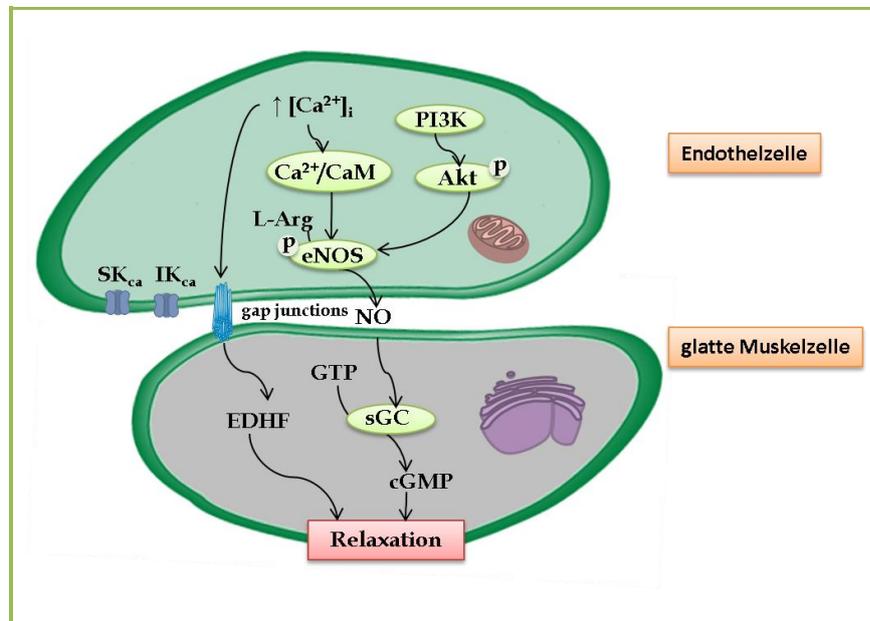


Abb. 8 Überblick über die vasorelaxierenden Signalkaskaden
(adaptiert nach Hun Kim et al., 2014)

1.2.3 Vasoprotektives Potential von Polyphenolen

1.2.3.1 Lipopolysaccharid und Pathogenese der endothelschädigenden Wirkung

Das Endotoxin LPS ist auf der äußeren Zellwand von gram-negativen Bakterien lokalisiert. Es besteht aus einer polysaccharidhaltigen Kernregion, einer Polysaccharid- (O-Antigen) und einer Lipid-Komponente (Lipid A) (Raetz und Whitfield, 2002). Die differierende Zusammensetzung und Länge des O-Antigens wird zur Identifizierung der Bakterienstämme genutzt. Das Lipid A ist der pathogene Anteil, welcher im Kontakt mit humanen Zellstrukturen unter anderem Fieber und Entzündungen hervorruft (Morrison und Ulevitch, 1978).

Bei einer Sepsis gelangen kontinuierlich Bakterien aus einem Infektionsherd in die Vaskulatur. Erreger sind zumeist gram-negative Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*). Durch die Immunantwort werden die Krankheitserreger abgetötet und setzen beim Zerfall unter anderem das LPS frei (Raetz und Whitfield, 2002). Vaskulär zirkulierende LPS-bindende Proteine binden dieses und erleichtern so die Wechselwirkung mit CD14-Rezeptoren von Makrophagen/Monozyten (Schumann et al., 1990). Die Bindung an lösliche CD14-Rezeptoren aktiviert Endothelzellen, die über keine CD14-Rezeptoren verfügen. Des Weiteren erfolgt bei einer hohen LPS-Konzentration eine CD14-unabhängige Stimulation (Karima et al., 1999). Intrazellulär aktivieren Tyrosin-, MAP- und PI3-Kinasen die I_kB-

Kinase, welche die NF κ B-Untereinheiten p50/p65 phosphoryliert. Die nachfolgende Ubiquitinierung initiiert den Abbau des NF κ B-Komplexes. Der so freigesetzte p50/p65-Komplex induziert unter anderem die nukleäre iNOS-Expression (Aktan, 2004). Die überschießende posttranslationale NO-Produktion löst ein starkes Relaxieren des Gefäßes aus, woraus ein reflektorischer Blutdruckabfall mit stark erhöhtem Puls resultieren kann (Karima et al., 1999).

Zudem stößt das Endotoxin LPS die ROS-Generierung an. Aus der Reaktion von O $_2^-$ mit NO geht das Peroxynitrit-Anion hervor, welches stark zytotoxisch ist. Es treten Schädigungen an der Zellmembran und an membranständigen Rezeptoren auf. Durch die Nitrosylierung glattmuskulärer K $_{ATP}$ -Kanäle steigt deren Öffnungswahrscheinlichkeit. Der resultierende K $^+$ -Efflux führt zum Hyperpolarisieren und anschließend zum glattmuskulären Dilatieren (Karima et al., 1999, Landry und Oliver, 2001, Touyz und Schiffrin, 2004). Weiterhin führt eine LPS-Exposition zu einem verminderten zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegel und einer Inaktivierung des small GTPase Rac1. Beides steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Membranpermeabilität (Schlegel et al., 2012).

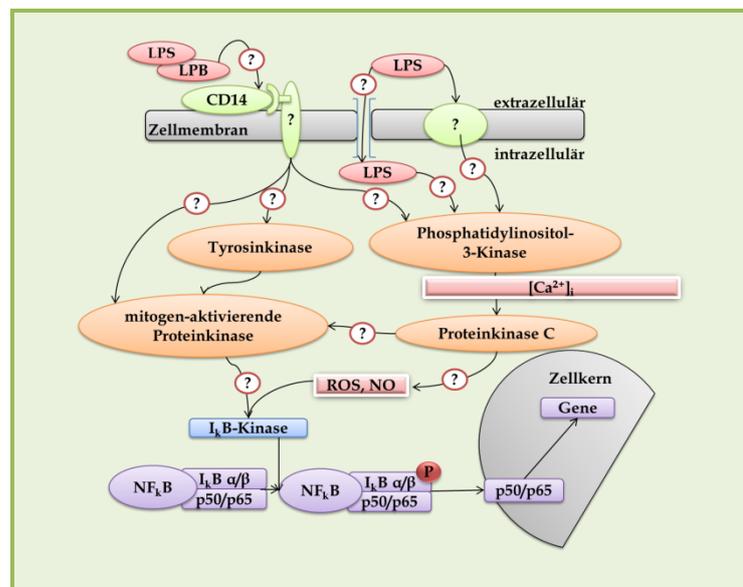


Abb. 9 Signalwege LPS-vermittelter iNOS-Expression
(adaptiert nach Karima et al., 1999)

1.2.3.2 Therapie

Gemäß der S2-Leitlinie liegt ein Schwerpunkt der Sepsis-Therapie auf der Antibiotika-Gabe (Reinhart K. et al., 2010). Allerdings häufen sich die Resistenzentwicklungen gram-negativer Bakterien wie z.B. *E. coli* gegenüber den Standardtherapeutika (World Health Organization, 2014). Im Gegensatz dazu erfolgten in den letzten Jahren immer weniger Zulassungen von Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen. Ein weiterer Ansatz sind die supportiven sowie adjuvanten Maßnahmen. So soll die Supplementation mit Antioxidantien oxidativen Stress vermindern und somit der Schädigung der endothelialen Barriere vorbeugen (Karlsen et al., 2007, Reinhart K. et al., 2010). Schwer behandelbar ist

der reflektorische Blutdruckabfall, welcher sich weder durch die Gabe von vasoaktiven Substanzen noch durch die intravenöse Flüssigkeitsgabe kompensieren lässt. Aufgrund dieser nicht zufriedenstellenden, zum Teil wenig effektiven Therapieoptionen ist es erforderlich neue Alternativen zur Behandlung einer gramnegativen Sepsis zu finden. Im Hinblick auf die bereits belegten antiinflammatorischen und vasoprotektiven Eigenschaften bietet die Stoffgruppe der Polyphenole ideale Voraussetzungen (vgl. Kapitel 1.2.3.3).

1.2.3.3 Polyphenole als vasoprotektive Agenzien

Shapiro et al. (2009) listen eine Reihe von polyphenolischen Substanzen auf, die einen therapeutischen Einfluss auf eine Sepsis aufweisen. So wurde unter anderem die Hemmung der I κ B-Kinase und der Transkription proinflammatorischer Gene in der NF κ B-Signalkaskade belegt (Shapiro et al., 2009). *In vitro*- und *in vivo*-Studien dokumentieren eine signifikante Inhibition der LPS-induzierten iNOS-Expression durch die prophylaktische Gabe der Flavonoide Rutin, Wogonin oder Quercetin (Shen et al., 2002). Ähnliches wurde für Teepolyphenole beschrieben. In Ergänzung dazu konnte die Hemmung der Lipidperoxidation nachgewiesen werden (Yuan et al., 2006). Eingehende Experimente zeigten, dass hierfür das in Teepolyphenolen enthaltene Epigallocatechin-3-O-gallat verantwortlich war (Lin et al., 1999). Die Forschergruppe um Al-Shalmani dokumentierte an Arterienringen des Schweins die Aufhebung LPS-induzierter gefäßschädigender Effekte durch Quercetin. Neben der Inhibition der I κ B-Kinase wurde die Stabilisierung des NF κ B/I κ B-Komplexes postuliert (Al-Shalmani et al., 2011). Im Rahmen von Studien an Endothelzellen der Rinderaorta konnte eine Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität durch verschiedene Flavonoide nachgewiesen werden (Melzig und Loose, 1998).

Neben den antiinflammatorischen Eigenschaften vermögen Polyphenole freie Radikale abzufangen. Der protektive Charakter wird unter anderem dem Scavenging von ROS zugeschrieben (Shapiro et al., 2009). Laut Rahman et al. basiert das antioxidative Potential der Flavan-3-ole auf der Di- oder Trihydroxylierung (B-Ring) und den Hydroxygruppen an C-5 und C-7 (A-Ring) (Rahman et al., 2006). Die 3-O-Galloylierung führte wie bei Epi(gallo)catechin-3-O-gallat zur Steigerung des protektiven Potentials (Schewe et al., 2008). Eine Übertragbarkeit der *in vitro*-Aktivität auf *in vivo* sollte mit Vorsicht geschehen. Im Vergleich zu den Radikalfängern Vitamin C oder Glutathion sind die Blutplasmaspiegel polyphenolischer Substanzen trotz hoher oraler Dosierung 100-1.000-fach niedriger. Zudem besitzen polyphenolische Stoffwechselmetabolite niedrigere Radikalfänger-Eigenschaften als deren Muttersubstanz. Aufgrund dessen wird dem Einfluss auf NF κ B-Signalkaskade eine größere Rolle zugemessen als dem antioxidativen Potential (Rahman et al., 2006).

1.3 Zielsetzung

Polyphenole sind ubiquitäre Pflanzeninhaltsstoffe mit einem breiten Spektrum an pharmakologischen Aktivitäten. Die traditionelle und medizinische Verwendung von verschiedenen Pflanzenzubereitungen wird vielfach mit dem Vorkommen polyphenolischer Sekundärstoffe in Verbindung gebracht. Ziel dieser Arbeit ist die Durchführung von Aktivitätsstudien mit Naturstoffen aus der Gruppe der Flavan-3-ole und der Proanthocyanidine. Das besondere Augenmerk liegt auf der Hemmung einer bakteriellen bzw. viralen NA und den vasorelaxierenden/vasoprotektiven Eigenschaften.

In einem ersten Teil sollte zunächst der MuNANA-Fluoreszenz-Assay, ein etabliertes Testsystem zur Ermittlung des NA-inhibierenden Potentials von Substanzen, kritisch betrachtet werden. Um ein Screening einer Testreihe gegenüber einer *V. cholerae* und Influenzavirus A NA zuverlässig durchführen zu können, sollte zuvor die Umsetzung des fluorogenen Substrates MuNANA durch die bakterielle bzw. virale NA geprüft und, falls erforderlich, das Testsystem optimiert werden. Im Anschluss sollte mithilfe des validen Assays die inhibitorische Aktivität einer Serie von Proanthocyanidinen, Flavan-3-olen, Ellagitanninen und Benzoessäurederivaten ermittelt und Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Ein weiteres Ziel sollte die Untersuchung von Wirkstoffkombinationen bestehend aus dem Standardtherapeutikum Zanamivir und einer polyphenolischen Testsubstanz (EPs® 7630) sowie die Nutzungsbewertung dieser Kombination sein.

In silico-Studien sollten einen unterstützenden Beitrag im Falle von differierenden *in vitro*-Daten aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay gegenüber der *V. cholerae* und Influenzavirus A NA leisten. Unabhängig davon sollten die Proteinfaltung des bakteriellen und viralen Enzyms sowie die Wechselwirkungen der NA-Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivircarboxylat in der jeweiligen Bindungstasche eingehender analysiert werden. Angesichts fehlender Röntgenstrukturdaten für Kokristallate aus einer *V. cholerae* NA und den therapeutisch genutzten NA-Inhibitoren sollten diese in Anlehnung an gewonnene Datensätze für virale NA-Inhibitor-Komplexe generiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte mithilfe von Organbadstudien das vasorelaxierende und vasoprotektive Potential von chemisch definierten proanthocyanidinreichen Fraktionen und einigen flavanoiden Reinsubstanzen an isolierten Koronararterien des Schweins überprüft werden. Hierzu ist angedacht, die Testsubstanzen zunächst auf eine endothelvermittelte vasodilatierende Eigenschaft zu prüfen. Um Einblick in die zugrunde liegende(n) Signalkaskade(n) zu erhalten, ist die Verwendung von geeigneten Inhibitoren und Mimetika angestrebt. In ergänzenden Experimenten sollte zudem die endothelunabhängige Relaxation betrachtet werden.

In einer modifizierten Organbadstudie sollten die vasoprotektiven Effekte proanthocyanidinreicher Fraktionen beurteilt werden. Ausgehend von der Überlegung, dass eine Inkubation mit einem LPS eine vaskuläre iNOS-Produktion und eine Endotheldegeneration induziert, ist es von Interesse zu

eruiieren, inwieweit durch paralleles Einwirken von Testsubstanzen der gefäßschädigende Effekt aufgehoben wird.

Die Ergebnisse der angestrebten pharmakologischen Experimente sollen einen weiteren wertvollen Beitrag zum besseren Verständnis dieser biologischen Aktivitäten liefern.

Material & Methoden

2 Materialien und Methoden

2.1 Apparative Gerätschaften und Software

Gerät	Hersteller
96-Well-Platten	<ul style="list-style-type: none"> Microfluor black plate, flat bottom, VWR GmbH (Dresden, Deutschland)
Gefrierschränke: -20 °C; -80 °C	<ul style="list-style-type: none"> Bosch electronic (Reutlingen, Deutschland)
Kühlschränke	<ul style="list-style-type: none"> Bosch electronic (Reutlingen, Deutschland) Gorenje RK6202BC (München, Deutschland)
Laborinkubator	<ul style="list-style-type: none"> Biosafe Plus, Integra Biosciences GmbH (Fernwald, Deutschland)
Organbad	<ul style="list-style-type: none"> Einkammer-Organbad, 20 mL, temperierbar, TSE (Bad Homburg, Deutschland) Einhängethermostat Thermo Haake DC10-B3, Haake Technik GmbH Verden (Verden, Deutschland) Elektromechanischer Druckumwandler, Transducer TF6V5, Fleck (Mainz, Deutschland) Verstärker, Transducer Coupler 4711, TSE (Bad Homburg, Deutschland) Vierkanal-x/t-Kompensationsschreiber, Siemens (München, Deutschland) Organbadhäkchen, Edelstahl, d= 0,3 mm (Eigenanfertigung)
Plattenphotometer	<ul style="list-style-type: none"> Infinite F200, Tecan Group GmbH (Männedorf, Schweiz)
Pipetten	<ul style="list-style-type: none"> 0,2-5000 µL Einkanal- und Mehrkanalpipetten unterschiedlicher Hersteller (u.a. Discovery, Eppendorf)
Präparierbesteck	<ul style="list-style-type: none"> Scheren und Pipetten aus rostfreiem Stahl, Carl Teufel GmbH und Co. KG (Emmingen-Liptingen, Deutschland)
Genexpression, Proteinreinigung, Kristallisation	<ul style="list-style-type: none"> AGT-1 (700-7005)-Mini Easigel Horizontal, VWR GmbH, (Dresden, Deutschland) CrystalQuick™plates, Greiner-Bio-One (Kremsmünster, Österreich) Electrophoresis Unit, VWR GmbH (Dresden, Deutschland) AGT-2 (700-7251)-Submarine Gel Tank, VWR GmbH (Dresden, Deutschland) Amicon Ultra, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) ÄKTA™FPLC, GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland) Gryphon, Art Robbins Instruments (Sunnyvale, CA, USA) Horizontal AGT1, VWR GmbH (Dresden, Deutschland) HiPrep™ 26/10, GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland) LEX™-System, Harbinger Biotechnology and Engineering Corporation (Toronto, Canada) Rock Imager 1000, Formulatrix (Bedford, MA, USA) 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland) viewseal Abdeckfolie, transparent, Greiner-Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Sterilwerkbank	<ul style="list-style-type: none"> Techno Flow 2 F 120 II GS, Integra Biosciences GmbH (Fernwald, Deutschland)

Gerät	Hersteller
Sonstiges	<ul style="list-style-type: none"> • Digital pH-Meter, Knick Elektronische Messgeräte GmbH und Co. KG (Berlin, Deutschland) • Heizplatte/Magnetrührer, IKA Works Werke (Staufen, Deutschland) • Minishake KMS1, IKA Works Werke (Staufen, Deutschland) • Wasserbad, Dinkelberg-Labortechnik (Ulm, Deutschland)
Trockenschrank	<ul style="list-style-type: none"> • Trockenschrank APT Line, Binder GmbH, (Tuttlingen, Deutschland) • Trockenschrank Heraeus T6030, Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Ultraschallbad	<ul style="list-style-type: none"> • Sonorex Super RK 106, Sonorex RK 100, Sonoplus HD 2200, Bandelin electronic GmbH und Co. KG (Berlin, Deutschland)
Waagen	<ul style="list-style-type: none"> • Sartorius Analytic A200S-**D und Sartorius Präzisionswaage AW4202, Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) • Mettler Toledo, Typ: XP6, MX/UMX Waage, Mettler Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)

Software	Hersteller/Referenz
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH (Dublin, Irland)
ChemBioDraw	PerkinElmer (Cambridge, MA, USA)
COOT	http://www.yasbl.ac.uk/emsley/coot/
Endnote X7	Thomson Reuters (New York, NY, USA)
Microsoft Excel 2010	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Microsoft Powerpoint 2010	
Microsoft Word 2010	
MOE	Chemical Computing Group (Montreal, Quebec, Kanada)
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
PHASER	Phaser Scientific Software, LLC
PyMol 1.3	DeLano Scientific (San Francisco, USA)
SPSS 20.0	IBM (Endicott, WA, USA)

2.2 Chemikalien

Substanz	chemischer Name der Kurzbezeichnungen	Hersteller
1400W	<i>N</i> -[3-(Aminomethyl)-phenyl]-methyl]-ethanimidamide-dihydrochlorid	Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
	2,6-Dihydroxybenzoesäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
2-ABP	2-Aminoethoxydiphenylborat	Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
4-Aminopyridin		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
	4-Hexen	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Allopurinol		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumpersulfat		AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumsulfat		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Apamin		Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Apocynin (Acetovanillon)		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
„Bad stabil“		neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Benzonase		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Bradykinintriacetat		Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Bromphenolblau- Natriumsalz		AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
(+)-Catechin		Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
(+)-Catechin-3- <i>O</i> -gallat		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Carbenoxolon		Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Carbogen		Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland)
Carpinusin*		
Casuariin*		

Substanz	chemischer Name der Kurzbezeichnungen	Hersteller
Charybdotoxin		Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Complete Mini EDTA-freier Proteaseinhibitor		Roche (Mannheim, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue G-250		AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
DMSO	Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
D-Glucose-Monohydrat		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
DTT	DL-Dithiothreitol	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (D3)		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
(-)-Epicatechin		Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)
(-)-Epicatechin-3-O-gallat		AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
(-)-Epigallocatechin		Alfa Aesar GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
(-)-Epigallocatechin-3-O-gallat		Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Essigsäure		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (96 %)		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
(+)-Gallocatechin		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
(+)-Gallocatechin-3-O-gallat		Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)
Gallussäure		Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Geraniin*		
Glycerol		AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Granatin A*		
Hefeextrakt		AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
ICI 182,780	(7a)-[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)-sulfinyl]-nonyl]-estra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol	Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Indometacin		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Substanz	chemischer Name der Kurzbezeichnungen	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
L-NAME	N ^G -Nitro-L-argininmethylester	Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Lipopolysaccharid von <i>Escherichia coli</i> 0111:B4		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Magnesiumsulfatheptahydrat		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methanol		Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Milrinon		Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
MnTMPyP	Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-porphyrin	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
	4-Methylumbelliferon	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
MuNANA	2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetylneuraminsäure	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Deutschland)
Natriumchlorid		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Neuraminidase, bakteriell Expressionswirt: <i>Vibrio cholerae</i>		Roche (Mannheim, Deutschland)
Neuraminidase, viral Influenzavirus A/California/04/2009 [H1N1]; Expressionswirt: <i>Baculovirus</i>		BioTrend Chemikalien GmbH (Köln, Deutschland)
Oseltamivircarboxylat		Roche (Ludwigshafen, Deutschland)
Paeonianin C*		
Procyanidin B2	Epicatechin-[4 β ,8]-Epicatechin	Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland)
Procyanidin B2-3-O-gallat	Epicatechin-[4 β ,8]-Epicatechin-3-O-gallat	TransMIT (Giessen, Deutschland)
Procyanidin B3	Catechin-[4 α ,8]-Catechin	Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland)
Procyanidin C1	Epicatechin-[4 β ,8]-Epicatechin-[4 β ,8]-Epicatechin	Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland)

Substanz	chemischer Name der Kurzbezeichnungen	Hersteller
ODQ (TEMED)	1 <i>H</i> -[1,2,4]oxadiazolo[4,3- <i>a</i>] chinoxalin-1-on	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Rotenon		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) Lösung aus Acrylamid und <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid		Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ryanodin		Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Salbutamol		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
SB203580	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinyl-phenyl)-5-(4-pyrididyl)-1 <i>H</i> -imidazol	Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
SDS	Sodiumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Shikimisäure		Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Source30Q		GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
Substanz P	Arg-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TEA	Tetraethylammoniumchlorid	Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
Terchebin*		
Tiron	Brenzcatechin-3,5-disulfonsäure Dinatriumsalz	TCI (Bad Soden am Taunus, Deutschland)
TRAM 34	1-[(2-Chlorophenyl)-diphenylmethyl]-1 <i>H</i> -pyrazol	Tocris Bioscience Joins R&D Systems (Bristol, Großbritannien)
TRIS-Base (99,9 %)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloride	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Trypton		AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
U46619	9,11-Dideoxy-11 <i>a</i> ,9 <i>a</i> -epoxymethanoprostaglandin F2 <i>a</i>	Upjohn Company (Kalamazoo, MI, Vereinigte Staaten von Amerika)
Vescalagin*		
Wortmannin	(1 <i>S</i> ,6 <i>bR</i> ,9 <i>aS</i> ,11 <i>R</i> ,11 <i>bR</i>) 1-(Methoxymethyl)-9 <i>a</i> ,11 <i>b</i> -dimethyl-3,6,9-trioxo-1,6,6 <i>b</i> ,7,8,9,9 <i>a</i> ,10,11,11 <i>b</i> -decahydro-3 <i>H</i> -furo[4,3,2- <i>de</i>] indeno[4,5- <i>h</i>]-isochromen-11yl acetat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Substanz	chemischer Name der Kurzbezeichnungen	Hersteller
Zanamivir (Relenza®)		GlaxoSmithKline (London, Großbritannien)

* Herzlicher Dank gilt Herrn Professor Takashi Yoshida, Okayama University, Japan, für die Überlassung der Ellagitannine.

2.3 Kits

Kit	Hersteller
JBScreen PEG/Salt	Jena Bioscience GmbH (Jena, Deutschland)
PACT	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Classic Lite	

2.4 Wasser

Für die Experimente wurde durch Destillation gewonnenes Wasser (*aqua dest.*) verwendet.

2.5 Proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen

Tab. 1 Auswahl proanthocyanidinhaltiger Extrakte/Fraktionen

proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen		Polyphenol-Bausteine	Quelle
<i>Pelargonium sidoides</i>	EPs® 7630* EPs® 7630 Fraktion*	oligomere Prodelphinidine	(Kayser und Kolodziej, 1995, Schötz und Nöldner, 2007)
<i>Betula</i> spp.	Fraktion	di- bis oligomere Procyanidine (Epi-/Catechin-Einheiten)	(Kolodziej, 1989)
<i>Salix</i> spp.		di- bis oligomere Procyanidine (Catechin-Einheiten)	(Kolodziej, 1990)
<i>Nelia meyeri</i>		di- bis oligomere Procyanidine (Epicatechin-Einheiten)	(Kolodziej, 1984)
<i>Diospyros kaki</i>		Prodelphinidine mit Procyanidin-Anteilen	(Li et al., 2010)
<i>Rhus leptodictya</i>		Profisetinidine	(Viviers et al., 1983)
<i>Cephalophyllum</i> spp.		di- bis oligomere Procyanidine (Epicatechin-Einheiten)	Botanischer Garten Hamburg
<i>Potentilla erecta</i>		di- bis oligomere Procyanidine (Epi-/Catechin-Einheiten)	(Schleep et al., 1986)

* Mit freundlicher Unterstützung durch die Firma Dr. Wilmar Schwabe GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bereitgestellt.

Wenn nicht anders vermerkt wird fortan von 2,3-*cis*-*Nelia*-Procyanidinen (Fraktion aus *N. meyeri*), 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidinen (Fraktion aus *Salix* spp.) und *Diospyros*-Proanthocyanidinen (Fraktion aus *D. kaki*), *Cephalophyllum*-Procyanidine (Fraktion aus *Cephalophyllum* spp.), *Potentilla*-Procyanidine (Fraktion aus *Potentilla erecta*, *Betula*-Procyanidine (Fraktion aus *Betula* spp.), *Rhus*-Profisetinidine (Fraktion aus *R. leptodictya*) gesprochen.

2.6 Untersuchungen zur Inhibition der *V. cholerae* Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1) (MuNANA-Fluoreszenz-Assay)

2.6.1 Vorbereitung und Durchführung

Reagenzien und Testsubstanzen

Die lyophilisierte 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetylneuraminsäure (MuNANA) wurde mit *aqua dest.* auf 1 mM verdünnt, aliquotiert und bei -22 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer) wurde auf 32,5 mM MES, 4 mM CaCl₂ und einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt. Vor jedem Einsatz wurde die kommerzielle *V. cholerae* NA (1 U) mit MES-Puffer 1:10 verdünnt. Die *Baculovirus* exprimierte NA (Influenzavirus A/California/04/2009 [H1N1]) wurde mit *aqua dest.* auf 80-120 mU/mL (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH= 7,4, 10 % Glycin) eingestellt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Stammlösungen der Testsubstanzen (0,1-10 mg/mL) wurden mit MES-Puffer, Ethanol (96 %)/*aqua dest.* oder Dimethylsulfoxid (DMSO)/*aqua dest.* (2:10, V/V) hergestellt. Verdünnungen fanden mit MES-Puffer statt. Separate Messreihen ($n \geq 3$) schlossen einen Lösungsmiteleinfluss aus. Die Zusammensetzung der Wirkstoffkombinationen wurden durch die diagonal constant ratio-Methode (Tab. 2) ermittelt. Die jeweilige Kombination und die Einzelsubstanzen wurden parallel vermessen.

Tab. 2 Diagonal constant ratio-Methode

Einzelsubstanz 1							
Einzelsubstanz 2		0	0,25 x IC ₅₀	0,5 x IC ₅₀	IC ₅₀	2 x IC ₅₀	4 x IC ₅₀
	0						
	0,25 x IC ₅₀		x				
	0,5 x IC ₅₀			x			
	IC ₅₀				x		
	2 x IC ₅₀					x	
	4 x IC ₅₀						x

(adaptiert nach Chou, 2006)

Durchführung

Pro Well einer schwarzen 96-Well-Mikrofluorplatte wurden 60 μ L MES-Puffer, 10 μ L *V. cholerae* NA sowie 10 μ L der jeweiligen Testsubstanzkonzentration pipettiert. Die Initiierung der Reaktion erfolgte nach 1-minütigem Schütteln und 2-minütiger Inkubation durch Zugabe von 20 μ L MUNANA-Lösung (1 mM). Unter Verwendung der viralen NA wurden die μ L-Mengen halbiert. Folgende Kontrollen (Ktr) wurden parallel mitgeführt:

<u>Blindwert:</u>	NA-Ersatz durch MES-Puffer; Eigenfluoreszenz des MES-Puffers, der Testsubstanz und der MuNANA-Lösung
<u>Negativkontrolle:</u>	Testsubstanz-Ersatz durch MES-Puffer; ungehemmte Enzymaktivität (100 %)
<u>Positivkontrolle:</u>	Ersatz der Testsubstanz durch Zanamivir/Oseltamivircarboxylat
<u>Lösungsmittelabgleich:</u>	Eigenfluoreszenz des MES-Puffers bzw. des MES-Puffers in Kombination mit bakterieller/viraler NA

Nach dem 10-sekündigen Durchmischen erfolgte über 14 min alle 120 s eine Fluoreszenzmessung. Zur Optimierung der Inkubationszeit fanden Experimente mit verlängertem Testsubstanz-NA-Kontakt (5 min bzw. 11 min) statt. Alle Messungen (Infinite F200, Software i-Control, 1.10.) erfolgten unter folgenden Einstellungen:

Anregungs-/Emissionswellenlänge:	360/465 nm
Anzahl der Blitze:	5
Temperatur:	37 °C
Spaltgröße:	40

2.6.2 Auswertung

Die Quantifizierung der NA-Inhibition erfolgte über die relative Fluoreszenzeinheit (rFU), welche umgekehrt proportional zur Konzentration der Testsubstanz ist. Nach Subtraktion des Blindwertes bzw. des Lösungsmittelabgleiches von den Messdaten erfolgte die graphische Darstellung der rFU gegen die Zeit. Die erhaltenen Steigungen (m) wurden in das prozentuale Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt und gegen die Konzentration abgebildet. Aus den gewonnenen Daten wurde der IC_{50} -Wert bestimmt.

Für die Auswertung der Messdaten der Wirkstoffkombinationen wurden die Konzentrations-Wirkungskurven der Einzelsubstanzen sowie der Wirkstoffkombination in das doppelt-logarithmische mittlere Wirkungsdiagramm transformiert. Die mittleren Effektparameter (Steigung [m], Schnittpunkt Abszisse [b], Regressionskoeffizient [r]) dienten der Ermittlung der mittleren Wirkstoffdosis (D_m) (Tab. 3).

$$D_m = 10^{-\left(\frac{b}{m}\right)} \quad (1)$$

Der Begriff Dosis (D) wird nach Chou definiert und ist ein berechneter Wert, der keiner Mengenangabe entspricht.

Tab. 3: Mittlere Effektparameter

Einzelsubstanz 1	Einzelsubstanz 2	Wirkstoffkombination
b_1	b_2	$b_{1,2}$
m_1	m_2	$m_{1,2}$
$(r)_1$	$(r)_2$	$(r)_{1,2}$

Steigung (m), Schnittpunkt Abszisse (b) und Regressionskoeffizient (r) der Einzelsubstanzen und der Wirkstoffkombination

Mittels der mittleren Wirkungsgleichung (Formel 3) wurden die Parameter f_a (engl.: fraction affected) bzw. f_u (engl.: fraction unaffected) berechnet. Beide sind diejenigen Anteile einer Gesamtwirkung, die durch eine D beeinflusst bzw. nicht beeinflusst werden.

$$\frac{f_a}{f_u} = 1 \quad (2)$$

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m \quad (3)$$

Formel 4 dient der Berechnung der benötigten Einzel- ($[D_x]_1$, $[D_x]_2$) bzw. Kombinationsdosis ($[D_x]_{1,2}$) zum Hervorrufen eines definierten Effektes (f_a).

$$D_x = D_m \times \left[\frac{f_a}{(1-f_a)}\right]^{1/m} \quad (4)$$

Formel 5 und Formel 6 berücksichtigen das verwendete Verhältnis $(D)_1:(D)_2$:

$$D_1 = (D_x)_{1,2} \times \frac{D_1}{D_1 + D_2} \quad (5)$$

$$D_2 = (D_x)_{1,2} \times \frac{D_2}{D_1 + D_2} \quad (6)$$

Besitzen beide Testsubstanzen den gleichen Angriffspunkt am Target, wird von Exklusivität ($m_1=m_2=m_{1,2}$) gesprochen. Die Berechnung des Kombinationsindex (CI) erfolgte mittels Formel 7. Liegen entweder zwei differierende Bindungsstellen ($m_1 \neq m_2 \neq m_{1,2}$), eine begrenzte Anzahl an Messdaten oder ein eingeschränkter Dosisbereich vor, deutet dies auf keine Exklusivität hin. Im Zuge dessen basierte die Berechnung des CI auf Formel 7 und Formel 8. Der so ermittelte CI gibt Auskunft über Synergie, Additivität oder Antagonismus und wurde im f_a - CI -Diagramm abgebildet.

$$CI = \frac{D_1}{(D_x)_1} + \frac{D_2}{(D_x)_2} \quad (7)$$

$$CI = \frac{D_1}{(D_x)_1} + \frac{D_2}{(D_x)_2} + \frac{D_1 \times D_2}{(D_x)_1 \times (D_x)_2} \quad (8)$$

Um auf den Gesamteffekt rückschließen zu können, erfolgte eine differenzierte Betrachtung der therapeutisch relevanteren, „höheren“ Effektniveaus, die als $f_a \geq 0,5$ definiert sind (Chou, 2006). Dies

berücksichtigte die Gleichung zur Wichtung (Formel 9), deren Ergebnis als gewichteter CI (CI_{wt}) bezeichnet wird. Die Klassifizierung erfolgte gemäß Tab. 4.

$$CI_{wt} = \frac{CI_{50} + 2 * CI_{75} + 3 * CI_{90} + 4 * CI_{95}}{10} \quad (9)$$

Tab. 4 Klassifizierung des gewichteten Kombinationsindex in Synergie, Additivität und Antagonismus

CI_{wt} -Wert	Bedeutung
< 0,1	sehr stark synergistisch
0,1-0,3	stark synergistisch
0,3-0,7	synergistisch
0,7-0,85	moderat synergistisch
0,85-0,9	geringfügig synergistisch
0,9-1,1	nahezu additiv
1,1-1,2	geringfügig antagonistisch
1,2-1,45	moderat antagonistisch
1,45-3,3	antagonistisch
3,3-10	stark antagonistisch
> 10	sehr stark antagonistisch

(adaptiert nach Chou, 2006)

2.7 Genexpression, Proteinreinigung sowie Ko-Kristallisation und Erfassung der Röntgenstrukturdaten

Die Genexpression, Proteinreinigung, Kristallisation und die Erfassung der Röntgenstrukturdaten erfolgte durch Frau Dr. Anja Schütz und ihr Team von der Helmholtz Protein Sample Production Facility am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in Berlin-Buch.

2.7.1 Vorbereitung und Durchführung

Kulturmedien und Pufferlösungen

Für die Genexpression und Proteinreinigung wurden in Anlehnung an Moustafa et al. die in Tab. 5 und Tab. 6 aufgeführten Kulturmedien und Pufferlösungen verwendet (Moustafa et al., 2004).

Tab. 5 Kulturmedien für die Genexpression

Medium	Bestandteil	Konzentration
<i>Lysogeny-Broth</i> -Medium (LB-Medium)	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	<i>aqua dest.</i>	ad 1 L
LB-Agar	LB-Medium	
	Agar	2 %
	Glukose	2 %

Tab. 5 Fortsetzung

Medium	Bestandteil	Konzentration
Terrific-Broth-Medium (TB-Medium)	Trypton	12,0 g
	Hefeextrakt	24,0 g
	Glycerin	3,75 g
	KH ₂ PO ₄	2,3 g
	K ₂ HPO ₄	12,5 g
	<i>aqua dest.</i>	ad 1 L

Tab. 6 Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Proteinreinigung (Konzentration in mM)

	Pufferlösung	Pufferlösung 1	Pufferlösung 2	Pufferlösung 3
Tris-HCl	10	20	10	20
NaCl	-	-	150	150
CaCl ₂	-	-	-	10
pH-Wert	7,6			

Reagenzien und Testsubstanzen

Als Expressionsstamm wurde *E. coli* Rosetta 2 (D3) ausgewählt. Das Plasmid vcNA pET30b(+) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Garry Taylor (University of St Andrews, Schottland) zur Verfügung gestellt.

Durchführung

Zur Initiierung der Genexpression wurde das Plasmid vcNA pET30b(+) in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta 2 (D3) transformiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Eine Einzelkolonie diente als Ausgangsmaterial zum Animpfen einer 5 mL LB-Tagkultur. Hiervon wurden 2 mL zum Animpfen einer 60 mL LB-Übernachtskultur verwendet. Die gesamte Vorkultur diente zur Inokulation der 2 L Hauptkultur (TB-Medium), deren Kultivierung bei 37 °C bis zur optischen Dichte (OD₆₀₀) von 2,0-2,5 mittels des LEX™-Bioreaktor-Systems erfolgte. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,5 mM) zu der auf 17 °C abgekühlten Kultur induziert. Nach der Expression über Nacht fand die Zellernte durch Zentrifugation statt (10 min, 12227 x g, 8 °C).

Die Proteinprobe wurde unter Verwendung der Säule HiPrep™ 26/10 Desalting und der Pufferlösung 2 mit der ÄKTA™ FLPC entsalzt, mit Pufferlösung verdünnt und der Anionenaustausch-Chromatographie zugeführt. Die Elution erfolgte gemäß der in Tab. 7 genannten Parameter. Das NA-Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von ca. 250 mM NaCl.

Tab. 7 Parameter der Anionenaustausch-Chromatographie

Säulenmaterial	30 mL Source 30Q
Auftragepuffer	Pufferlösung 1
Elutionspuffer	Pufferlösung 1 + 1 M NaCl
äquilibriert mit:	7,5 % B
Gradient	7,5-100 % Elutionspuffer in 15 mL
Fluss	5 mL/min

Die Einengung der vereinten Fraktionen auf 8 mL erfolgte mittels Amicon Ultra (*cut off* 30 kDA), um diese nachfolgend der Gelfiltration zuzuführen. Verwendung fand eine 26/60 Superdex 200 prep grade Säule, deren Äquilibrierung mit der Pufferlösung 3 erfolgte. Die gereinigte Proteinprobe wurde erneut mittels Amicon Ultra auf 6 mg/mL konzentriert, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte spektrophotometrisch bei 280 nm mit Hilfe des theoretischen Extinktionskoeffizienten von 131780 M⁻¹ cm⁻¹. Die Reinigungsprozedur wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*-SDS-PAGE) analysiert. Hierzu wurden die jeweiligen Proben mit 4x SDS-Probenpuffer (Tab. 8) versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht und auf ein 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung (100-200 Volt) erfolgte die Elektrophorese über ca. 45-60 min. Zum Sichtbarmachen der aufgetrennten Proteine wurde das Gel 20 min in einer Fixier- und anschließend in einer Entfärbelösung (Tab. 8) geschüttelt.

Tab. 8 Lösungen zur Durchführung der SDS-PAGE

Lösung	Bestandteil	Konzentration
SDS-Probenpuffer (4x)	Tris-HCl (pH-Wert: 6,8)	0,2 M
	SDS	8 %
	Glycerol	40 %
	Bromphenolblau	0,004 %
	DTT	100 mM
Entfärbelösung	Ethanol	20 %
	Essigsäure	7,5 %
Fixierlösung	Coomassie Brilliant Blue G-250	2,5 g
	Eisessig	50 mL
	Ethanol 96 %	225 mL
	<i>aqua dest.</i>	225 mL
Elektrodenpuffer	Tris-Base	0,125 M
	Glycerol	1,25 M
	SDS	0,5 %
Sammelgel	0,5 M Tris-HCl (pH-Wert: 6,8)	12,5 mL
	SDS (10 %)	0,5 mL
	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	6,7 mL
	Ammoniumpersulfat (10 %)	1 mL
	TEMED	50 µL
	<i>aqua dest.</i>	29,8 mL
Trenngel (15 %)	1,5 M Tris-HCl (pH-Wert: 8,8)	25 mL
	SDS (10 %)	1 mL
	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	50 mL
	Ammoniumpersulfat (10 %)	1 mL
	TEMED	25 µL
	<i>aqua dest.</i>	23 mL

Für die nachfolgenden Kristallisationsversuche wurden entweder frisch präpariertes oder aufgetautes Protein verwendet. Dazu erfolgte der Zusatz von Oseltamivircarboxylat bzw. Zanamivir, sodass die Endkonzentration 20 mM betrug. Die Ko-Kristallisation erfolgte mit 6-7 mg/mL dieser Lösung mittels

Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen unter Verwendung des Pipettierroboters „Gryphon“. Dieser pipettierte 75 μL Reservoirlösung, 400 nL einer Lösung aus der Protein-NA-Inhibitor-Probe und dem Fällungsmittel (1:1) (vorgefertigte initiale Kristallisationsbedingungen der Firma Jena Bioscience und Qiagen) in die jeweilige Öffnung der CrystalQuick™ Kristallisationsplatte. Die vollständig beimpften Platten wurden anschließend mit *viewseal* Abdeckfolie verschlossen. Die Lagerung und automatische Bildaufnahme der Kristallisationsplatten fand im Rock Imager 1000 bei 20 °C statt. Ko-Kristallite wurden unter mehreren Bedingungen erhalten, wobei die in Abb. 18 dargestellten Kristalle Datensätze lieferten. Anschließend erfolgte die Überführung der Kristalle in einen Tropfen aus 65 % (V/V) Reservoirlösung und 35 % (V/V) Glycerol sowie das Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff.

2.7.2 Auswertung

Die Datensammlung wurde am Messplatz BL 14.1 am Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie bei 100 K und einer Wellenlänge von 0,9184 Å durchgeführt. Die Prozessierung der Daten fand unter Zuhilfenahme des Programms XDSAPP statt (Krug et al., 2012). Bei der Phasierung kam die Methode des molekularen Ersatzes mit Hilfe des Programms PHASER zur Anwendung, wobei die PDB ID: 1KIT als Suchmodell diente (Crennell et al., 1994 44, Mc Coy et al., 2005). Die Verfeinerung des initialen Modells erfolgte mittels PHENIX, zur graphischen Darstellung und zum Modellbau wurde COOT benutzt (Adams et al., 2010, Emsley et al., 2010). Die Proteinstruktur wurde über PyMol abgebildet (Version 1.3) (DeLano, 2002).

2.7.3 Ermittlung der Enzymkinetik der exprimierten *V. cholerae* Neuraminidase

2.7.3.1 Vorbereitung und Durchführung

Reagenzien und Testsubstanzen

Zur Ermittlung der Enzymkinetik wurde die in Kapitel 2.6.1 beschriebene MuNANA-Lösung und der MES-Puffer verwendet. Die Herstellung und die entsprechende Verdünnung der methanolischen 4-Methylumbelliferon-Stammlösung (1000 μM) erfolgten jeweils frisch. Vor jedem Einsatz wurde die bei -20 °C gelagerte exprimierte *V. cholerae* NA aufgetaut und entsprechend mit MES-Puffer verdünnt.

Durchführung

Vor der Ermittlung der Enzymkinetik wurden zur Umrechnung die rFU in eine Konzentrationsangabe verschiedene Konzentrationen an 4-Methylumbelliferon (1-500 μM) vermessen.

Um den Einfluss variierender Enzymkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu untersuchen wurden zunächst 0-70 μL MES-Puffer, 10-80 μL NA-Lösung (1 U) 1 min lang geschüttelt und 2 min

inkubiert. Nach dem Zusatz von 20 μL MuNANA-Lösung (1 mM) und 10-sekündiger Durchmischung erfolgte die Fluoreszenzmessung über 7 min alle 20 s. Der Blindwert wurde parallel bestimmt.

Mithilfe variierender MuNANA-Konzentrationen (0,05-0,7 mM) und einer konstanten NA-Aktivität (1 U) wurde der Effekt einer steigenden Substratkonzentration auf die Initialgeschwindigkeit des Enzymumsatzes ermittelt. Die Messung über 14 min alle 15 s erfolgte nach 1-minütigem Schütteln und 2-minütiger Inkubation. Der lineare Anstieg der Aktivitäts-Zeit-Kurven diente der Berechnung der Initialgeschwindigkeit (v_o):

$$v_o \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad (10)$$

ΔE = Differenz der rFU
 Δt = Differenz der Zeit [min]

Die Abbildung von v_o gegen die MuNANA-Konzentration erfolgte nicht linear und doppellogarithmisch (Lineweaver-Burk-Diagramm), wobei Letzteres zur Bestimmung der Michaeliskonstante und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) genutzt wurde. Mittels Formel 11 erfolgte die Ermittlung der relativen spezifischen Enzymaktivität [U/ml]. Die Einheit Unit (U) definiert diejenige Enzymmenge, welche 1 μmol Substrat pro Minute umsetzt.

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \left(\frac{\Delta E}{\Delta t} * 10^3 \right) * PG \quad (11)$$

PG = Proteingesamt (mg)

Alle Fluoreszenzmessungen fanden unter den Geräteeinstellungen in Kapitel 2.6.1 statt.

2.8 Computergestützte Untersuchung der *V. cholerae* Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1) sowie der Wechselwirkung zwischen den Neuraminidasen und deren Inhibitoren

Eine ergänzende Interpretation der differierenden IC_{50} -Werte aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay boten die computerbasierten Techniken der Bioinformatik. Zunächst wurden die Aminosäuresequenzen der im Assay verwendeten *V. cholerae* (PDB ID: 1W0O) und Influenzavirus A NA (N1) (PDB ID: 3NSS) aligniert. Der Fokus lag dabei auf den zentralen Domänen, in welche die NA-Inhibitoren binden. Die Identität und Ähnlichkeit wurde mit Hilfe des Programms Needle (EMBOSS Software) berechnet (Rice et al., 2000). Da Polyphenole zum Teil sehr komplexe Konformationsverhältnisse aufweisen, wurden zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen NA-Inhibitor und der jeweiligen Bindungstasche ausschließlich Zanamivir und Oseltamivircarboxylat betrachtet. Grundlage bildeten die in der Protein-Data-Base (PDB) publizierten und die eigens erhobenen Röntgenstrukturdaten (Tab. 9).

Tab. 9 Relevante PDB IDs

PDB ID	Erläuterung	Referenz
3NSS	Kristallstruktur H1N1 NA Organismus: Influenzavirus A/California/04/2009[H1N1]	(Li et al., 2010)
3TI5	Kristallstruktur H1N1 NA ko-kristallisiert mit Zanamivir; Organismus: Influenzavirus A/California/04/2009 [H1N1]	(Vavricka et al., 2011)
3TI6	Kristallstruktur H1N1 NA ko-kristallisiert mit Oseltamivir; Organismus: Influenzavirus A/California/04/2009 [H1N1]	(Vavricka et al., 2011)
1W0O	Kristallstruktur der <i>V. cholerae</i> NA ko-kristallisiert mit 2-Desoxy-2,3-dehydro- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure und Sialinsäure; Organismus: <i>V. cholerae</i>	(Moustafa et al., 2004)

2.8.1 Wechselwirkungen der Neuraminidase-Inhibitoren in der *V. cholerae* Neuraminidase bzw. Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

2.8.1.1 Vorbereitung und Durchführung

Die virtuelle Darstellung der Wechselwirkung zwischen dem NA-Inhibitor Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat und der *V. cholerae* NA bzw. Influenzavirus A NA (N1) erfolgte mit Hilfe des Programms LigandScout (Wolber und Langer, 2005). Hierzu wurden die in Tab. 10 aufgeführten Datensätze verwendet.

Tab. 10 Verwendete Datensätze für die Analyse der Wechselwirkungen zwischen NA-Inhibitor und dessen Bindungsdomäne

NA	NA-Inhibitor	Datensatz	Quelle
<i>V. cholerae</i>	Zanamivir	eigens ermittelt	
	Oseltamivircarboxylat		
Influenzavirus A NA (N1)	Zanamivir	3TI5	PDB
	Oseltamivircarboxylat	3TI6	

2.8.1.2 Auswertung

Die Auswertung der Wechselwirkungen erfolgte durch die Identifizierung der interagierenden Protein- und Ligandenstrukturen sowie die Spezifizierung in hydrophobe oder ionische Wechselwirkung oder Wasserstoffbrückenbindung (Akzeptor oder Donor). Darüber hinaus wurde die Distanz [Å] zwischen dem entsprechenden Sauerstoff- und dem jeweiligen Stickstoffatom gemessen.

2.9 Experimente an isolierten Koronararterien des Schweins (Organbadstudien)

2.9.1 Vorbereitung und Durchführung

Pufferlösungen

Für die Organbadstudien wurden die in Tab. 11 aufgeführten Pufferlösungen am jeweiligen Versuchstag unter Verwendung von *aqua dest.* und Carbogen-Begasung (O₂/CO₂ [95 %/5 %]) frisch hergestellt.

Tab. 11 Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Organbadstudien (Konzentration in mM)

Modifizierte Krebs-Henseleit Lösung Ca ²⁺ -frei, depolarisierend			
	pH 7,4 Lösung	pH 7,4 Lösung 1	pH 7,4 Lösung 2
NaCl	118,0	118,0	62,7
KCl	4,7	4,7	60,0
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,6	-	-
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,2	-	-
KH ₂ PO ₄	1,2	1,2	1,2
NaHCO ₃	25,0	25,0	1,2
TRIS	-	-	50,0
EDTA	-	-	0,03
D-Glucose · H ₂ O	11,0	11,0	11,0

Reagenzien und Testsubstanzen

Alle verwendeten Substanzen wurden jeweils als Stammlösung mit *aqua dest.* frisch hergestellt und entsprechend verdünnt. Eine Lagerung erfolgte bei -20 °C. Zur Verbesserung der Löslichkeit und/oder Stabilisierung der Stammlösungen wurden weitere Lösungsmittel verwendet: Ethanol (96 %) (z.B. für U46619), Ethanol (50 %; V/V) (z.B. für Indometacin). Die Stammlösungen der proanthocyanidinhaltigen Extrakte/Fractionen (100 mg/mL) wurden in Ethanol (96 %) bzw. DMSO/modifizierte Krebs-Henseleit (KHS)-Lösung 1 (2:10; V/V) zubereitet und mit KHS-Lösung 1 verdünnt. Die finalen Ethanol- bzw. DMSO-Konzentrationen der Messlösungen waren ≤ 0,5 %. Um den Einfluss von Lösungsmitteln zu berücksichtigen wurden Vehikelprüfungen durchgeführt.

Durchführung

Als Bezugsquelle für die Koronararterien dienten Herzen weiblicher und männlicher Schlachtschweine aus der Lehr- und Versuchstieranstalt Teltow-Ruhlsdorf. Der Transport erfolgte in eisgekühlter KHS-Lösung, welche mit Carbogen (O₂/CO₂ [95 %/5 %]) gesättigt war. Die Isolation und Präparation der linken Koronararterie (Ramus interventricularis anterior) und des Ramus circumflex erfolgten ebenfalls unter kontinuierlicher Benetzung mit KHS-Lösung sowie Carbogen-Begasung. Vor

Versuchsbeginn wurden die isolierten Arterien vom umliegenden Fett und Gewebe befreit und in Ringe (mit ca. 4 mm Länge) geschnitten. Für Experimente ohne Endothel wurde dieses durch Rollen des Gefäßringes mithilfe einer Pinzette vorsichtig entfernt. Anschließend erfolgte die horizontale Aufhängung im Organbad mit jeweils zwei L-förmigen, rostfreien Organbadhäkchen aus Edelstahl. Der sich am unteren Häkchen befindende Faden diente der Fixierung am Organbadhalter, der obere Faden bildete die Verbindung zum elektromechanischen Druckumwandler (Transducer). In den Organbädern (Fassungsvolumen: 20 mL) wurde die enthaltene KHS-Lösung stets auf 37 °C temperiert und mit Carbogen begast. Mithilfe des Transducers, eines Verstärkers (Transducer Coupler) und eines Vier-Kanal-x/t-Kompensationsschreibers erfolgte die graphische Darstellung der isometrischen Änderung der Kontraktionskraft der einzelnen Segmente. Eine externe Kalibrierung erfolgte mittels geeichter Gewichtsstücke.

Zu Versuchsbeginn wurden alle Arteriensegmente auf eine Ruhekraft von 20 mN vorgespannt. Nach 30 min erfolgte eine Waschphase (3 min) sowie ein Nachspannen. Um die Funktionalität der Arterienringe zu belegen, erfolgte zunächst eine KCl-induzierte Kontraktion, wobei 60 mM KCl (Kapitel 2.9.1.1 und 2.9.1.3) bzw. 50 mM KCl (Kapitel 2.9.1.2) verwendet wurde. Durch eine Wasch- (5 min), Äquilibrierungs- (15 min) und erneute Wasch- (3 min) und Äquilibrierungsphase (30 min) wurde der Basalwert der Gefäßringe wieder erreicht. Im Folgenden wird dieser Ablauf als Wasch-/Äquilibrierungsprozedere bezeichnet. Danach erfolgte zweimal eine U46619-induzierte Kontraktion (30 nM), die jeweils beim Erreichen des Maximaleffektes durch ein Relaxieren mittels Substanz P (10 nM)- (Kapitel 2.9.1.3) oder Bradykinin (100 nM)-Zugabe (Kapitel 2.9.1.1 und 2.9.1.2) aufgehoben wurde. Dieses endothelvermittelte Dilatieren ermöglichte einen Rückschluss auf die Funktionalität der Arteriensegmente. Ein Ausbleiben des Effektes belegte die vollständige Entfernung des Endothels. Zur Unterbindung einer COX-abhängigen Eicosanoidbildung wurde in den Experimenten der Kapitel 2.9.1.1 und 2.9.1.2 vor jeder 30-minütigen Äquilibrierung und vor der Inkubation mit Testsubstanzen Indometacin (5,2 µM) zugesetzt. Je nach Experiment wurden einzelne Arbeitsschritte modifiziert, wie in nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

2.9.1.1 Überprüfung des vasorelaxierenden Potentials und Charakterisierung der beteiligten Signalkaskade(n)

Die zweite U46619-/Bradykinin-Stimulation wurde durch das Wasch-/Äquilibrierungsprozedere beendet. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit Inhibitoren bzw. Mimetika. Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsplateaus durch eine erneute U46619-Zugabe (30 nM) fand eine kumulative Relaxation durch Zugabe der Testsubstanz statt. Dies erfolgte halblogarithmisch in steigenden Konzentrationen (1-32 bzw. 100 mg/mL). Parallel dazu fand die Aufnahme der Konzentrations-Wirkungskurve statt.

2.9.1.2 Experimente im Ca²⁺-freien Medium

Das Wasch-/Äquibrierungsprozedere beendete hier gleichfalls die zweite U46619-/Bradykinin-Zugabe, gefolgt von einem 7-minütigen Mediumwechsel zur KHS-Lösung 2 und einer Äquibrierungsphase (30 min). Anschließend wurde mit CaCl₂ (3 mM) kontrahiert und der Vorgang durch das Wasch-/Äquibrierungsprozedere beendet. Die 30-minütige Ruhephase wurde zur Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanzen (1-50 mg/mL) verwendet. Die anschließende Zugabe von CaCl₂ in halblogarithmischen Schritten (10 µM-20 mM) wurde als Konzentrations-Wirkungskurve aufgenommen.

2.9.1.3 Überprüfung des vasoprotektiven Potentials

Nach der zweiten U46619- und Substanz P-Zugabe erfolgte das Wasch-/Äquibrierungsprozedere sowie der Zusatz der Testsubstanzen. Mit 1-stündigem Versatz wurde 1 µg/mL LPS von *E. coli* 0111:B4 hinzugegeben. Der Benzylpenicillin-/Streptomycinsulfat-Zusatz (60 µg/mL/20 µg/mL) vermied eine bakterielle Kontamination mit evtl. einhergehenden, ungewollten Entzündungsprozessen der Gefäßpräparationen. Im Anschluss erfolgte eine ca. 16-stündige Inkubation, welche durch das Wasch-/Äquibrierungsprozedere beendet wurde. Hieran schloss sich eine erneute U46619-Zugabe (30 nM) an. Nach dem Waschprozedere folgte eine Ruhephase, in welcher in parallelen Experimenten der Inhibitor 1400W (10 µM \pm 2,5 µg/mL) zugesetzt wurde. Anschließend erfolgte die kumulative Zugabe von U46619 (0,3 nM-0,3 µM). Zur Überprüfung der Funktionalität des Endothels fand nach der letzten Zugabe von U46619 der Zusatz von Substanz P (10 nM) statt. Beide Zugaben wurden in Form einer Konzentrations-Wirkungskurve aufgezeichnet.

2.9.2 Auswertung

Die isometrische Änderung der Kontraktionskraft wurde ins prozentuale Verhältnis zur U46619- bzw. CaCl₂-Kontraktion gesetzt. Die Mittelung der Messdaten, die graphische Darstellung in einem log (Agens)/Effekt-Plot sowie die Auswertung erfolgten mittels GraphPad Prism 5.0.

2.10 Statistik

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien wurden als IC₅₀-Wert (geometrisches Mittel [95 % Konfidenzintervall]) und die der Organbadstudien als agonistische Potenz (pEC₅₀-Wert \pm Standardfehler des Mittelwertes [S.E.M.]) und Maximaleffekt ($E_{\max} \pm$ S.E.M.) dargestellt. Zusätzlich erfolgte die Angabe der Anzahl der Tiere oder Experimente (*n*). Die Daten stammen aus $n \geq 3$ unabhängigen, doppelt bestimmten Experimenten, die unter Standardbedingungen durchgeführt wurden.

Lineare Regression: Methode der kleinsten Fehlerquadrate, ist eine Ausgleichsgerade durch im linearen Bereich befindlichen Messwerte. Die Güte der Anpassung wurde durch das dimensionslose Bestimmtheitsmaß (r ; 1= vollkommene Übereinstimmung) abgebildet.

Nichtlineare Regression: Grundlage bildete die Hill-Gleichung (Formel 12), wobei im MuNANA-Fluoreszenz-Assay eine Begrenzung zwischen 0-100 % galt, für die Organbadstudien wurde die Grundlinie auf 0 % beschränkt. Das „curve fitting“ erfolgte mittels der kleinsten Abstandquadrate.

$$y = \frac{u + (t - u)}{1 + 10^{\log(IC_{50}-X) \times Hill-Koeffizient}} \quad (12)$$

u = unteres Plateau

t = oberes Plateau

Statistische Absicherung: Für alle statistischen Testverfahren galt mindestens die Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ als signifikant, wenn nicht sogar $P < 0,01$. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk- oder Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zum Vergleich zweier Mittelwerte wurde bei normalverteilten Stichproben zunächst die Varianzhomogenität (F-Test, Levene-Test) nachgewiesen und anschließend der Zwei-Stichproben- t -Test verwendet. Bei Nichtvorlage der Normalverteilung wurde der nach Welch-modifizierte t -Test genutzt. Für den Vergleich mehrerer Mittelwerte fand die einfaktorielle- (one-way-ANOVA) oder zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way-ANOVA) mit Bonferonni post hoc Testung Anwendung. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten (r) erfolgte durch den nichtparametrischen Test nach Spearman.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Inhibition der Neuraminidase durch polyphenolische Testsubstanzen: Evaluation des MuNANA-Fluoreszenz-Assays und Herkunft des Enzyms

Im MuNANA-Fluoreszenz-Assay wurde eine NA bakterieller sowie viraler Phylogense verwendet, um mögliche Aktivitätsunterschiede je nach Herkunft zu erfassen. Zudem erfolgte die Ermittlung des inhibitorischen Potentials proanthocyanidinhaltiger Extrakte/Fraktionen und Reinsubstanzen. Die Ergebnisse dienen einer Konzentrations-Wirkungsanalyse sowie der Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen. Ergänzend dazu wurde die inhibitorische Aktivität von mehreren Wirkstoffkombinationen aus Zanamivir/EPs® 7630 (1:10; 1:5; 1:1; 5:1; 10:1) und Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure (1:8) gegenüber der *V. cholerae* NA gemessen.

Das Prinzip des Assays beruht auf einer NA-katalysierten Hydrolyse des Fluorogens MuNANA, wodurch die Spaltprodukte *α*-D-N-Acetylneuraminsäure und 4-Methylumbelliferon entstehen (Abb. 10). Letzteres wurde quantitativ fluorometrisch erfasst und liefert einen Rückschluss auf die NA-Aktivität zu.

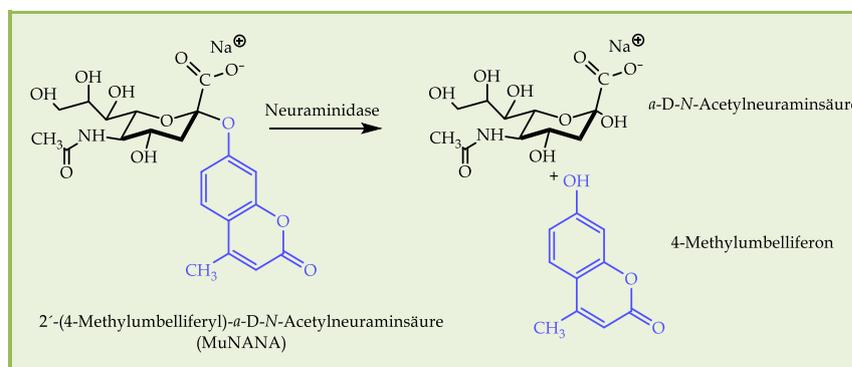


Abb. 10 NA-katalysierte Hydrolyse von MuNANA

3.1.1 Optimierung der Inkubationszeit

Um eine optimale Inkubationsdauer für die jeweiligen Testsubstanzen festzulegen, wurde Zanamivir für jeweils 2, 5 und 11 min mit der *V. cholerae* NA inkubiert. Der Vergleich der IC_{50} -Werte ($n=3$) zeigt keinen signifikanten Unterschied (2 min: 50 [41-60] μ M; 5 min: 50 [40-60] μ M; 11 min: 46 [35-56] μ M).

3.1.2 Neuraminidase-inhibierendes Potential polyphenolischer Substanzen

Tab. 12 fasst die IC_{50} -Werte aller Testsubstanzen gegenüber der *V. cholerae* NA und der Influenzavirus A NA (N1) zusammen. Die Ergebnisse der proanthocyanidinhaltigen Extrakte/Fractionen basieren auf der Einheit $\mu\text{g}/\text{mL}$. Demgegenüber sind die Reinsubstanzen in μM bzw. nM und für Vergleichszwecke in $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. ng/mL angegeben. Die anschließende Auswertung und Ableitung der Struktur-Wirkungsbeziehungen beruht auf den Angaben in μM bzw. nM .

Tab. 12 Hemmung der *V. cholerae* NA und Influenzavirus A NA (N1) durch polyphenolische Substanzen

Testsubstanz		IC ₅₀ -Wert			
		Influenzavirus A NA (N1)		<i>V. cholerae</i> NA	
		(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)
Positiv- kontrollen	Oseltamivircarboxylat	2,9 (2,3-3,3) ¹	0,01 (0,008-0,012)	41 (39-43)	144 (136-152)
	Zanamivir	3,7 (2,9-4,6) ¹	0,01 (0,009- 0,014)	17 (16-18)	52 (50-54)
proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen	<i>Diospyros kaki</i>	20 (18-23)	-	0,5 (0,4-0,7)	-
	EPs® 7630	61 (56-67)	-	1,7 (1,6-1,9)	-
	<i>Nelia meyeri</i>	29 (27-31)	-	3,2 (3,0-3,4)	-
	<i>Salix</i> spp.	32 (28-35)	-	4,4 (4,2-4,7)	-
	<i>Cephalophyllum</i> spp.	-	-	6,0 (5,8-6,3)	-
	<i>Potentilla erecta</i>	-	-	9,2 (7,2-11,2)	-
	<i>Betula</i> spp.	-	-	13 (11-14)	-
	<i>Rhus leptodictya</i>	-	-	25 (22-28)	-
Benzoessäure -derivate	Shikimisäure	-	-	≥ 1000	≥ 5000 µM
	Gallussäure	-	-	≥ 1000	≥ 5000 µM
	2,6-Dihydroxybenzoessäure	-	-	127 (118-138)	821 (766-892)

Legende siehe Seite 45

Tab. 12 Fortsetzung

Testsubstanz		IC ₅₀ -Wert			
		Influenzavirus A NA (N1)		<i>V. cholerae</i> NA	
		(µg/mL)	(µM)	(µg/mL)	(µM)
Dehydro- ellagittannine	Geraniin	-	-	128 (124-135)	135 (130-141)
	Granatin A	-	-	124 (117-133)	158 (150-170)
	Carpinusin	-	-	131 (120-143)	138 (125-150)
	Terchebin	97 (91-103)	101 (95-108)	29 (25-34)	31 (26-37)
C- glykosidische Ellagittannine	Casuariin	-	-	185 (176-195)	236 (225-248)
	Vescalagin	-	-	125 (98-152)	73 (57-89)
	Paeonianin C	587 (529-646)	344 (310-378)	25 (21-30)	15 (12-17)
Flavan-3-ole	Catechin	312 (258-366)	1076 (890-1261)	595 (563-626)	2050 (1942-2159)
	Gallocatechin	547 (345-750)	1787 (1126-2448)	603 (452-754)	1969 (1475-2463)
	Catechin-3- <i>O</i> -gallat	862 (845-879)	1949 (1911-1987)	24 (20-29)	55 (45-65)
	Gallocatechin-3- <i>O</i> -gallat	181 (173-190)	396 (377-414)	11 (9-13)	25 (21-29)
	Epicatechin	305 (259-351)	1053 (894-1211)	670 (599-669)	2186 (2064-2308)
	Epigallocatechin	532 (430-635)	1739 (1404-2074)	598 (458-739)	1953 (1495-2412)
	Epicatechin-3- <i>O</i> -gallat	845 (784-905)	1910 (1773-2046)	93 (72-114)	211 (164-258)
	Epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallat	717 (561-838)	1565 (1224-1906)	29 (27-31)	64 (60-68)

Mittelwerte der IC₅₀-Werte (95 % Konfidenzintervall) (µg/mL bzw. µM)¹⁾ (ng/mL bzw. nM)
(*n*= 3-6 Experimente), die chemischen Strukturen sind in Tab. 26 aufgeführt

3.1.2.1 Inhibierendes Potential gegenüber der *V. cholerae* Neuraminidase

Proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen

Im Vergleich zu den Positivkontrollen Zanamivir (IC_{50} -Wert: 17 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 52 \mu\text{M}$) und Oseltamivircarboxylat (IC_{50} -Wert: 41 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 144 \mu\text{M}$) inhibierten alle proanthocyanidinhaltigen Substanzen die *V. cholerae* NA ähnlich bzw. signifikant stärker. Für die Fraktion aus *D. kaki*, welche Prodelphinidine mit Procyanidin-Anteilen enthält, wurde das markanteste Wirkpotential (IC_{50} -Wert: 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) beobachtet. In absteigender Potenz erzielten der prodelphinidinreiche EPs® 7630, die 2,3-*trans*-Salix- sowie die 2,3-*cis*-Nelia-Procyanidine vergleichbar gute, jedoch schwächere Aktivitäten (IC_{50} -Wert: 1,7 $\mu\text{g}/\text{mL} > 3,2 \mu\text{g}/\text{mL} > 4,4 \mu\text{g}/\text{mL}$). Für die aus Epicatechin-Einheiten bestehende Fraktion von *Cephalophyllum* spp. wurde ein IC_{50} -Wert von 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ festgestellt. Die Fraktionen aus *Potentilla erecta* und *Betula* spp., welche Procyanidine mit unterschiedlicher Häufigkeit an Catechin-Einheiten enthalten, inhibierten mit einem IC_{50} -Wert von 9,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Einzig die Profisetinidin-Probe (Fraktion von *Rhus leptodictya*, IC_{50} -Wert: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) war schwächer wirksam als Zanamivir, jedoch effektiver als Oseltamivircarboxylat. Dies scheint den 5-Desoxy-Einheiten geschuldet zu sein und unterstreicht die Bedeutung der 5-Hydroxygruppe.

Flavan-3-ole

Auch die galloylierten Flavan-3-ole zeigten ein ausgeprägtes inhibitorisches Potential. Dabei ergab sich in absteigender Potenz folgende Reihenfolge: Gallocatechin-3-*O*-gallat > Catechin-3-*O*-gallat > Epigallocatechin-3-*O*-gallat > Epicatechin-3-*O*-gallat (IC_{50} -Wert: 25 μM ; 55 μM ; 64 μM ; 211 μM) (Tab. 12). Im Vergleich zu den NA-Referenzinhibitoren hemmte Gallocatechin-3-*O*-gallat signifikant stärker als Zanamivir (IC_{50} -Wert: 52 μM) und Oseltamivircarboxylat (IC_{50} -Wert: 144 μM). Catechin-3-*O*-gallat und Epigallocatechin-3-*O*-gallat waren potenter als Oseltamivircarboxylat, entsprachen sogar annähernd Zanamivir. Moderate Aktivität zeigte hingegen Epicatechin-3-*O*-gallat (IC_{50} -Wert: 211 μM). Sehr schwache Wirkungen wurden für: Epigallocatechin > Gallocatechin > Catechin > Epicatechin (IC_{50} -Wert: 1953 μM ; 1969 μM ; 2050 μM ; 2186 μM) beobachtet. Dies verweist zum einen auf die herausragende Rolle der 3-*O*-Galloylierung, zum anderen auf einen stärkeren Beitrag der 2,3-*cis*-Stereochemie im Vergleich zu den 2,3-*trans*-konfigurierten Flavan-3-*O*-gallaten.

Ellagitannine

Ein heterogenes Bild zeigte sich in der Stoffgruppe der Dehydroellagitannine. Das gemeinsame Strukturmerkmal der verwendeten Testsubstanzen ist ein 2',4'-esterartig gebundenes DHHDP-Element. Anhand der IC_{50} -Werte ergab sich folgende Reihung: Terchebin > Geraniin > Carpinusin > Granatin A (IC_{50} -Wert: 31 μM ; 135 μM ; 138 μM ; 158 μM) (Tab. 12). Terchebin mit einer 1,3,6-Tri-*O*-Galloylierung zeigte die stärkste Aktivität, gefolgt von den 1-*O*- bzw. 3-*O*-monogalloylierten Vertretern Geraniin bzw. Carpinusin. Granatin A, strukturell charakterisiert durch fehlende *O*-Galloylreste, war am wenigsten inhibitorisch aktiv. Zudem scheint die Anwesenheit eines 1',6'-(Granatin A, Carpinusin) bzw. 3',6'-HHDP-Elementes (Geraniin) offenbar keinen größeren Einfluss

auf den Hemmeffekt zu haben. Im Vergleich zu den Positivkontrollen entsprachen Geraniin, Carpinusin und Granatin A dem NA-Referenzinhibitor Oseltamivircarboxylat, während Terchebin die Wirkstärke von Zanamivir übertraf. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass für die Inhibition der *V. cholerae* NA durch Dehydroellagittannine der Galloylierungsgrad ein wesentliches Strukturmerkmal, nicht dagegen das zusätzliche HHDP-Element ist.

Das Merkmal der getesteten C-glykosidischen Ellagittannine ist die 2',3'- und 4',6'-verknüpfte HHDP-Gruppe an der offenkettigen D-Glukose. Paeonianin C (IC_{50} -Wert: 15 μ M) mit einem zusätzlichen 1-Penta-O-Galloylglucosylrest zeigte die stärkste Hemmwirkung, gefolgt von Vescalagin mit einer 5-O-Galloylgruppe und dem schwach wirkenden Casuariin ohne Galloylrest (Tab. 12).

Benzoessäurederivate

In der Reihe der Benzoessäurederivate war die 2,6-Dihydroxybenzoessäure (IC_{50} -Wert: 821 μ M) eine Ausnahme, insofern sie schwache Aktivität zeigte. Dagegen wurde für Shikimisäure und Gallussäure kein inhibitorisches Potential festgestellt (IC_{50} -Wert: $\geq 5000 \mu$ M).

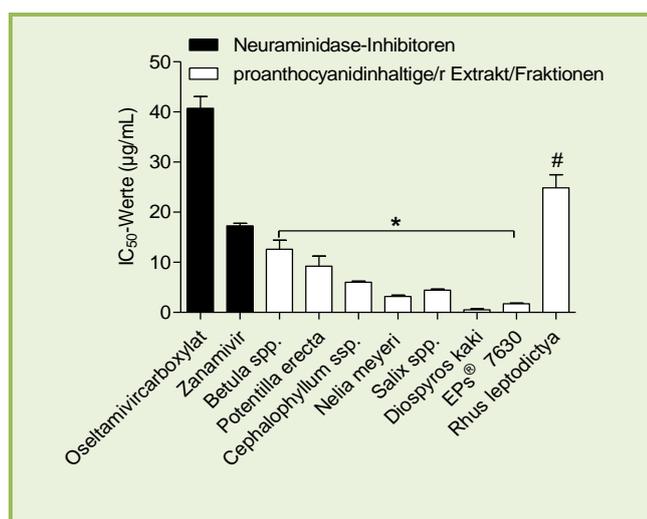


Abb. 11 Inhibition der *V. cholerae* durch proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fractionen

Mittelwerte IC_{50} -Werte (95 % Konfidenzintervall) (μ g/mL) ($n= 3-6$ Experimente) */# signifikant gegenüber beiden NA-Inhibitoren/Oseltamivircarboxylat one-way-ANOVA */# $P < 0,05$

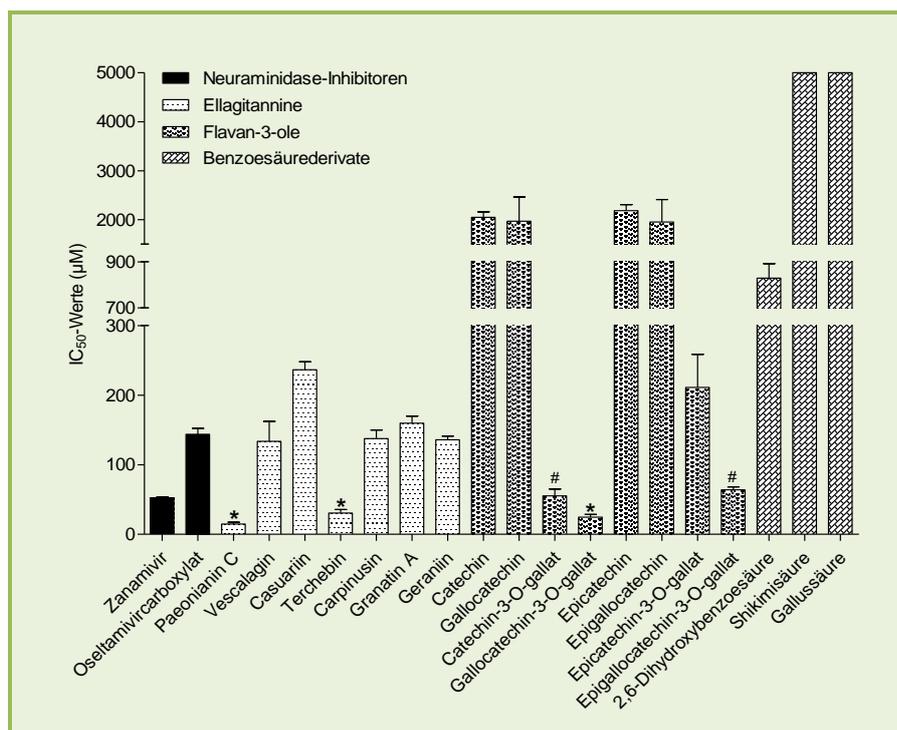


Abb. 12 Inhibition der *V. cholerae* NA durch Ellagitannine, Benzoessäurederivate und Flavan-3-ole
 Mittelwerte IC₅₀-Werte (95 % Konfidenzintervall) (µM) (*n*= 3-6 Experimente) */# signifikant gegenüber beiden NA-Inhibitoren/Osetamivircarboxylat one-way-ANOVA */# *P*< 0,05

3.1.2.2 Inhibierendes Potential gegenüber der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Im Gegensatz zur Testung des inhibitorischen Potentials gegenüber der *V. cholerae* NA wurde für die Überprüfung des antiviralen Potentials die Anzahl der Testsubstanzen eingegrenzt. Die Auswahl basierte auf strukturellen Besonderheiten und der ausgeprägten Aktivität gegenüber der bakteriellen NA.

Proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen

Für beide Positivkontrollen wurde eine ausgeprägte inhibitorische Potenz (IC₅₀-Wert Osetamivircarboxylat: 3 ng/mL \cong 10 nM; Zanamivir: 4 ng/mL \cong 11 nM) beobachtet. Ein deutlich schwächeres Potential wiesen die proanthocyanidinhaltigen Extrakte/Fraktionen auf. Dabei ergab sich folgende absteigende Potenz: *Diospyros*-Proanthocyanidine > 2,3-*cis-Nelia*-Procyanidine > 2,3-*trans-Salix*-Procyanidine > prodelphinidinreicher EPs® 7630 (IC₅₀-Wert: 20 µg/mL > 29 µg/mL > 32 µg/mL > 61 µg/mL).

Flavan-3-ole

In der Testreihe der Flavan-3-ole konnten stark differierende inhibitorische Aktivitäten festgestellt werden. Herausstechend, wenn auch schwach, war die Hemmwirkung des 3-*O*-galloylierten Gallocatechin-3-*O*-gallats (IC₅₀-Wert 396 µM). Für die ungalloylierten Vertreter Epicatechin und Catechin (IC₅₀-Wert: 1053 µM und 1076 µM) wurde ein stärker hemmendes Potential als für Epigallocatechin-3-*O*-gallat > Epigallocatechin > Gallocatechin > Catechin-3-*O*-gallat (IC₅₀-Wert:

1565 μM ; 1739 μM ; 1787 μM ; 1949 μM) beobachtet. Möglicherweise spielt die Konfiguration am C-3 eine markante Rolle in der Beeinflussung der Potenz.

Ellagitannine

Ein ähnlicher Wirkunterschied konnte in der Reihe der Ellagitannine beobachtet werden. Im Vergleich zu dem Dehydroellagitannin Terchebin (IC_{50} -Wert: 101 μM) inhibierte das C-glykosidische Ellagitannin Paeonianin C (IC_{50} -Wert: 344 μM) nur sehr schwach. Möglicherweise behindert der voluminöse 1-Penta-O-Galloylglucosylrest des Paeonianin C die Wechselwirkung mit der viralen Bindungstasche.

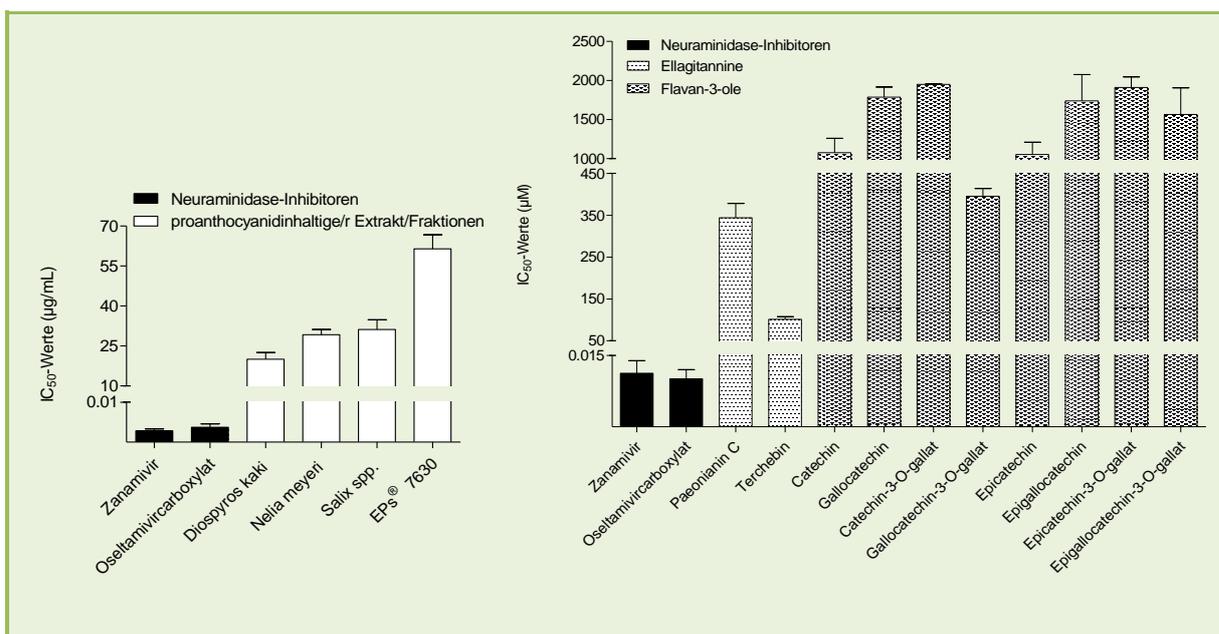


Abb. 13 Inhibition der Influenzavirus NA (N1) durch proanthocyanidin-haltige Extrakte/Fractionen, Ellagitannine und Flavan-3-ole

Mittelwerte IC_{50} -Werte (95 % Konfidenzintervall) ($\mu\text{g/mL}$ bzw. μM) (n= 3-6 Experimente) one-way-ANOVA, keine Signifikanz

3.1.2.3 Vergleich des inhibierenden Potentials gegenüber der *V. cholerae* Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Im Anschluss an die Betrachtung der Aktivität gegenüber der *V. cholerae* NA und Influenzavirus A NA (N1) wurde nachfolgend der Fokus auf den Vergleich des Hemmpotentials zwischen beiden NAs gelegt.

Interessanterweise hemmten die Positivkontrollen Zanamivir (IC_{50} -Wert viral: 3,7 $\text{ng/mL} \triangleq 11 \mu\text{M}$ vers. bakteriell: 17 $\mu\text{g/mL} \triangleq 52 \mu\text{M}$) und Osetamivircarboxylat (IC_{50} -Wert viral: 2,9 $\text{ng/mL} \triangleq 10 \text{ nM}$ vers. bakteriell 41 $\mu\text{g/mL} \triangleq 144 \mu\text{M}$) die virale NA effektiver als das bakterielle Enzym. Konträr dazu inhibierten alle polyphenolischen Substanzen die bakterielle NA stärker als die virale Variante (Tab. 12). Im Folgenden wurden die strukturellen Voraussetzungen für den Hemmeffekt näher betrachtet.

Proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen

Alle proanthocyanidinhaltigen Extrakte/Fraktionen zeigten ein ausgeprägtes Potential gegenüber beiden NAs. Im Gegensatz zu den Positivkontrollen hemmten die Proanthocyanidine das bakterielle Enzym (IC_{50} -Wert: 0,5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) effektiver als die virale NA (IC_{50} -Wert: 20-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In absteigender Wirkstärke ergab sich für die Inhibition der *V. cholerae* NA folgende Reihung: *Diospyros*-Proanthocyanidine (Prodelphinidine mit Procyanidin-Anteilen) > EPs® 7630 (prodelphinidinhaltig) > 2,3-*cis*-*Nelia*- und 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine. Im Hinblick auf die virale NA resultierte folgende Reihenfolge: *Diospyros*-Proanthocyanidine > 2,3-*cis*-*Nelia*- und 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine > EPs® 7630. Offenbar kommen dem Hydroxylierungsmuster und der Art der Flavanylbausteine ein aktivitätssteigernder Effekt zu. Welche strukturellen und insbesondere stereochemischen Besonderheiten der unterschiedlichen Wirkungen gegenüber der bakteriellen bzw. viralen NA zugrunde liegen, ist aus diesen Daten nicht ableitbar.

Flavan-3-ole

Auch bei den Vertretern der Flavan-3-ole scheint der Galloylsubstituent Einfluss auf das Hemmpotential zu nehmen. Während die galloylierten Substanzen wie Catechin-3-*O*-gallat sowie Epi(gallo)catechin-3-*O*-gallat ein ausgeprägtes bis moderates Potential gegenüber der *V. cholerae* NA entwickelten, war dieses gegenüber dem viralen Enzym (IC_{50} -Wert bakteriell: 55-211 μM vers. viral: 1565-1949 μM) nur sehr schwach. Davon ausgenommen ist Gallocatechin-3-*O*-gallat, welches unabhängig von der Herkunft des Enzyms beide NAs mehr oder weniger inhibierte (IC_{50} -Werte bakteriell: 25 μM vers. viral: 344 μM). Die ungalloylierten Flavan-3-ole wie (Gallo)Catechin und deren Epimere hemmten sowohl das bakterielle als auch das virale Enzym nur sehr schwach (IC_{50} -Wert bakteriell: 1953-2186 μM vers. viral: 1053-1739 μM).

Ellagitannine

Ähnlich wie die proanthocyanidinhaltigen Extrakte/Fraktionen und die Flavan-3-ole inhibierten die Ellagitannine Paeonianin C und Terchebin die bakterielle NA potenter als das virale Enzym (IC_{50} -Wert bakteriell: 15 μM und 31 μM vers. viral: 101 μM und 344 μM).

3.1.2.1 Inhibierendes Potential von Wirkstoffkombinationen

Ergänzend zur Erfassung des Einzelpotentials gegenüber der *V. cholerae* NA (Tab. 12) wurde nachfolgend der Hemmeffekt von Wirkstoffkombinationen überprüft. Hierfür wurden Zusammensetzungen aus Zanamivir und dem prodelphinidinhaltigen EPs® 7630 (1:10, 1:5, 1:1, 5:1, 10:1) und aus Zanamivir und der Reinsubstanz 2,6-Dihydroxybenzoesäure (1:8) ausgewählt.

Mittlere Effektparameter von Zanamivir, EPs® 7630 sowie deren Kombinationen

Der Vergleich der ermittelten Einzelpotentiale zeigte, dass der EPs® 7630 (D_m : 1,7) die bakterielle NA 10-fach stärker inhibierte als Zanamivir (D_m : 17). Ähnliche Aktivitäten wie für EPs® 7630 allein wurden für die Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen 1:5 und 1:10 (D_m : beide 1,4) beobachtet. Die

Kombinationen 5:1 (D_m : 7,8) und 10:1 (D_m : 9,1), bei welchen Zanamivir den maßgeblichen quantitativen Anteil besaß, zeigten zwar niedrigere D_m -Werte als Zanamivir allein, waren dagegen nicht so effektiv wie EPs® 7630. Das Potential der 1:1 Kombination (D_m : 7,8) war vergleichbar mit dem der 5:1 bzw. 10:1 Kombination (Tab. 13).

Abgeleitet aus den ermittelten Steigungen (m) verliefen die Konzentrations-Wirkungskurven von EPs® 7630 ($m_1 > 1$) und allen Kombinationen ($m_{1,2} > 1$) sigmoidal. Die Kurve von Zanamivir ($m_2 < 1$) entsprach dagegen einem flachen sigmoidalen Verlauf (Tab. 13). Unter diesem Gesichtspunkt ist eine eindeutige Zuordnung der räumlichen Bindungsdomäne für Zanamivir und EPs® 7630 nicht möglich. Aufgrund dessen erfolgt die Berechnung des CI zum einen auf der Annahme einer identischen Bindungsstelle (exklusiv; Formel 5), zum anderen basierend auf verschiedenen Bindungsstellen (nicht-exklusiv; Formel 6) (Chou und Talalay, 1984). Für die anschließende Auswertung des therapeutisch relevanten Bereiches ($fa \geq 0,5$) bedeutet $CI < 1$ Synergie, $CI = 1$ Additivität und $CI > 1$ Antagonismus.

Tab. 13 Mittlere Effektparameter von Zanamivir, EPs® 7630 sowie deren Kombinationen

	D_m	m
Einzelsubstanz		
EPs® 7630	1,7 (1,6-1,9)	1,4 (1,0-1,8)
Zanamivir	17 (16-18)	0,9 (0,7-1,0)
Zanamivir/ EPs® 7630-Kombination		
(5:1)	7,8 (6,3-9,3)	1,1 (0,4-1,8)
(10:1)	9,1 (7,3-10,8)	1,7 (1,2-2,0)
(1:1)	7,8 (7,0-8,7)	1,7 (1,4-2,0)
(1:5)	1,4 (1,0-1,8)	1,2 (0,8-1,5)
(1:10)	1,4 (1,3-1,6)	1,0 (0,8-1,3)

Mittelwerte von D_m und m (95 % Konfidenzintervall) ($n = 3-4$ Experimente)

Kombinationsindex und -effekte der Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen

Die Zanamivir/EPs® 7630-Kombination 1:1 wies unabhängig von der Exklusivität identische Effekte auf. Im fa -Bereich von 0,5-0,95 wurde für die Kombination durchgängig ein antagonistischer Effekt festgestellt, welche sich in höheren Niveaus der Additivität näherte.

Unter Annahme der Exklusivität wies das 1:5 Verhältnis fortlaufend Synergie (fa -Bereich: 0,5-0,9) auf, wobei der Kurvenverlauf ab einem fa -Wert von 0,95 in Antagonismus umschwenkte. Unter Annahme der Nicht-Exklusivität erfolgte zunächst ein Umschwung zur Additivität (fa -Wert: 0,9) und anschließend der antagonistische Effekt (fa -Wert: 0,95).

Die Zanamivir/EPs® 7630-Kombination 1:10 zeigte unabhängig von der Exklusivität durchgängig synergistische Effekte. Ähnliches wurde für die 10:1 Kombination beobachtet, allerdings war in höheren fa -Bereichen Additivität zu beobachten.

Die Zanamivir/EPs® 7630-Kombination 5:1 wies bis zu einem fa -Wert von 0,5/0,6 (exklusiv/nicht-exklusiv) einen antagonistischen Effekt auf, welcher darüber hinaus in Synergie umschwenkte.

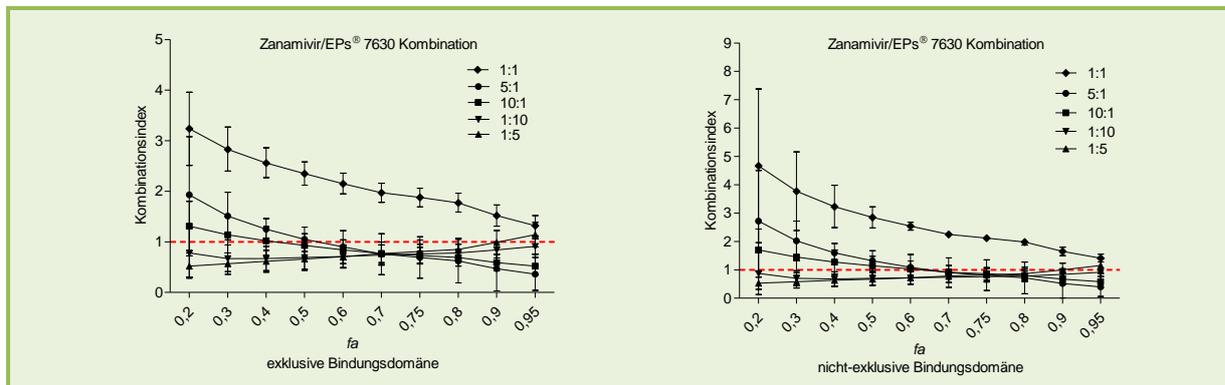


Abb. 14 fa -CI-Diagramm der Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen
Mittelwerte des CI (95 % Konfidenzintervall) ($n= 3-4$ Experimente)

Insofern eine Kombination in den fa -Bereichen 0,5-0,95 durchgängig synergistische Effekte zeigt, kann laut Chou der CI_{wt} berechnet werden (Chou, 2006). Wie in Abb. 14 sichtbar, traf dies lediglich für die Zanamivir/EPs® 7630-Kombination 1:10 zu. Um gleichwohl alle Kombinationen eingehender bewerten zu können, wurde davon abgesehen und der CI_{wt} für alle Verhältnisse ermittelt (Tab. 14).

Unabhängig von der Exklusivität ergab der CI_{wt} für die Kombinationen 5:1, 1:1, 1:5 und 1:10 identische Gesamteffekte. So hemmte die Zanamivir/EPs® 7630-Kombination 5:1 auf synergistische, die 1:10 auf moderat synergistische, die 1:5 auf nahezu additive und die 1:1 auf antagonistische Weise die *V. cholerae* NA. Eine Ausnahme bildete die 1:10 Kombination, in der EPs® 7630 quantitativ überwog. So wies die Kombination unter Annahme einer identischen Bindungsdomäne für Zanamivir und EPs® 7630 einen synergistischen Gesamteffekt auf, welcher unter dem Aspekt verschiedener Bindungstaschen moderat synergistisch war (Tab. 14).

Tab. 14 Gewichtete Kombinationsindizes der Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen bei 50%iger, 75%iger, 90%iger und 95%iger Inhibition der *V. cholerae* NA

Kombination		CI_{50}	CI_{75}	CI_{90}	CI_{95}	CI_{wt}	Gesamteffekt
(5:1)	exklusiv	1,1 (0,8-1,3)	0,7 (0,2-1,0)	0,5 (0,03-0,9)	0,4 (0,03-0,8)	0,5	1
	nicht-exklusiv	1,3 (0,9-1,7)	0,8 (0,2-1,3)	0,5 (0,01-1,0)	0,4 (0,06-0,8)	0,6	
(10:1)	exklusiv	0,9 (0,7-1,1)	0,7 (0,6-0,9)	0,6 (0,4-0,7)	0,5 (0,3-0,7)	0,6	1
	nicht-exklusiv	1,1 (0,8-1,4)	0,8 (0,6-1,0)	0,6 (0,5-0,9)	0,5 (0,4-0,8)	0,7	2
(1:1)	exklusiv	2,3 (2,1-2,6)	1,8 (1,6-2,0)	1,5 (1,3-1,7)	1,3 (1,1-1,5)	1,6	4
	nicht-exklusiv	2,6 (2,1-3,2)	2,1 (1,7-2,4)	1,6 (1,4-1,9)	1,4 (1,2-1,6)	1,7	
(1:5)	exklusiv	0,7 (0,4-0,9)	0,8 (0,6-1,0)	1,0 (0,8-1,2)	1,1 (0,9-1,4)	1,0	3
	nicht-exklusiv	0,7 (0,4-0,9)	0,8 (0,6-1,0)	1,0 (0,8-1,2)	1,2 (0,9-1,4)	1,0	
(1:10)	exklusiv	0,7 (0,5-0,9)	0,8 (0,6-0,9)	0,8 (0,7-1,0)	0,9 (0,7-1,0)	0,8	2
	nicht-exklusiv	0,7 (0,5-0,9)	0,8 (0,6-0,9)	0,8 (0,7-1,0)	0,9 (0,7-1,0)	0,8	

Mittelwerte des CI (95 % Konfidenzintervall) ($n= 3-4$ Experimente)
1) synergistisch 2) moderat synergistisch 3) nahezu additiv 4) antagonistisch

Mittlere Effektparameter von Zanamivir, 2,6-Dihydroxybenzoesäure sowie deren Kombination

Abgeleitet aus den mittleren Effektparametern inhibierte Zanamivir (D_m : 17) die *V. cholerae* NA ca. 10-fach stärker als die 2,6-Dihydroxybenzoesäure (D_m : 127). Die 1:8 Kombination wies einen D_m von 47 auf (Tab. 15). Angesichts der verschiedenen Steigungen (m) der Konzentrations-Wirkungskurven von Zanamivir ($m_1 < 1$; flach sigmoidal), 2,6-Dihydroxybenzoesäure ($m_2 = 1$; hyperbol) und deren Kombination ($m_{1,2} > 1$; sigmoidal) wurde der CI , ähnlich wie bei den Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen, mittels Formel 5 und Formel 6 berechnet (Abb. 15).

Tab. 15 Mittlere Effektparameter der 1:8 Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Kombination

Einzelsubstanz	D_m	m
Zanamivir	17 (16-18)	0,8 (0,7-1,0)
2,6-Dihydroxybenzoesäure	127 (118-138)	1,0 (0,6-1,5)
Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Kombination		
(1:8)	47 (27-66)	2,0 (0,6-3,4)

Mittelwerte von D_m und von m (95 % Konfidenzintervall) ($n=3$ Experimente)

Kombinationsindex und -effekt der Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Kombination

Für die 1:8 Kombination aus Zanamivir und 2,6-Dihydroxybenzoesäure wurden unabhängig von der Exklusivität bei niedrigem Effektniveau (fa : 0,5-0,6) ein antagonistischer Effekt beobachtet. Ab einem fa -Wert von 0,7 schwang dieser in Synergie um (Abb. 15). Wie für die Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen wurde für die Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Zusammensetzung der CI_{wt} berechnet (Tab. 16). Unabhängig von der Exklusivität lag für die Kombination Synergismus als Gesamteffekt vor.

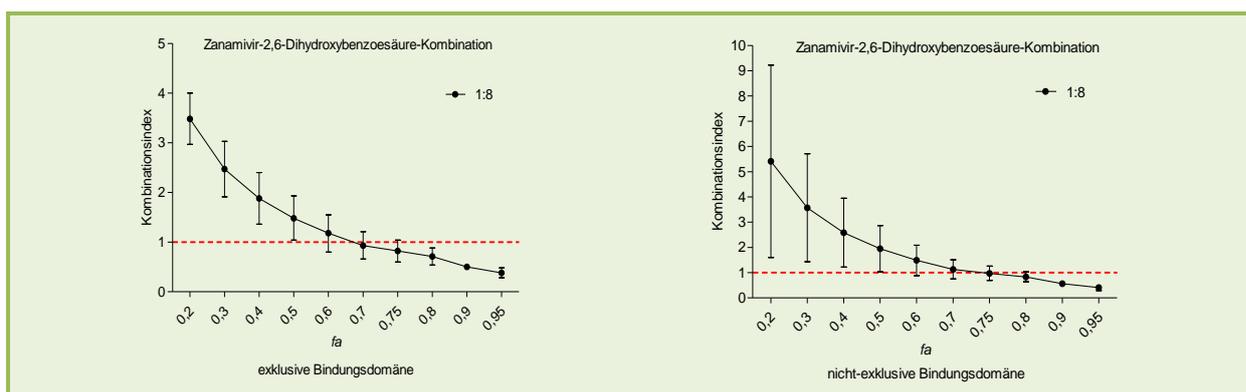


Abb. 15 fa - CI -Diagramm der 1:8 Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Kombination

Mittelwerte des CI (95 % Konfidenzintervall) ($n=3$ Experimente)

Tab. 16 Gewichtete Kombinationsindizes der Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Kombination bei 50%iger, 75%iger, 90%iger und 95%iger die Inhibition der *V. cholerae* NA

Kombination		CI_{50}	CI_{75}	CI_{90}	CI_{95}	CI_{wt}	Gesamteffekt
(1:8)	exklusiv	1,5 (1,0-1,9)	0,8 (0,6-1,0)	0,5 (0,4-0,5)	0,3 (0,3-0,5)	0,6	1
	nicht-exklusiv	1,9 (1,0-2,9)	0,9 (0,7-1,2)	0,6 (0,5-0,6)	0,4 (0,3-0,5)	0,7	

Mittelwerte des CI (95 % Konfidenzintervall) ($n=3$ Experimente) 1) synergistisch

Streuungsvergleich mittels Levene-Test

Für die Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen wurden bei niedrigen $f\bar{a}$ -Werten stark ausgeprägte Streuungen um den Mittelwert beobachtet. Aufgrund dessen erfolgte ein Vergleich mit den Streuungen der Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Kombination. Der Levene-Test ergab die Varianzhomogenität beider Zusammensetzungen.

3.2 Ko-Kristallisation der Neuraminidase-Inhibitoren und der *V. cholerae* Neuraminidase sowie deren Röntgenstrukturanalyse

Im MuNANA-Fluoreszenz-Assay wurde für die gleiche Testsubstanz differierende IC_{50} -Werte gegenüber einer *V. cholerae* NA und der Influenzavirus A NA (N1) beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.2). Zur Klärung dieses Phänomens wurde eine computergestützte Analyse von Röntgenstrukturdaten von Ko-Kristallisaten aus Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat und der jeweiligen NA angestrebt. Zwar existieren Datensätze von Ko-Kristallisaten aus NA-Inhibitoren und verschiedenen viralen NAs, demgegenüber fehlen bakterielle Pendants. Zur Gewinnung solcher Kristalle wurde zunächst eine *V. cholerae* NA exprimiert und gereinigt. In Vorbereitung auf die anschließende Ko-Kristallisation erfolgte die Bestimmung der Enzymkinetik. Nach der erfolgreichen Kristallisation mit dem jeweiligen NA-Inhibitor fand die Röntgenstrukturanalyse statt.

3.2.1 Enzymkinetik der exprimierten *V. cholerae* Neuraminidase

Zur Bestimmung der Enzymkinetik der exprimierten und gereinigten *V. cholerae* NA wurde der MuNANA-Fluoreszenz-Assay verwendet (vgl. Kapitel 2.7.3). Zur Umrechnung der rFU in eine Konzentrationsangabe, wurde eine Standardgerade mit steigenden Konzentrationen an 4-Methylumbelliferon erstellt. Aus einem doppelt-logarithmischen Plot wurde die benötigte Regressionsgerade ($y=0,8671x + 2,452$ [$r=0,99$]) ermittelt (Abb. 16).

Der Einfluss variierender Enzymkonzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch die graphische Darstellung der Geschwindigkeit gegen die Zunahme einer definierten Enzymmenge (0,1-0,8 μ L) aufgezeigt. Wie aus Abb. 16 ersichtlich, nahm mit steigender Enzymkonzentration die Geschwindigkeit linear zu.

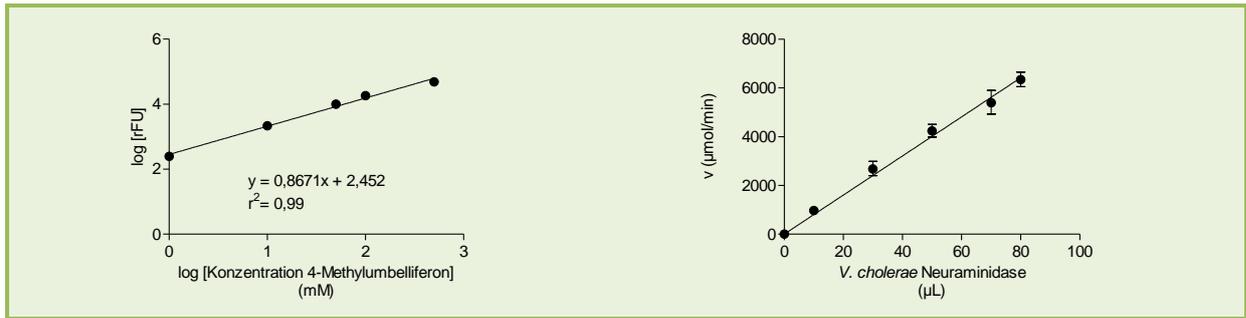


Abb. 16 links: doppelt-logarithmische Darstellung der 4-Methylumbelliferon-Konzentration gegen die rFU; rechts: Einfluss der Enzymkonzentration auf den MuNANA-Umsatz
Mittelwerte (95 % Konfidenzintervall) ($n=3-7$ Experimente)

Die Ergebnisse zur initialen Hydrolysegeschwindigkeit variierender MuNANA-Konzentrationen bei einer konstanten Enzymmenge sind in Abb. 17 dargestellt. Mithilfe des Lineweaver-Burk-Diagramms erfolgte die Ermittlung der spezifischen Enzymparameter $K_m = 1,48$ mM und $v_{max} = 126$ $\mu\text{mol}/\text{min}$. Die Aktivität betrug 26,7 U/mL.

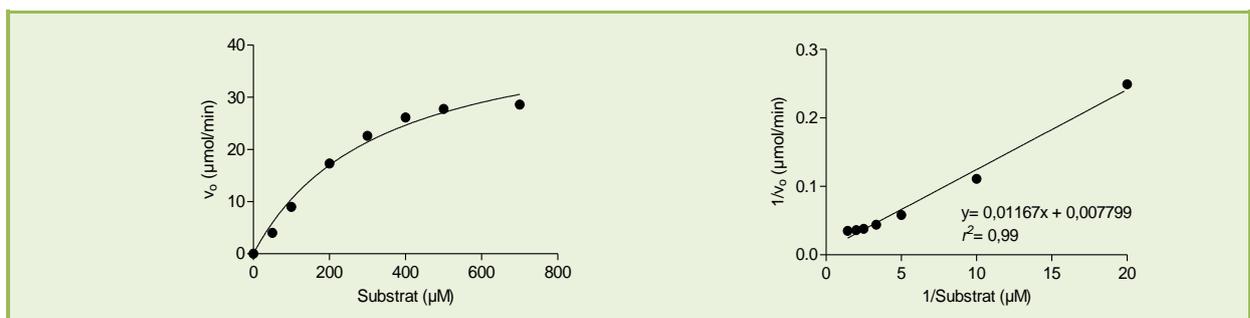


Abb. 17 Effekt steigender MuNANA-Konzentrationen auf die Initialgeschwindigkeit des NA-katalysierten Umsatzes

links: asymptotische - rechts: doppelt-reziproke Darstellung (Lineweaver-Burk-Diagramm)

3.2.2 Ko-Kristallisation und Datensammlung

Nach der Bestimmung der Enzymkinetik wurde mit den Kristallisationsversuchen fortgefahren. In Abb. 18 sind die jeweiligen Kristallisationsbedingungen aufgeführt, und die Kristalle dargestellt, die zur Röntgenstrukturanalyse genutzt wurden. Tab. 17 gibt die Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung der Ko-Kristallisate wieder.

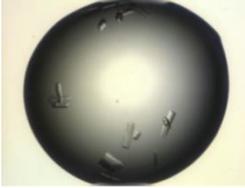
Kristallisationstropfen	Kristallisationsbedingungen	
		<i>V. cholerae</i> NA mit 20 mM Oseltamivircarboxylat
	Proteinkonzentration	6,29 mg/mL
	Screen	JBS-PEG
	Bedingung	20 % w/v PEG 3350, 200 mM Lithiumacetat
		<i>V. cholerae</i> NA mit 20 mM Zanamivir
	Proteinkonzentration	6,78 mg/mL
	Screen	JBS-PEG
	Bedingung	20 % w/v PEG 3350, 200 mM Natriumfluorid

Abb. 18 Kristallisationstropfen mit dem Ko-Kristallisat und den Kristallisationsbedingungen

Tab. 17 Röntgenstrukturanalyse: Statistik

	<i>V. cholerae</i> NA mit	
	Oseltamivircarboxylat	Zanamivir
Datensammlung		
Raumgruppe	P 21 21 21	C 1 2 1
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	71,6; 77,9; 163,5	190,6; 50,3; 86,1
α, β, γ (°)	90; 90; 90	90; 107,2; 90
Auflösung (Å)	44,3-1,87 (1,94-1,87)	46-1,75 (1,81-1,75)
R_{merge} (%)	0,10 (0,50)	0,04 (0,48)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	10,2 (2,38)	14,6 (1,78)
Vollständigkeit (%)	99,2 (97,9)	97,8 (96,8)
Redundanz	3,7 (3,5)	2,3 (2,2)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	1,87	1,75
Anzahl der Reflexe	282260	176727
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	0,17/0,21	0,17/0,21
Anzahl an Atomen	6631	6610
Protein	5834	5849
Ligand	36	50
Wasser	761	711
Durchschnittlicher B-Faktor (Å²)^b		
insgesamt	24,5	30,7
Protein	23,5	29,8
Ligand	19,8	35,0
Lösungsmittel	31,9	37,9
Standardabweichungen		
Bindungslängen (Å)	0,007	0,007
Bindungswinkel (°)	1,04	1,10

3.3 Computergestützte Analyse der *V. cholerae* Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1) sowie der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Neuraminidasen und deren Inhibitoren

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.2 zeigten differierende IC_{50} -Werte für dieselbe Testsubstanz gegenüber der *V. cholerae* NA und der Influenzavirus A NA (N1). Infolgedessen wurden computergestützt zum einen der räumliche Aufbau der bakteriellen und viralen NA betrachtet, zum anderen die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den NA-Inhibitoren Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat und der jeweiligen NA analysiert.

3.3.1 Vergleich der *V. cholerae* Neuraminidase mit der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Das Alignment der Aminosäuresequenzen der *V. cholerae* NA (PDB ID: 1W0O) und der Influenzavirus A NA (N1) (PDB ID: 3NSS) ergab eine Identität von 13 % und eine Ähnlichkeit von 21 %. Fokus wurde dabei auf die zentralen Domänen gelegt, in welche die NA-Inhibitoren binden. Im Hinblick auf die dreidimensionale Faltung ist die virale NA ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 240 kDa. Der Aufbau ähnelt einem Pilz. Im kastenförmigen Kopf befinden sich vier katalytische Zentren, der hydrophobe Stiel dient der Verankerung auf der Virushülle. Jedes propellerförmige Monomer des Kopfes wird aus sechs identischen β -Faltblättern gebildet (Varghese et al., 1983). Die *V. cholerae* NA ist ein aus drei Einheiten bestehendes Monomer und weist ein Molekulargewicht von etwa 83 kDa auf. Die Sandwichform ergibt sich aus einem zentralen, sechs-blättrigen β -Propeller und zwei flankierenden, Lektin-ähnlichen Domänen. Insgesamt liegen 54 β -Faltblätter und fünf α -Helices vor. Die bakterielle NA weist eine Kette mit 781 Aminosäuren auf, die virale hingegen zwei Ketten mit je 388 Aminosäuren. Wie in vielen nicht-viralen NAs kommt in der Aminosäuresequenz der bakteriellen NA eine sich mehrfach wiederholende „Asp-box“ (Ser/Thr-X-Asp-[X]-Gly-X-Thr-Trp/Phe) vor. Die *V. cholerae* NA enthält fünf solcher „Box“en, wovon eine in abgewandelter Form (Tyr-Asp-Val-Ala-Ser-Gly-Asn-Trp) vorliegt. Ein weiteres markantes Merkmal in der Aminosäureabfolge ist das RIP-/RLP-Motiv (Arg-Ile-Pro/Arg-Leu-Pro). Korrespondierend dazu kommt in der Aminosäuresequenz der untersuchten Influenzavirus A NA (N1) ein REP-Motiv (Arg-Glu-Pro) vor. Ein weiterer Unterschied betrifft die Aminosäure Cystein, welche 34-mal in 3NSS auftritt und in 1W0O gänzlich fehlt. Ferner differenziert die Anzahl an Ca^{2+} beide NAs. Während die bakterielle NA ein Ca^{2+} bindet, sind dies drei im viralen Enzym (Crennell et al., 1994, Xu et al., 2008). Funktionell ist Ca^{2+} in der *V. cholerae* NA an der Aktivität und der Strukturausbildung beteiligt, in der Influenzavirus A NA (N1) wurde zudem ein Einfluss auf die Thermostabilität beschrieben (Burmeister et al., 1994, Crennell et al., 1994).

Tab. 18 Charakteristika der *V. cholerae* NA und Influenzavirus A NA (N1)

	NA	
	bakteriell	viral
PDB ID	1W0O	3NSS
Organismus	<i>V. cholerae</i>	Influenzavirus A/California/04/2009 [H1N1]
Klassifikation	Hydrolase	
Ligand	1 Ca ²⁺	3 Ca ²⁺
Länge	781	388
Kette	A	A und B
Struktur	Monomer	Homotetramer

3.3.2 Analyse der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Neuraminidasen und deren Inhibitoren

3.3.2.1 Wechselwirkungen zwischen der *V. cholerae* Neuraminidase und Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat

Zur Erklärung der differierenden IC_{50} -Werte von Zanamivir (17 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 52 \mu\text{M}$) und Oseltamivircarboxylat (41 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 144 \mu\text{M}$) gegenüber der *V. cholerae* NA wurden die Röntgenstrukturdaten der eigenen Ko-Kristallisate analysiert.

Eine äquivalente Wechselwirkung zeigte die in beiden Inhibitoren vorkommende 1- bzw. 2-Carboxygruppe. Diese bildete Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen mit drei Argininresten (Arg 250/661/738) aus. Des Weiteren banden sowohl die positiv geladene 4-Guanidinogruppe (Zanamivir) als auch die 5-Aminogruppe (Oseltamivircarboxylat) in eine elektronegative Bindungstasche, welche jeweils aus Glu 269, Asp 276 und Asp 318 bestand. Ein Unterschied ergab sich in der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen. Während die 4-Guanidinostruktur eine Bindung zu Asp 276 und Asp 318 ausbildete, wechselwirkte die 5-Aminofunktion (Oseltamivircarboxylat) lediglich mit Asp 276. Ein weiterer Unterschied betraf die 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylgruppe (Zanamivir). Diese ging Wasserstoffbrücken mit Asn 344 und Asp 663 ein. Die 3-(1')-Ethylpropoxygruppe (Oseltamivircarboxylat) wechselwirkte aufgrund der hydrophoben Eigenschaften mit den Aminosäuren Ile 599, Leu 606 sowie Phe 664. Interessanterweise interagierte die π -Bindung des Dihydro-4*H*-Pyransrings von Zanamivir mit den unpolaren Ile 251 und Try 766, während für den Cyclohex-1-enring des Oseltamivircarboxylats keine Wechselwirkungen zu beobachten waren (Abb. 19, Tab. 19).

Tab. 19 Wechselwirkungen und Bindungslängen zwischen der *V. cholerae* NA und den Inhibitoren

Proteingruppe	Ligandengruppe Zanamivir/Oseltamivircarboxylat	Distanz (Å)		Wechselwirkung
		Zanamivir	Osetamivircarboxylat	
Arg 250	2-/1-Carboxy-	2,94/3,07	2,81/3,29	1 ; 4
Ile 251	Ring		-	5
Glu 269	4-Guanidino-/5-Amino-			3
Asp 276	4-Guanidino-/5-Amino-	2,99/3,52	2,96	2 ; 3
Asp 318	4-Guanidino-/5-Amino-	3,1		2 ; 3
Asn 344	6-(1',2',3')-Trihydroxypropyl-	2,7	-	2
Ile 599	3-(1')-Ethylpropoxy-	-		5
Leu 606	3-(1')-Ethylpropoxy-	-		5
Arg 661	2-/1-Carboxy-	2,92/3,25	3,22	1 ; 4
Asp 663	6-(1',2',3')-Trihydroxypropyl-	2,66/3,12	-	2
Phe 664	3-(1')-Ethylpropoxy-	-		5
Arg 738	2-/1-Carboxy-	2,79/2,97	2,77/2,97	1 ; 4
Try 766	Ringsystem		-	5

Die Distanzen wurden zwischen den entsprechenden Sauerstoff- und Stickstoffatomen gemessen.

1) Wasserstoffbrückenbindung (Akzeptor) 2) Wasserstoffbrückenbindung (Donor)

3) positive Ionisierung 4) negative Ionisierung 5) hydrophobe Wechselwirkung

3.3.2.2 Wechselwirkungen zwischen der Influenzavirus A Neuraminidase (N1) und Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat

Abgeleitet von den IC_{50} -Werten aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay inhibierten sowohl Zanamivir als auch Oseltamivircarboxylat die Influenzavirus A NA (N1) im nahezu gleichen Ausmaß (Tab. 12). Unterstützend dazu wurden die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen der viralen NA und Zanamivir (PDB ID: 3TI5) sowie Oseltamivircarboxylat (PDB ID: 3TI6) analysiert. Die gewonnenen Daten sind in Abb. 19 und Tab. 20 zusammengefasst.

Die Analyse ergab, dass die bei beiden NA-Inhibitoren vorkommende 1- bzw. 2-Carboxygruppe Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen mit drei konservierten Argininresten (Arg 118/292/371) ausbildete. Eine weitere Gemeinsamkeit war die Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff der 4- bzw. 5-Acetamidogruppe und dem Arg 152. Die jeweiligen Distanzen der Bindungen waren sich ähnlich (Tab. 20). Unterschiedliche Wechselwirkungen zeigten die Substituenten am C-5 des Cyclohex-1-enrings (Oseltamivircarboxylat) bzw. am C-4 des Dihydro-4H-Pyranrings (Zanamivir). Die 5-Aminofunktion (Oseltamivircarboxylat) band in die elektronegative Bindungstasche (Glu 119; Asp 151) und bildete eine ionische Wechselwirkung zu Glu 119 aus. Die Bindungstasche für die 4-Guanidinogruppe (Zanamivir) bestand hingegen aus Asp 151, Trp 178 und Glu 227. Dabei traten ionische Wechselwirkungen mit Asp 151 und Trp 178 auf. Des Weiteren bildete die hydrophile 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylgruppe (Zanamivir) mit der Carboxylgruppe von Glu 276 Wasserstoffbrücken aus, während die 3-(1')-Ethylpropoxygruppe (Oseltamivircarboxylat)

hydrophobe Wechselwirkungen mit Ile 222 einging. Seitens Zanamivir ergab sich eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Dihydro-4*H*-Pyranring und Try 406.

Tab. 20 Wechselwirkungen und Bindungslängen zwischen der Influenzavirus NA (N1) und den Inhibitoren

Proteingruppe	Ligandengruppe Zanamivir/Oseltamivircarboxylat	Distanz (Å)		Wechselwirkung
		Zanamivir	Oseltamivircarboxylat	
Arg 118	2-/1-Carboxy-	2,76/3,37	2,88/3,50	1 ; 4
Glu 119	4-Guanidino-/5-Amino-	-	2,8	2 ; 3
Asp 151	4-Guanidino-/5-Amino-	2,96		2 ; 3
Arg 152	Carbonyl- der 5-/4-Acetamido-	2,86	2,81	1
Trp 178	4-Guanidino-/5-Amino-	2,75/3,09	-	2
Ile 222	3-(1'-Ethylpropoxy-	-		5
Glu 227	4-Guanidino-/5-Amino-		-	3
Glu 276	6-(1',2',3')-Trihydroxypropyl-	2,72/2,59	-	2
Arg 292	2-/1-Carboxy-	3,19/3,24	3,1	1 ; 4
Arg 371	2-/1-Carboxy-	2,7/2,94	2,64/2,83	1 ; 4
Try 406	Ringsystem		-	5

Die Distanzen wurden zwischen den entsprechenden Sauerstoff- und Stickstoffatomen gemessen.

1) Wasserstoffbrückenbindung (Akzeptor) 2) Wasserstoffbrückenbindung (Donor)

3) positive Ionisierung 4) negative Ionisierung 5) hydrophobe Wechselwirkung

3.3.2.3 Vergleich der Wechselwirkungen der NA-Inhibitoren mit der *V. cholerae* Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Die Ergebnisse aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay zeigten, dass die NA-Referenzsubstanzen Zanamivir und Oseltamivircarboxylat die *V. cholerae* NA im mikromolaren Konzentrationsbereich inhibierten, die Influenzavirus A NA (N1) hingegen im nanomolaren Bereich (Tab. 12). Nachfolgend wurden die Wechselwirkungen der NA-Inhibitoren mit der bakteriellen und der viralen Bindungstasche verglichen (Abb. 19).

In beiden NAs lagen sowohl Zanamivir als auch Oseltamivircarboxylat in der Sessel-Konformation vor. Dies gewährleistete die äquatoriale Stellung der Carboxygruppe, welche folglich in der Lage war, Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen zu Arg 118/292/371 (viral) bzw. Arg 250/661/738 (bakteriell) auszubilden. Die Abstände zwischen den entsprechenden Stickstoff- und Sauerstoffatomen wiesen keine signifikanten Längenunterschiede auf (Abb. 19, Tab. 20). Eine weitere Ähnlichkeit wurde zwischen der in beiden NAs vorkommenden elektronegativen Bindungstasche und der positiv geladenen 4-Guanidinogruppe (Zanamivir) bzw. 5'-Aminogruppe (Oseltamivircarboxylat) beobachtet. In der viralen Domäne dirigierte Glu 227 die 4-Guanidinogruppe, sodass diese drei Wasserstoffbrücken zu Asp 151 und Trp 178 ausbildete. Für die 5-Aminogruppe wurde durch Asp 151 dirigiert und interagiert über eine Wasserstoffbrücke mit Glu 119. Vergleichbare Wechselwirkungen traten in der bakteriellen Bindungstasche auf. Darin positionierte gleichfalls eine Glutaminsäure (Glu 269) die 4-Guanidinogruppe, sodass diese stabilisierende Wasserstoffbrücken zu

Asp 276 und Asp 318 ausbildete. Die 5-Aminogruppe interagiert lediglich mit Asp 276 direkt, während von Glu 269 und Asp 318 ein dirigierender Effekt ausging. Im Hinblick auf die hydrophoben Wechselwirkungen wurden weitere Unterschiede sichtbar. Während der Dihydro-4*H*-Pyranring (Zanamivir) sowohl in der viralen Domäne (Try 406) als auch in der bakteriellen Bindungstasche (Try 766) wechselwirkte, interagierte der Cyclohex-1-enring des Oseltamivircarboxylats lediglich in der bakteriellen Bindungsdomäne mit Phe 664. Ein weiterer Unterschied ergab sich bezüglich der 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylgruppe (Zanamivir) und der 3-(1')-Ethylpropoxygruppe (Oseltamivircarboxylat). Der hydrophile Charakter der 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylseitenkette ermöglichte die Ausbildung von stabilisierenden Wasserstoffbrücken zu Glu 276 (viral) bzw. Asn 344 und Asp 663 (bakteriell). Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft der 3-(1')-Ethylpropoxygruppe wechselwirkte diese mit den sperrigen Seitenketten des Ile 222 (viral) bzw. des Ile 599 und Leu 606 (bakteriell). Auffällig war, dass der Carbonylsauerstoff der 5- (Zanamivir) bzw. 4-Acetamidogruppe (Oseltamivircarboxylat) nur in der viralen Domäne (Arg 152) Wasserstoffbrückenbindungen ausbildete. Eine vergleichbare Wechselwirkung mit der bakteriellen Bindungstasche war nicht feststellbar. Möglicherweise erklärt dies den Wirkunterschied gegenüber der viralen und bakteriellen NA.

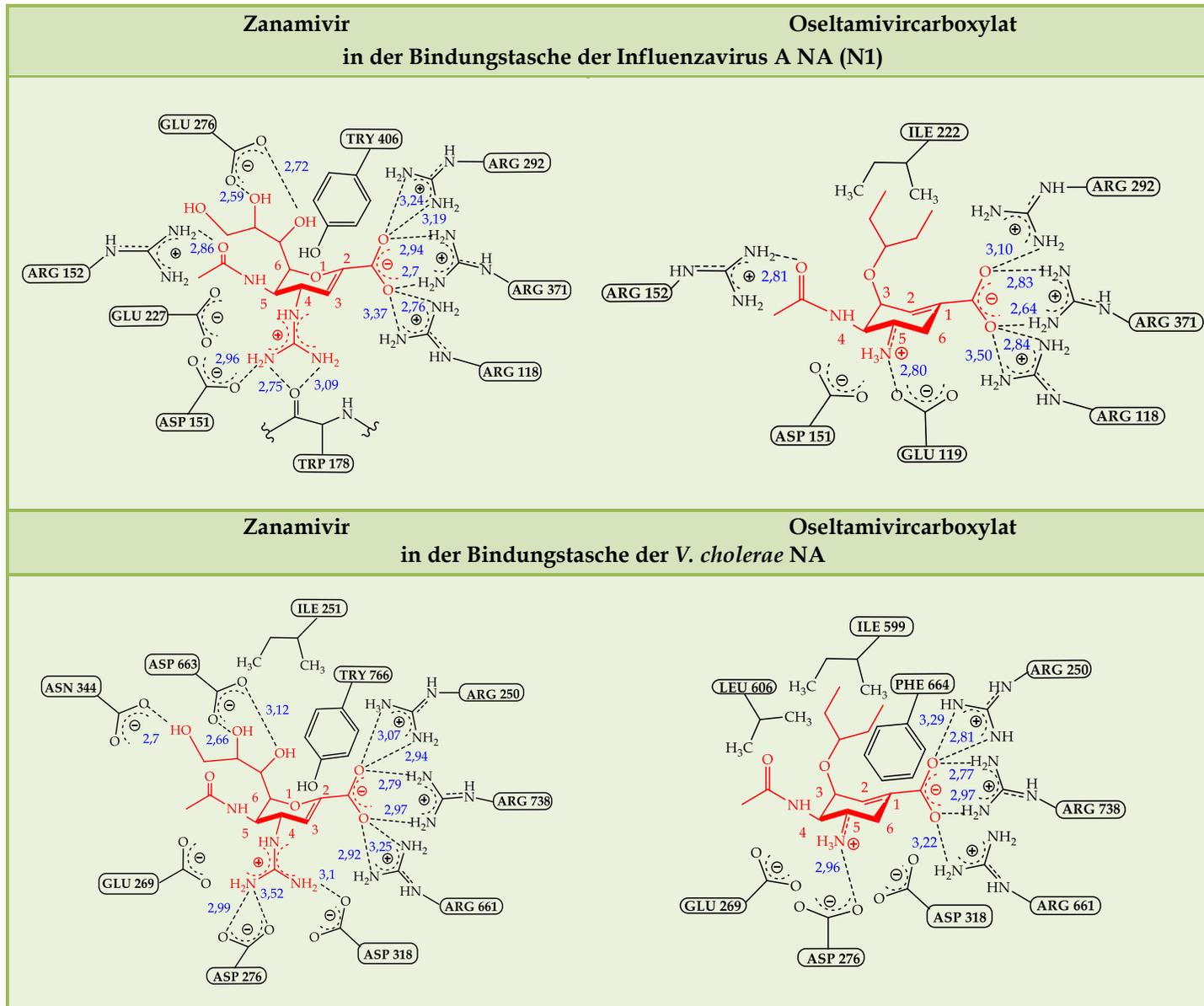


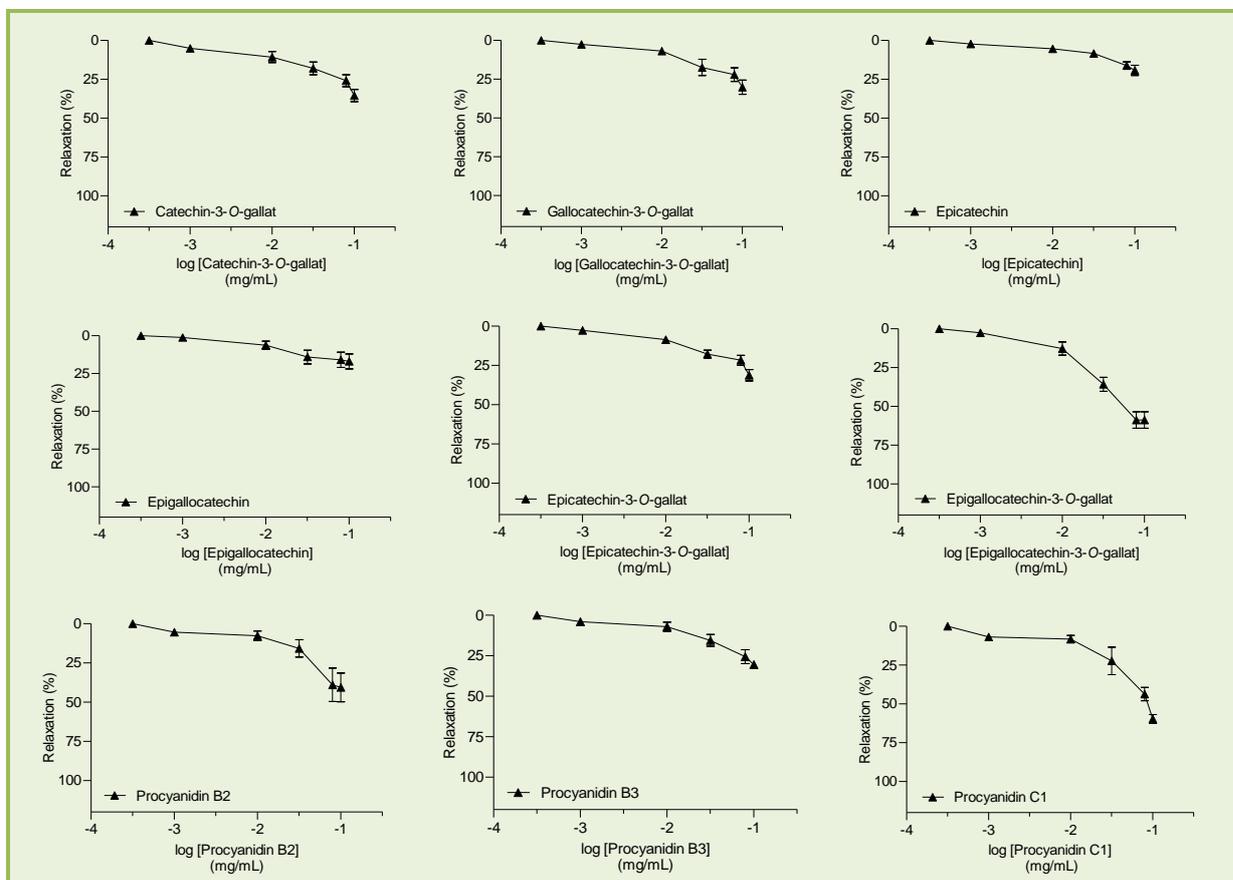
Abb. 19 NA-Inhibitoren in der Bindungstasche der Influenzavirus A NA (N1) und der *V. cholerae* NA
Die Auswertung erfolgte mittels LigandScout

3.4 Experimente an isolierten Schweinekoronararterien (Organbadstudien)

3.4.1 Einfluss flavanoider Testsubstanzen auf vorkontrahierte Koronararterien-segmente

Nachfolgend wurden die Flavan-3-ole Catechin-3-O-gallat, Gallo catechin-3-O-gallat, Epicatechin, Epigallocatechin, Epicatechin-3-O-gallat, Epigallocatechin-3-O-gallat, Procyanidine B2, Procyanidin B2-3-O-gallat, Procyanidin B3 und Procyanidin C1 sowie *Diospyros*-Proanthocyanidine auf ein vasorelaxierendes Potential getestet. Hierzu wurden Koronararterienringe des Schweins mit U46619 vorkontrahiert und durch kumulative Zugabe der Testsubstanz (1-100 mg/mL) relaxiert (vgl. Kapitel 2.9.1.1). Die Strukturformeln der Substanzen sind in Tab. 26 aufgeführt.

Abb. 20 stellt das dilatierende Potential der flavanoiden Testsubstanzen dar. Sowohl die Fraktion aus *D. kaki*, welche Prodelphinidine mit Procyanidin-Anteilen enthält, als auch Procyanidin B2-3-O-gallat bewirkten ein nahezu vollständiges Relaxieren (1-32 mg/mL). Die übrigen Substanzen erwiesen sich über den Konzentrationsbereich (1-100 mg/mL) als ineffektiv oder verübten nur ein marginales Dilatieren und dies auch nur in sehr hohen Konzentrationen. In Anbracht dessen, dass offenbar nur galloylierte Testsubstanzen der Epicatechin-Reihe Ansätze einer Relaxation vermittelten, wurde auf die Testung von Catechin und Gallo catechin verzichtet.



Legende siehe Seite 64

Fortsetzung Seite 63

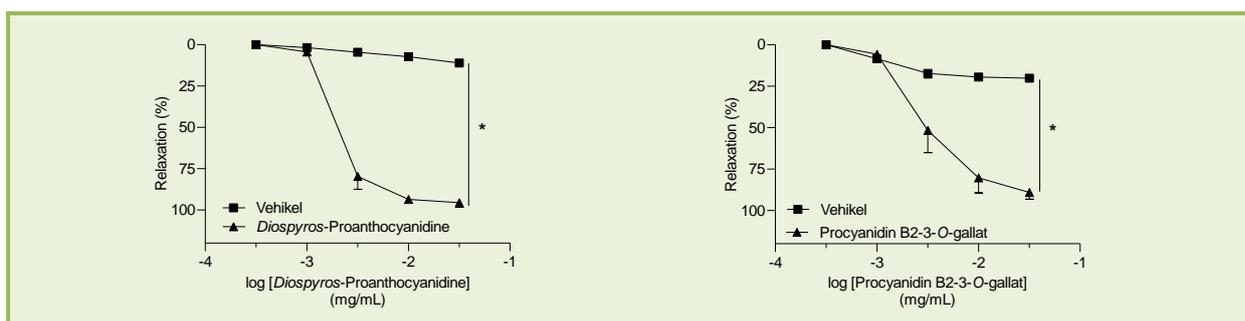


Abb. 20 Vasorelaxierender Effekt der Testsubstanzen

Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3-4$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.2 Dilatierender Effekt der *Diospyros*-Proanthocyanidine und des Procyanidin-B2-3-O-gallats

Abb. 20 und Abb. 21 zeigen das Relaxationsvermögen der *Diospyros*-Proanthocyanidine und des Procyanidin-B2-3-O-gallats infolge der kumulativen Zugabe zu vorkontrahierten Arteriensegmenten (Konzentrationsbereich jeweils 1-32 mg/mL). Beide Substanzen induzierten ein nahezu vollständiges konzentrationsabhängiges Dilatieren. Tab. 21 listet den E_{max} , pEC_{50} und die Anzahl der Tiere (n) auf.

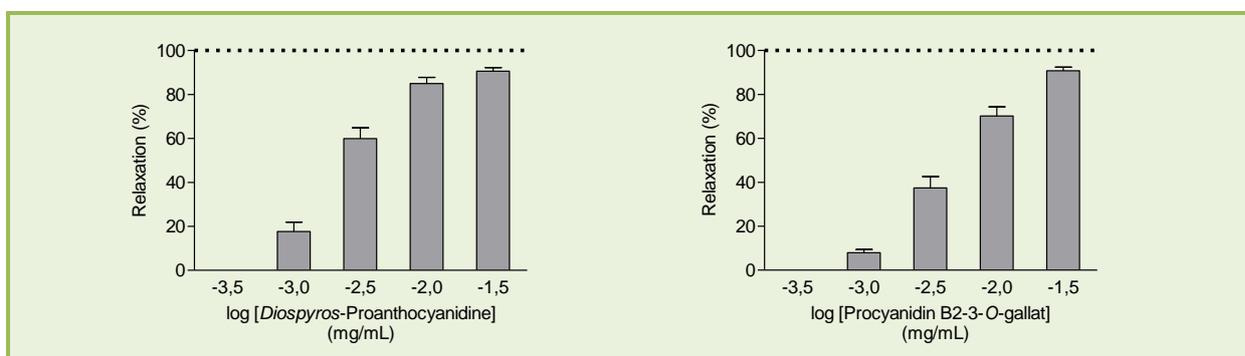


Abb. 21 Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaft der Testsubstanzen

Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=19-38$ Tiere)

Tab. 21 Ermittelte Daten der Testsubstanzen

Testsubstanz	E_{max} (%)	pEC_{50}	Anzahl Tiere (n)
<i>Diospyros</i> -Proanthocyanidine	91 (87-94)	2,6 (2,5-2,7)	38
Procyanidin B2-3-O-gallat	91 (87-94)	2,1 (2,0-2,2)	19

Mittelwerte (95 % Konfidenzintervall)

Zur Überprüfung der Endothelabhängigkeit erfolgten Experimente an Arteriensegmenten mit mechanisch entferntem Endothel. Analog zu den Arterienringen mit intaktem Endothel wurden diese vorkontrahiert und durch kumulative Zugabe der Testsubstanzen relaxiert (jeweils 3-100 mg/mL).

Sowohl das Dilatationsvermögen der *Diospyros*-Proanthocyanidine als auch das des Procyanidin-B2-3-O-gallats wurde in den untersuchten Konzentrationsbereichen annähernd vollständig aufgehoben (Abb. 22).

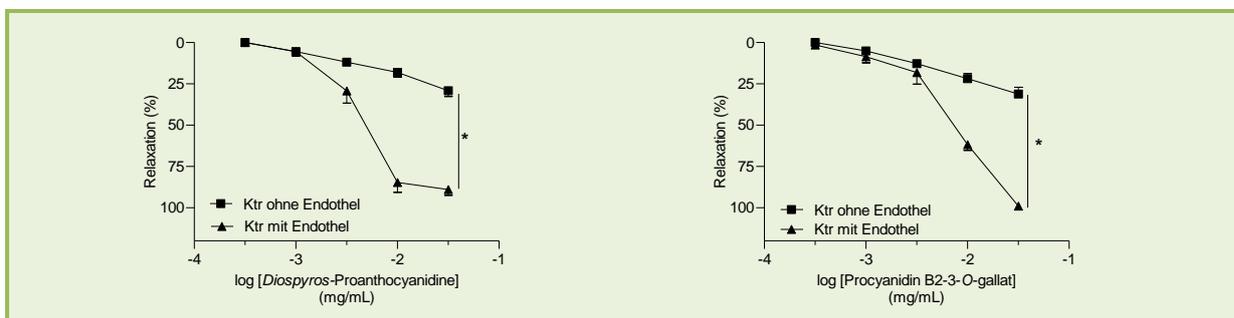


Abb. 22 Relaxierender Effekt der Testsubstanzen an Arterien mit entferntem Endothel
Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n = 3-4$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.3 Charakterisierung der Signalkaskade(n) der endothelabhängigen Relaxation

Zur Charakterisierung der endothelabhängigen Signalkaskade(n) der *Diospyros*-Proanthocyanidin- bzw. der Procyanidin-B2-3-O-gallat-vermittelten Relaxation wurden die Arterienringe 30 min mit Inhibitoren bzw. Mimetika inkubiert, anschließend mit U46619 kontrahiert und mittels der Testsubstanz dilatiert (vgl. Kapitel 2.9.1.1).

3.4.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Schini-Kerth et al. (2010) bewiesen, dass Rotweinpolyphenole an isolierten Koronararterien des Schweins eine Redox-sensitive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs herbeiführen. Die Phosphorylierung der eNOS bewirkt eine erhöhte Bildung von NO und damit das Dilatieren des Gefäßes. Offensichtlich spielen ROS bei der endothelabhängigen Relaxation durch die Aktivierung von Redox-sensitiven Kinasen eine Rolle. Inwieweit eine durch die Testsubstanz induzierte ROS-Generierung als intrazellulärer Stimuli bedeutsam ist, wurde in anschließenden Experimenten überprüft.

3.4.3.1.1 ROS-Scavenger

Um die Einflussnahme von ROS auf das *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelte Relaxationsvermögen festzustellen, wurden Inkubationsversuche in Anwesenheit des unspezifischen ROS-Scavengers *N*-Acetylcystein (NAC) (100 mM) durchgeführt. Wie in Abb. 23 ersichtlich, wurde dieses unter den experimentellen Bedingungen nicht beeinflusst.

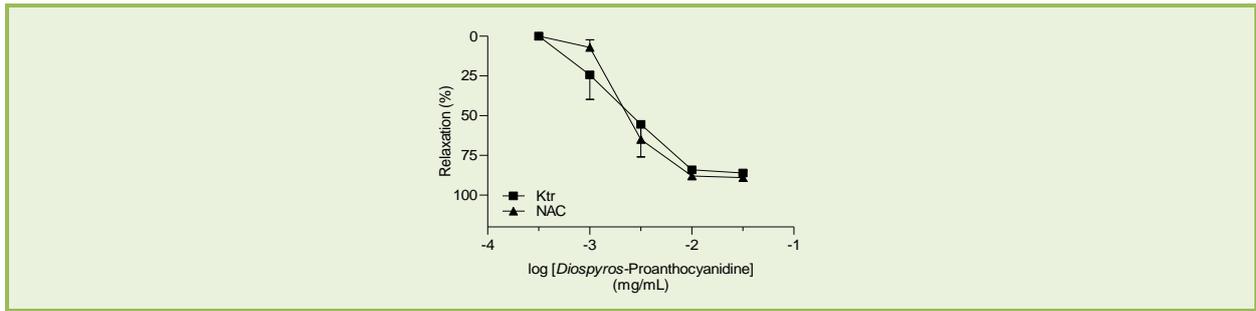


Abb. 23 Beteiligung von ROS an der Diospyros-Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von NAC (100 mM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n= 3-4$ Tiere) t -Test, keine Signifikanz

3.4.3.1.2 Superoxidanion

In Anwesenheit des O_2^- -Scavengers Tiron (10 mM) erfolgte kein Einfluss auf die Testsubstanz-induzierte Vasorelaxation (Abb. 24).

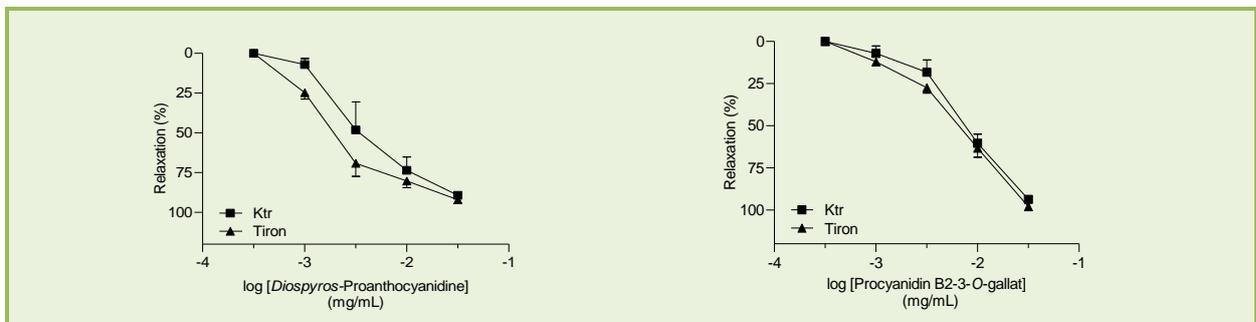


Abb. 24 Beteiligung des O_2^- an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von Tiron (10 mM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n= 3-4$ Tiere) t -Test, keine Signifikanz

3.4.3.1.3 Xanthin- und NADPH-Oxidase

Zur Verifizierung der ROS-Generierung über die Xanthin- und NADPH-Oxidase erfolgte die Inkubation mit einer Kombination aus Allopurinol (10 μ M), einem Xanthinoxidase-Inhibitor und Apocynin (100 μ M), einem NADPH-Oxidase-Inhibitor. Arteriensegmente, die mit einer solchen Kombination inkubiert wurden, zeigten keine veränderte Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 25).

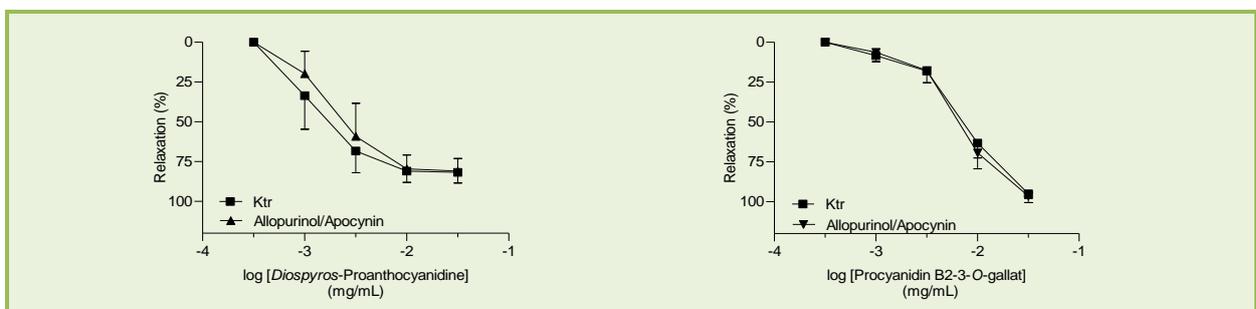


Abb. 25 Beteiligung der Xanthin- und NADPH-Oxidase an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von Allopurinol (10 μ M)/Apocynin (100 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n= 3-4$ Tiere) t -Test, keine Signifikanz

3.4.3.1.4 Mitochondriale Atmungskette

Neben der Xanthin- und NADPH-Oxidase ist die mitochondriale Atmungskette ebenfalls ein ROS-Lieferant (vgl. Kapitel 1.2.2.2.5). Die Inhibition des Komplex 1 der Atmungskette erfolgte durch das zellgängige Rotenon (10 μ M). Während Procyanidin B2-3-O-gallat unter diesen Bedingungen einen reduzierten E_{max} zeigte, war dies für *Diospyros*-Proanthocyanidine nicht zu beobachten (Abb. 26).

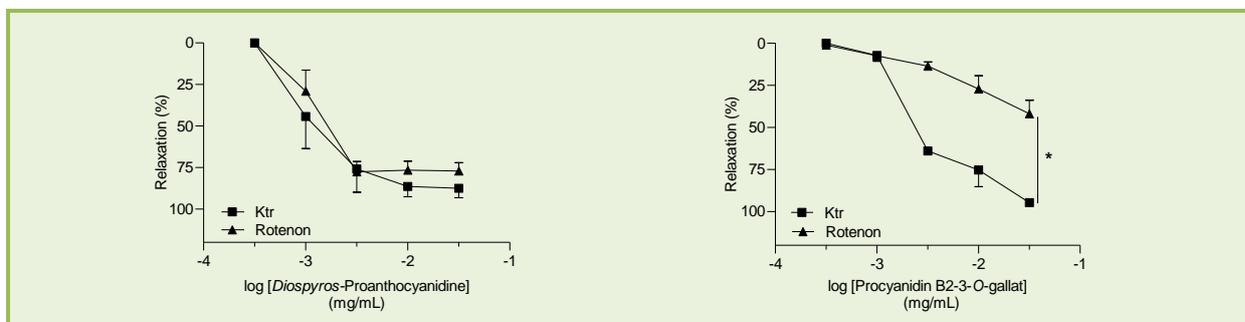


Abb. 26 Beteiligung der Atmungskette an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von Rotenon (10 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3-4$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.3.1.5 Superoxiddismutase

Zur Überprüfung des Einflusses der SOD an der ROS-Produktion wurde das zellgängige Mimetikum MnTMPyP (100 μ M) verwendet. In dessen Anwesenheit erfolgt ein verstärkter Abbau von O_2^- zu H_2O_2 . Im Ergebnis resultierte für beide Testsubstanzen ein verminderter E_{max} (Abb. 27).

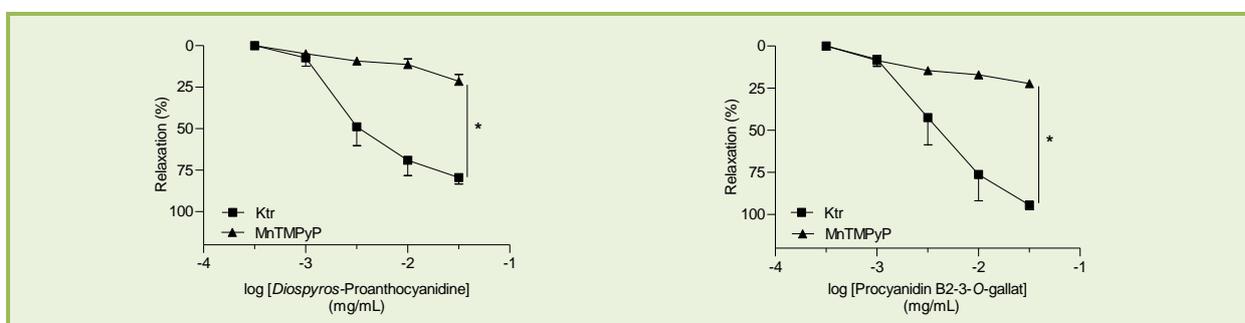


Abb. 27 Beteiligung der SOD an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von MnTMPyP (100 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3-4$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.3.2 Proteinkinasen

Literaturquellen belegen die Beteiligung von Redox-sensitiven Proteinkinasen an der Procyanidin-vermittelten Dilatation (Anselm et al., 2009, Schini-Kerth et al., 2010, Byun et al., 2012).

3.4.3.2.1 Proteinkinase B

Rotweinpolyphenole induzieren über den Redox-sensitiven PI3K/Akt-Signalweg eine Vasorelaxation (Schini-Kerth et al., 2010). Eine Schlüsselrolle kommt dabei der Akt zu. Die Aktivierung dieser

Serin/Threoninkinase (p-Akt) bewirkt nachfolgend die Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung. Durch selektive PI3K/Akt-Blockade wurde diese Signalkaskade inhibiert. Abb. 28 zeigt eine signifikante Hemmung der Testsubstanz-induzierten Relaxation in Gegenwart des PI3K-Inhibitors Wortmannin (30 nM).

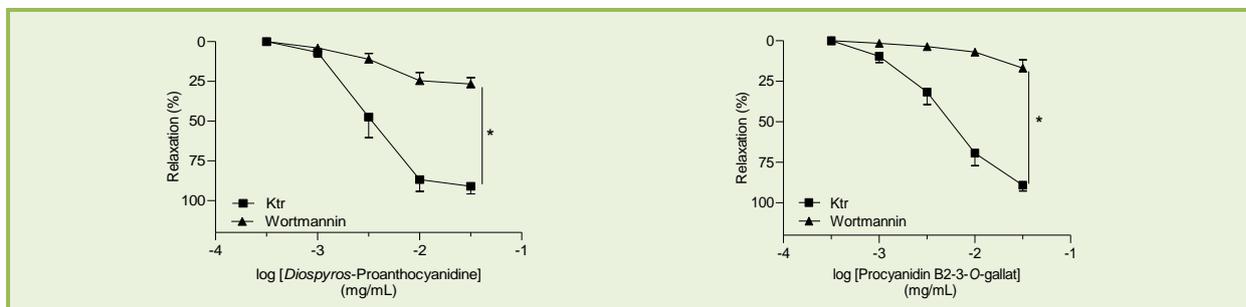


Abb. 28 Beteiligung des PI3/Akt-Signalwegs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von Wortmannin (30 nM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3-6$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.3.2 Mitogen-aktivierende Protein-Kinase

MAPKs sind an der Weiterleitung von extrazellulären Stimuli in das Zellinnere beteiligt. Hierzu gehört unter anderen die p38-MAPK. Studien mit Polyphenolen aus Schwarztee belegen eine p38-MAPK-induzierte Aktivierung der eNOS (Anter et al., 2004, Anter et al., 2005). In Gegenwart des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 (10 μ M) blieb die Konzentrations-Wirkungskurve der *Diospyros*-Proanthocyanidine unbeeinflusst (Abb. 29).

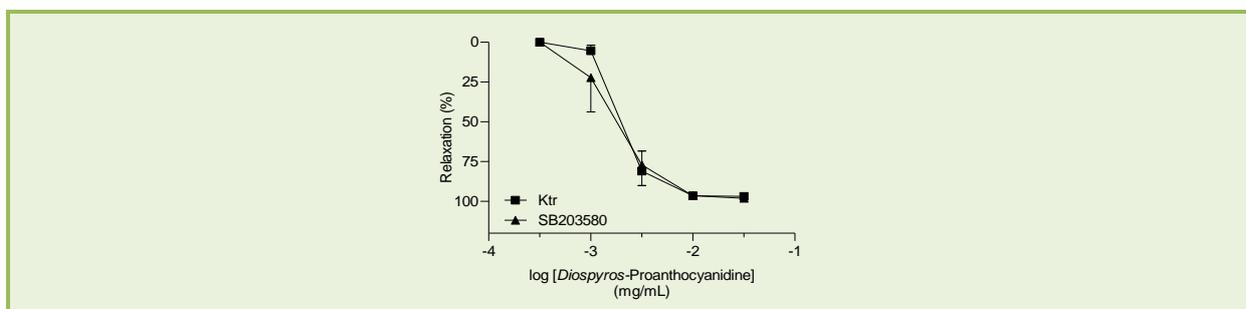


Abb. 29 Beteiligung der MAPK an der *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von SB203580 (10 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=4$ Tiere) t -Test, keine Signifikanz

3.4.3.3 NO/cGMP-Signalweg

Zur Überprüfung der Beteiligung des NO/cGMP-Signalwegs erfolgte die Inkubation zum einen mit dem nicht-selektiven NOS-Inhibitor L-NAME (200 μ M), zum anderen mit dem selektiven Hemmstoff der NO-empfindlichen sGC ODQ (30 μ M). Die Testsubstanz-vermittelte Relaxation wurde nahezu vollständig aufgehoben (Abb. 30).

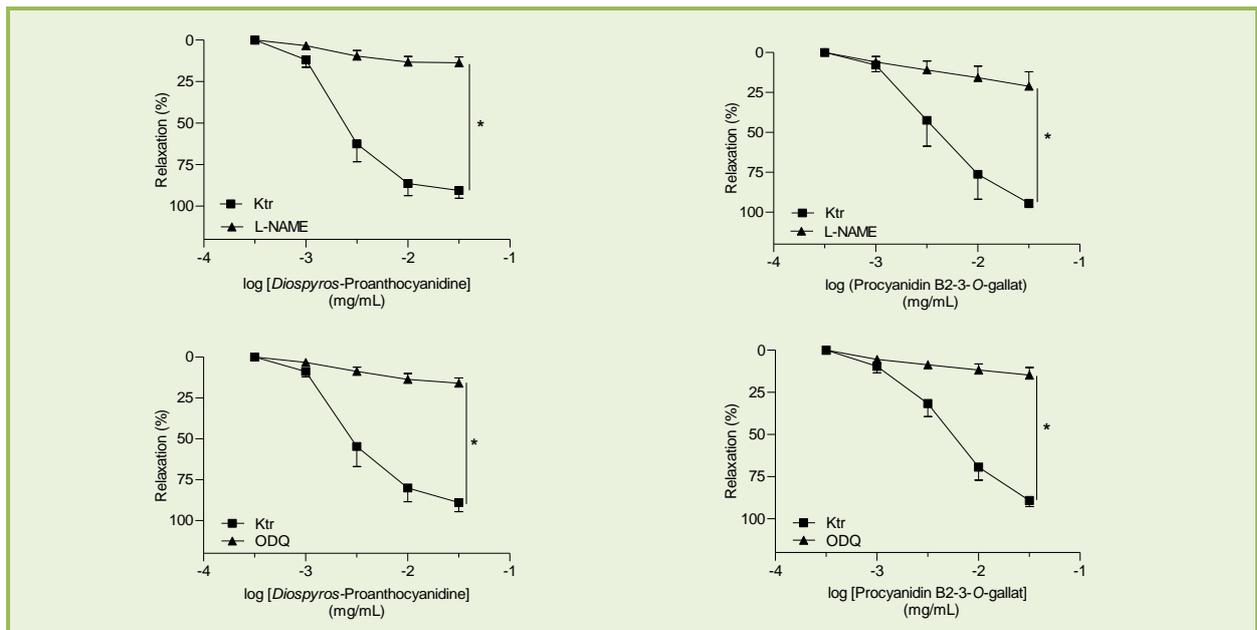


Abb. 30 Beteiligung des NO/cGMP-Signalwegs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von L-NAME (200 μ M) bzw. ODQ (30 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3-6$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.3.4 Phosphodiesterase-3

Der second messenger cAMP stellt einen Botenstoff in der Signalkaskade der glattmuskulären Kontraktion dar und wird über die 3',5'-Cyclonukleotid-Phosphodiesterase (PDE) abgebaut. Eine Inhibition der PDE, so auch vom kardialen Typ 3, durch Flavonoide wurde durch Ko et al. aufgezeigt (Ko et al., 2004). Für die *Diospyros*-Proanthocyanidine war dies auszuschließen, da in Anwesenheit des PDE-3-Inhibitors Milrinon (100 μ M) keine veränderte Konzentrations-Wirkungskurve beobachtet wurde (Abb. 31).

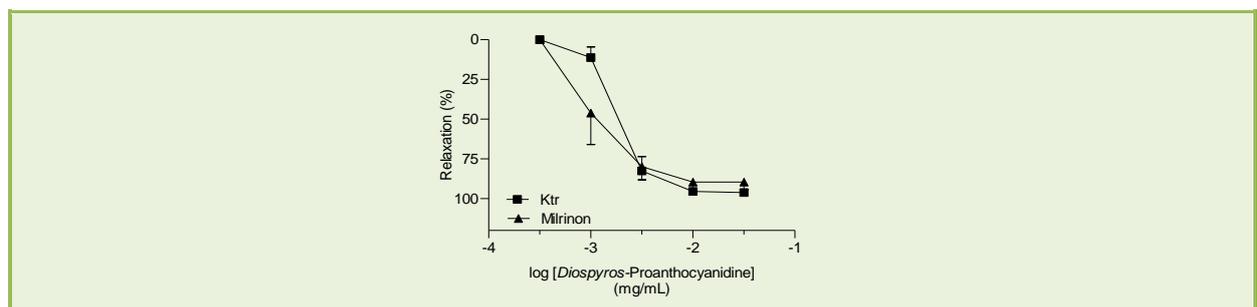


Abb. 31 Beteiligung der PDE an der *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von Milrinon (100 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=4$ Tiere) t -Test, keine Signifikanz

3.4.3.5 Einfluss von K⁺-Kanälen

K⁺-Kanäle kommen in vielen humanen Geweben und Organen vor. Funktionell sind sie unter anderem an der Signaltransduktion, der K⁺-Homöostase, dem Membranpotential sowie der

Osmoregulation beteiligt (Nelson et al., 1990). Bedeutsam für folgende Untersuchungen sind diverse Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle (K_{Ca}) und der spannungsabhängige K^+ -Kanal (K_{V}).

3.4.3.5.1 Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanal

Arteriensegmente, die mithilfe des BK_{Ca} -Inhibitors Tetraethylammoniumchlorid (TEA, 1 mM) inkubiert wurden, zeigten keine Beeinflussung der *Diospyros*-Proanthocyanidin-induzierten Dilatation (Abb. 32).

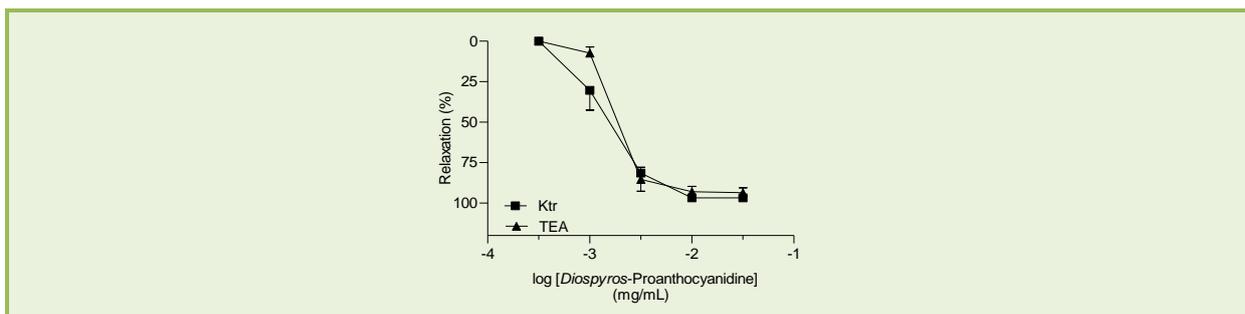


Abb. 32 Beteiligung des BK_{Ca} -Kanals an der *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxation der Testsubstanz in An- und Abwesenheit von TEA (1 mM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3$ Tiere) *t*-Test, keine Signifikanz

3.4.3.5.2 Spannungsaktivierter K^+ -Kanal

Der K_{V} repolarisiert das glattmuskuläre Membranpotential und stellt das Ruhepotential wieder her (Nelson und Quayle, 1995). In Anwesenheit des unspezifischen K_{V} -Inhibitors 4-Aminopyridin (4-AP) (1 mM) erfolgte keine signifikante Beeinflussung des Relaxationsvermögens der *Diospyros*-Proanthocyanidine (Abb. 33).

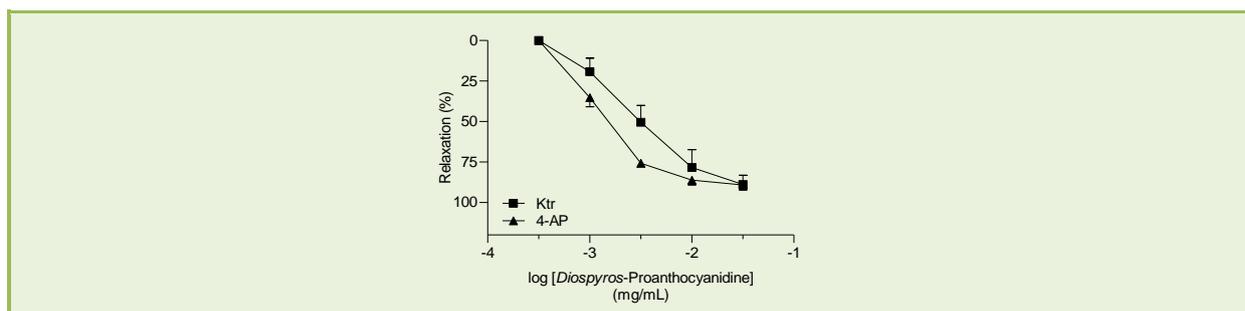


Abb. 33 Beteiligung des K_{V} -Kanals an der *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von 4-AP (1 mM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=4$ Tiere) *t*-Test, keine Signifikanz

3.4.3.5.3 Einfluss der endothelialen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle und der eNOS

Ndiaye et al. (2003) belegten, dass EDHF neben NO ein weiterer wichtiger Mediator der Rotweinpolyphenol-vermittelten Relaxation ist. In Gegenwart der Kombination CTX, einem BK_{Ca} -Kanal-Inhibitor, und Apamin (beide jeweils 100 nM), einem selektiven SK_{Ca} -Kanal-Inhibitor, wurde keine Beeinflussung der Testsubstanz-vermittelten Dilatation beobachtet. Erst in Kombination mit

dem eNOS-Inhibitor L-NAME (200 μM) wurde das Relaxieren drastisch unterdrückt. Dabei entsprach die Konzentrations-Wirkungskurve der von L-NAME allein (Abb. 34).

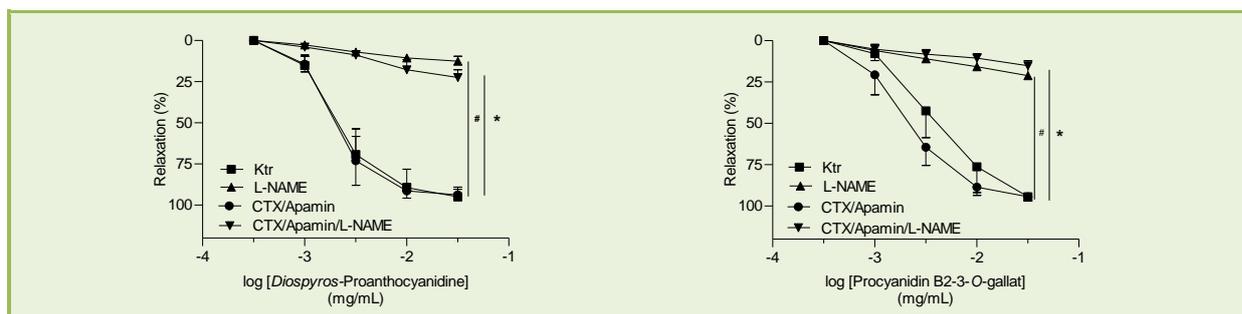


Abb. 34 Beteiligung der K_{Ca} -Kanäle und der eNOS an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von CTX und Apamin (jeweils 100 nM) und L-NAME (200 μM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3-4$ Tiere) one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, * CTX/Apamin/L-NAME, # L-NAME, */# $P < 0,05$

Für eine differenziertere Aussage wurde der Inhibitor CTX gegen den hochselektiven IK_{Ca} -Kanal-Blocker TRAM 34 (1 μM) ausgetauscht. Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurde der Einfluss auf das Relaxationsvermögen der Testsubstanzen sowohl in Kombination als auch für sich allein getestet. Ähnlich bei der Kombination aus CTX und Apamin führte erst der Zusatz von L-NAME (200 μM) zur signifikanten Hemmung der Dilatation (Abb. 35).

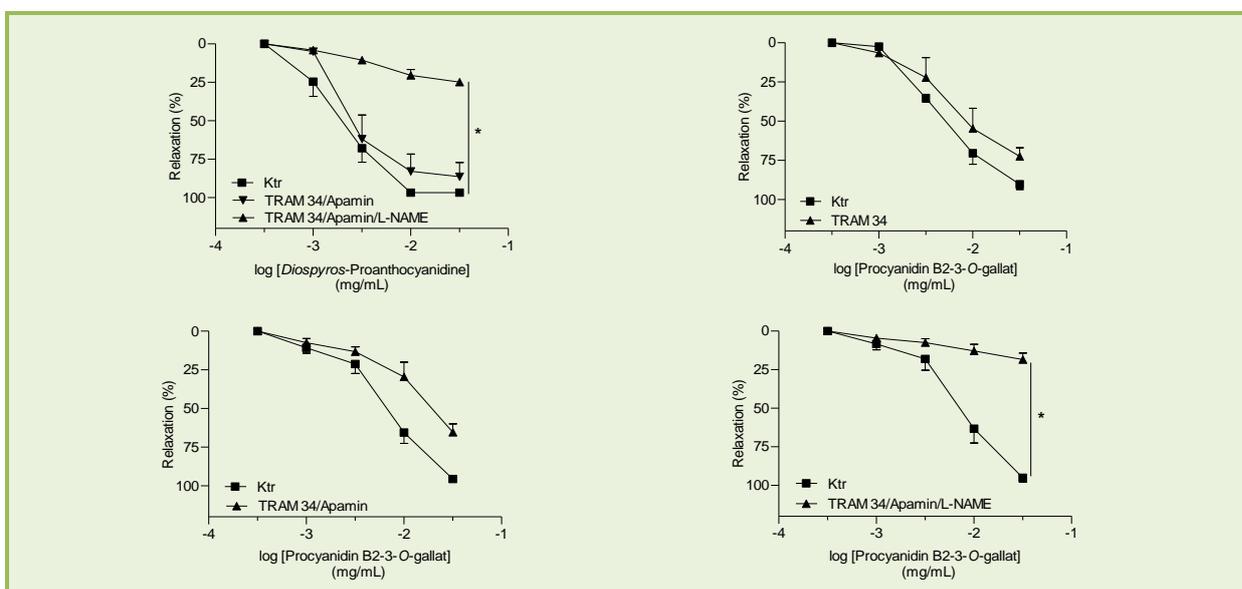


Abb. 35 Beteiligung der K_{Ca} -Kanäle und der eNOS an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von TRAM 34 (1 μM), Apamin (100 nM) und L-NAME (200 μM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3$ Tiere) one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, * $P < 0,05$

3.4.3.6 Gap junctions

Dass gap junctions am Dilatationsgeschehen von Rotweinpolyphenolen eine Rolle spielen demonstrierten Dal-Ros et al. (2009). Diskutiert wurde die Weiterleitung der endothelialen

Hyperpolarisation auf die glatte Muskelzelle. Um deren Beteiligung an der *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelten Dilatation zu überprüfen, wurde der unspezifische gap junction-Inhibitor Carbenoxolon (100 μ M) eingesetzt. Wie aus Abb. 36 ersichtlich trat keine veränderte Konzentrations-Wirkungskurve auf.

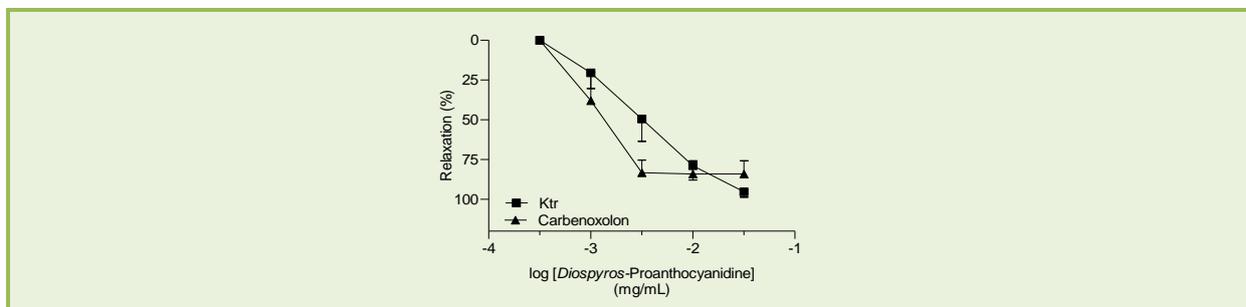


Abb. 36 Beteiligung der gap junctions an der *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von Carbenoxolon (100 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=4$ Tiere) t -Test, keine Signifikanz

3.4.3.7 Na⁺/K⁺-ATPase

Die Na⁺/K⁺-ATPase pumpt Na⁺ aus dem Intrazellularraum und fördert gleichzeitig den Transport von K⁺ in die Zelle. Dies erfolgt entgegen dem jeweiligen Konzentrationsgefälle und sorgt so für die osmotische Balance der Zelle. Um die Beteiligung der Na⁺/K⁺-ATPase am EDHF-vermittelten Geschehen zu überprüfen, wurde der selektive Na⁺/K⁺-ATPase-Blocker Ouabain (50 μ M) verwendet. Unter diesen experimentellen Bedingungen erfolgte eine signifikante Reduktion des E_{max} der Testsubstanzen (Abb. 37).

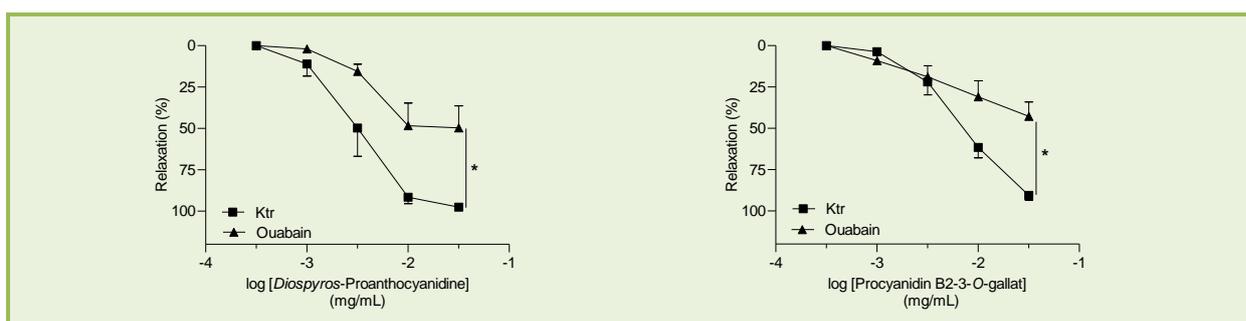


Abb. 37 Beteiligung der Na⁺/K⁺-ATPase an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation
Relaxation in An- und Abwesenheit von Ouabain (50 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=4$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.3.8 Einfluss von Ca²⁺

An der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ sind unter anderem die SERCA, der IP₃-Rezeptor, der RyR, die SOCCs, die VOCCs und der TRPV-Kanal beteiligt. Dass die freie zytosolische Ca²⁺-Konzentration eine wesentliche Rolle bei der Polyphenol-vermittelten Relaxation spielt, zeigten Martin et al. (2002) und Chen et al. (2010). Während endothelial eine erhöhte Konzentration zur Aktivierung der eNOS und

der K_{Ca} -Kanäle wichtig ist, steht die glattmuskuläre Relaxation mit einem erniedrigten Ca^{2+} -Spiegel im Zusammenhang.

3.4.3.8.1 SOCCs und IP_3 -Rezeptor

2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) inhibiert in der Konzentration von 10 μM vorwiegend den IP_3 -Rezeptor und ab ca. 100 μM werden zusätzlich die SOCCs blockiert (Prakriya und Lewis, 2002). In Experimenten mit einer Konzentration von 10 μM zeigten *Diospyros*-Proanthocyanidine kein verändertes Relaxationsvermögen. Bei einer 2-APB-Konzentration von 100 μM wurde ein signifikant verminderter Relaxationseffekt beobachtet (Abb. 38). In einem modifizierten Experiment wurden durch den Zusatz von CTX/Apamin (beide jeweils 100 nM) K_{Ca} -Kanäle blockiert, allerdings ohne erkennbaren Effekt auf den Kurvenverlauf. Anders verhielt es sich in Kombination mit L-NAME (200 μM), hier wurde der dilatatorische Effekt nahezu vollständig aufgehoben (Abb. 38).

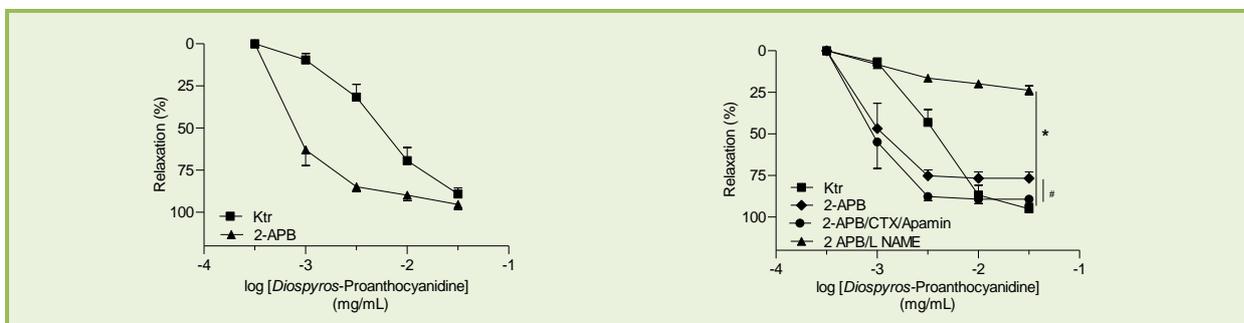


Abb. 38 Beteiligung des IP_3 -Rezeptors und der SOCCs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von links: 2-APB (10 μM), rechts: 2-APB (100 μM), CTX/ Apamin (beide jeweils 100 nM) und L-NAME (200 μM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion (n= 3-4 Tiere) one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, * 2-APB/L-NAME, # 2-APB, */# P < 0,05

3.4.3.8.2 Transient receptor potential vanilloid channel

Human ubiquitär vorkommende TRPVs sind permeable für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Im arteriellen Gefäßsystem trägt die Stimulation der Kanäle zum Dilatieren der glatten Muskelzelle bei (vgl. Kapitel 1.2.2.4.). In Gegenwart des unspezifischen TRPV-Inhibitors Rutheniumrot (10 μM) erfolgte keine Beeinflussung der Procyanidin-B2-3-O-gallat-vermittelten Vasodilatation (Abb. 39).

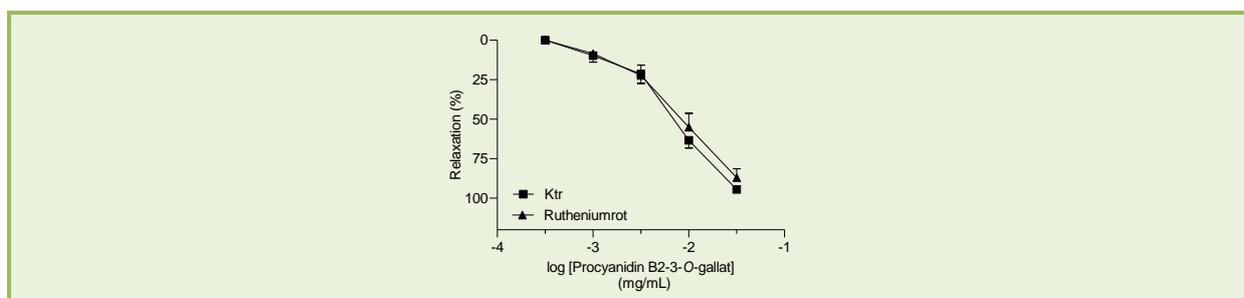


Abb. 39 Beteiligung des TRPV-Kanals an der Procyanidin-B2-3-O-gallat-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von Rutheniumrot (10 μM). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion (n= 4 Tiere) t-Test, keine Signifikanz

3.4.3.8.3 Ca²⁺-Pumpe des sarko-/endoplasmatischen Retikulums und des Ryanodin-Rezeptors

Die Aktivierung des RyRs induziert einen Ca²⁺-Efflux aus dem ER/SR. Zur Auffüllung dieser Ca²⁺-Speicher und zur Wiederherstellung des zellulären Gleichgewichts pumpt die SERCA kontinuierlich Ca²⁺ in diese Kompartimente zurück (vgl. Kapitel 1.2.2.2.4). Während in Gegenwart des RyR-Antagonisten Ryanodin (1 μ M) die Konzentrations-Wirkungskurve der *Diospyros*-Proanthocyanidine nach links verschoben wurde, blieb das Relaxieren der Arterienringe durch die Testsubstanzen in Anwesenheit des selektiven SERCA-Inhibitors Thapsigargin (10 μ M) aus (Abb. 40).

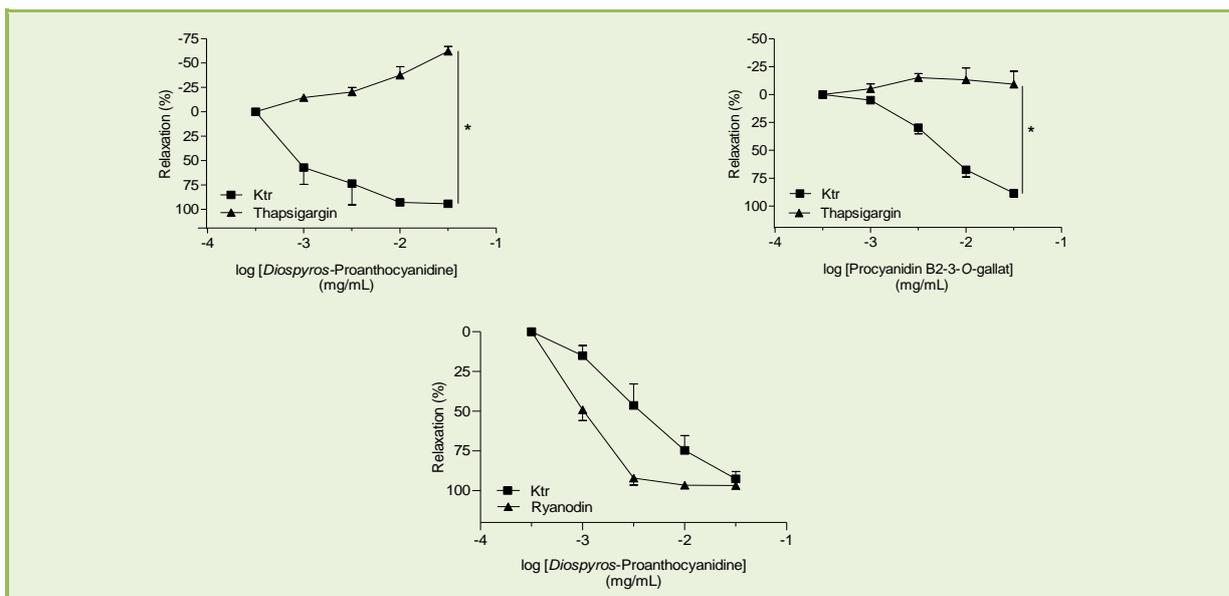


Abb. 40 Beteiligung der SERCA und des RyRs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation

Relaxation in An- und Abwesenheit von Thapsigargin (10 μ M) sowie von Ryanodin (1 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n = 3-4$ Tiere) t -Test, * $P < 0,05$

3.4.3.8.4 Einfluss der L-Typ Ca²⁺-Kanäle

Im Ca²⁺-freien Medium erfolgte die Überprüfung einer Beteiligung von VOCCs an der Vasodilatation. Hierzu erfolgte eine kumulative Zugabe von CaCl₂ (10 μ M–20 mM) an zuvor mit unterschiedlichen *Diospyros*-Proanthocyanidinen (1–50 mg/mL) inkubierten Arteriensegmenten. Im Vergleich zur Ktr wurde keine veränderten Konzentrations-Wirkungskurven wahrgenommen (Abb. 41, Tab. 22).

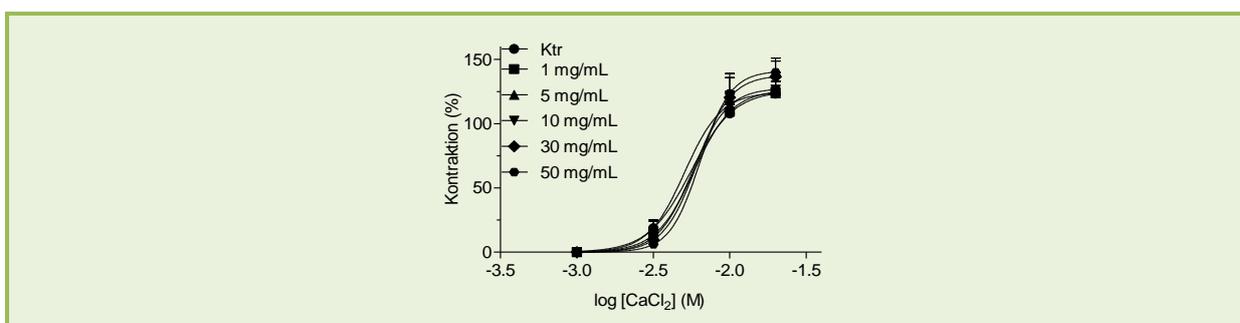


Abb. 41 Kontraktiler Effekt nach der Inkubation mit *Diospyros*-Proanthocyanidinen

Mittelwerte des kontraktiven Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine CaCl₂-induzierte Kontraktion ($n = 4$ Tiere) one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, keine Signifikanz

Tab. 22 Daten verschiedener Konzentrationen an *Diospyros*-Proanthocyanidinen

<i>Diospyros</i> -Proanthocyanidine (mg/mL)	E_{\max} (%)	pEC_{50}	Anzahl Tiere (n)
Ktr	123 (77-170)	1,7 (1,3-2,0)	4
1	125 (97-150)	1,6 (1,4-1,9)	
5	124 (93-154)	1,8 (1,6-2,0)	
10	127 (87-167)	1,7 (1,6-1,7)	
30	136 (100-176)	1,8 (1,3-2,3)	
50	140 (105-175)	1,5 (1,4-1,7)	

Mittelwerte (95 % Konfidenzintervall).

3.4.3.9 Estrogenrezeptor

Chalopin et al. (2010) beschrieben ein Rotweinpolyphenol-induziertes Dilatieren unter Beteiligung des Estrogenrezeptors. Im Gegensatz dazu führte die Anwesenheit des spezifischen Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI 182,780 (10 μ M) zu keinem veränderten Relaxationsvermögen der *Diospyros*-Proanthocyanidine (Abb. 42).

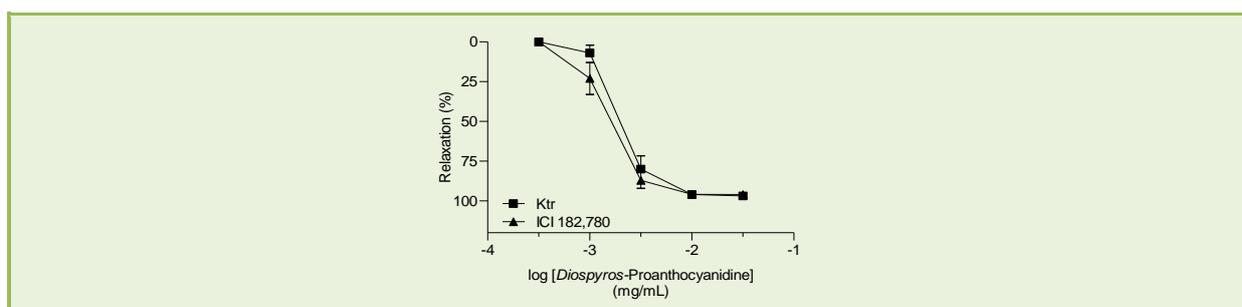


Abb. 42 Beteiligung des Estrogenrezeptors an der *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation

Relaxation der Testsubstanz in An- und Abwesenheit von ICI 182,780 (10 μ M). Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=4$ Tiere) t -test, keine Signifikanz

3.4.4 Dilatierender Effekt der *Diospyros*-Proanthocyanidine an Arterien mit mechanisch entferntem Endothel

Eine Resveratrol-vermittelte, endothelunabhängige Vasodilatation wurde an humanen Brustarterien und Mesenterialarterien von Ratten beschrieben (Novakovic et al., 2006, Gojkovic-Bukarica et al., 2008). Abb. 43 bildet den konzentrationsabhängigen Effekt der *Diospyros*-Proanthocyanidine (3-100 mg/mL) an Arteriensegmenten mit mechanisch entferntem Endothel ab. Tab. 23 listet den E_{\max} , pEC_{50} und die Anzahl der Tiere (n) auf.

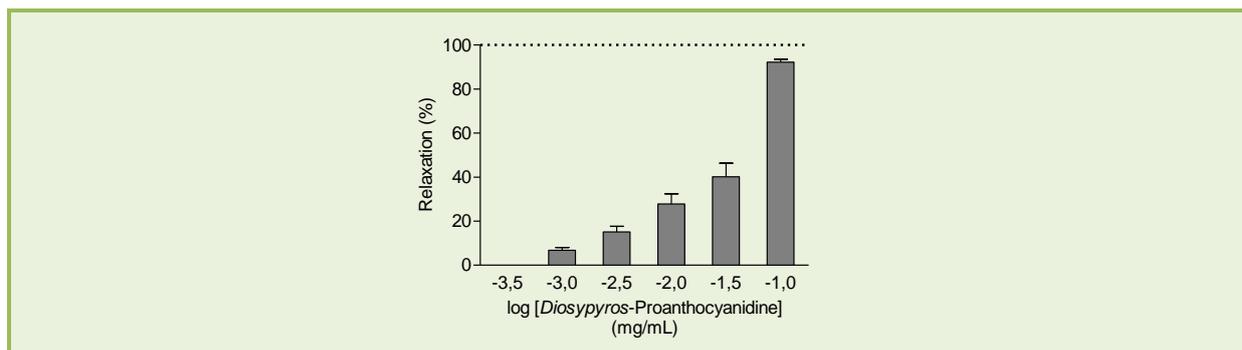


Abb. 43 Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaft der *Diospyros*-Proanthocyanidine an Arterien mit mechanisch entferntem Endothel

Mittelwerte des relaxierenden Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=13$ Tiere)

Tab. 23 Ermittelte Daten von *Diospyros*-Proanthocyanidinen

Testsubstanz	E_{\max} (%)	pEC_{50}	Anzahl Tiere (n)
<i>Diospyros</i> -Proanthocyanidine	91 (89-95)	1,5 (1,4-1,7)	12

Mittelwerte (95 % Konfidenzintervall)

Abb. 44 zeigt die endothelunabhängige Relaxation der *Diospyros*-Proanthocyanidine in Anwesenheit von Inhibitoren bzw. Mimetika. Ableitend ließ sich feststellen, dass keine signifikant veränderten Konzentrations-Wirkungskurven vorlagen.

Tab. 24 Charakterisierung der Signalkaskade(n) der endothelunabhängigen Relaxation

Angriffspunkt Signalkaskade	Inhibitor/Mimetikum (Konzentration)		Konzentrations-Wirkungskurve
ROS	NAC (100 mM)	unspezifischer ROS-Scavenger	keine Beeinflussung
	Tiron (10 mM)	O_2 -Scavenger	
	Rotenon (10 μ M)	Inhibitor Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette	
	MnTMPyP (100 μ M)	Mimetikum SOD	
K_v -Kanal	4-AP (1 mM)	unspezifischer K_v -Inhibitor	
β_2 -Adrenorezeptor	Salbutamol (10 μ M)	selektives β_2 -Sympathomimetikum	
gap junctions	Carbenoxolon (10 μ M)	gap junction-Inhibitor	

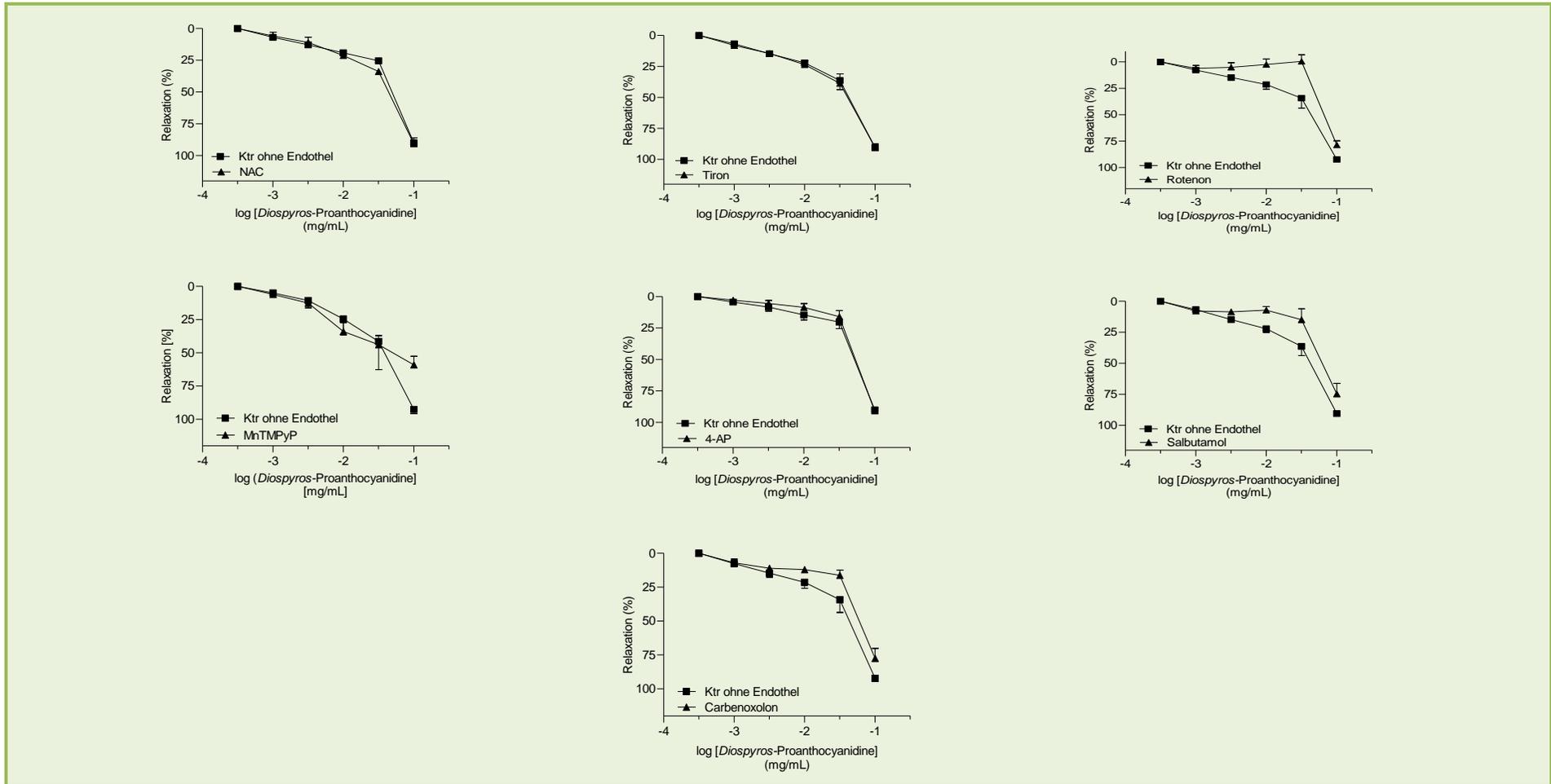


Abb. 44 Endothelunabhängige *Diospyros*-Proanthocyanidin-vermittelte Relaxation in An- und Abwesenheit von Inhibitoren bzw. Mimetika
Mittelwerte des relaxierenden Effektes ± S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion, oben links nach rechts: NAC (100 mM), Tiron (10 mM), Rotenon (10 μM), mittig links nach rechts: MnTMPyP (100 μM), 4-AP (1 mM), Salbutamol (10 μM), unten: Carbenoxolon (10 μM) ($n= 3-4$ Tiere) *t*-Test, keine Signifikanz

3.4.5 Einfluss proanthocyanidinhaltiger Substanzen auf Lipopolysaccharid-behandelte Arteriensegmente

Vaskulär zirkulierendes LPS induziert unter anderem eine endotheliale iNOS-Expression. Die massive, posttranslationale NO-Produktion führt zu einem verstärkten Dilatieren der Vaskulatur, einem Pooling im venösen Gefäßsystem, bis hin zu einem starken Blutdruckabfall. Durch die gesteigerte Generierung von freien Radikalen treten Schäden an Zellmembranen, membranständigen Rezeptoren und Ionenkanälen auf (vgl. Kapitel 1.2.2.3).

Der nachfolgende genutzte LPS-Inkubationsassay diente als Sepsis-Modell. So wurden Arterienringe ca. 16 Stunden mit 1 µg/mL LPS inkubiert und anschließend kumulativ mit U46619 (0,3 nM-0,3 µM) kontrahiert. Im Vergleich zur unbehandelten Ktr zeigten diese ein vermindertes Kontrahieren. Folglich besteht eine negative Korrelation zwischen Kontraktilität und NO-Produktion infolge einer LPS-induzierten iNOS-Expression. Zur Verhinderung bzw. Verminderung der posttranskriptionalen NO-Produktion erfolgte die Ko-Inkubation mit proanthocyanidinhaltigen Extrakten/Fractionen sowie polyphenolischen Reinsubstanzen. In Ergänzung dazu erfolgte nach der letzten U46619-Zugabe die Überprüfung der Endothelfunktion. Der Zusatz von Substanz P (10 mM) induzierte eine endothelabhängige Vasorelaxation, welche bei dysfunktionalem Endothel vermindert war (vgl. Kapitel 2.9.1.3).

3.4.5.1 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit dem Lipopolysaccharid und proanthocyanidinhaltigen Substanzen

Inkubation mit LPS

Nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS wurde der Einfluss auf die Kontraktilität gegenüber der unbehandelten Ktr überprüft. Im Vergleich zur Ktr (E_{\max} : 117 %) wurde eine signifikante Reduktion des kontraktilen Effekts (E_{\max} : 91 %) beobachtet (Abb. 45).

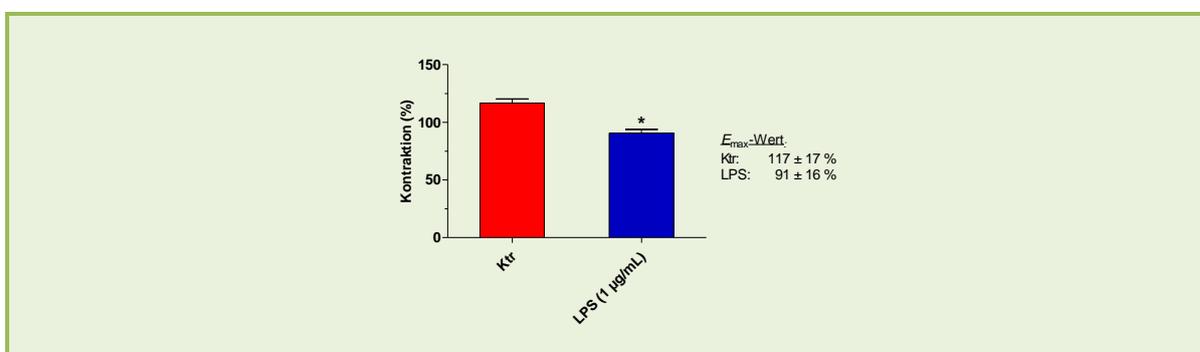


Abb. 45 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS

Mittelwerte des E_{\max} ± S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n = 23$ Tiere) nach Welch-modifizierter t -Test, * $P < 0,05$

Inkubation mit LPS und 1400W

Gegenüber den LPS-behandelten Arteriensegmenten (E_{\max} -Wert 91 %) erfolgte eine signifikante Steigerung der Kontraktilität durch Ko-Inkubation mit dem selektiven iNOS-Inhibitor 1400W (10 μM \pm 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E_{\max} : 107 %) (Abb. 46).

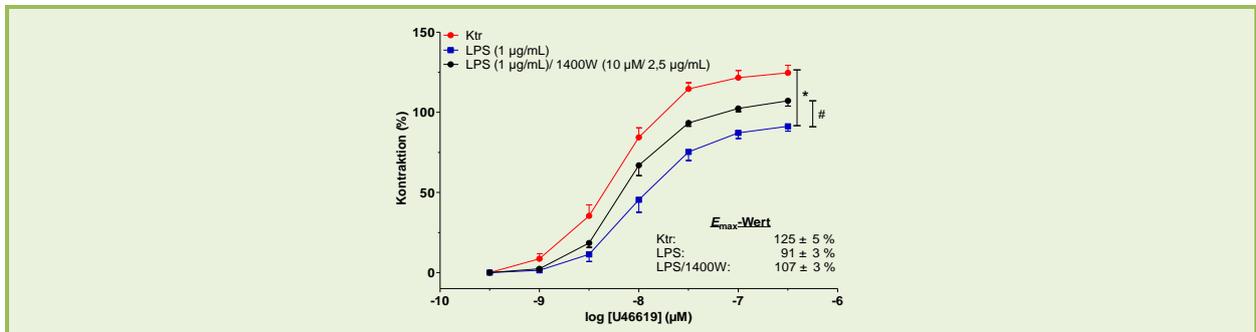


Abb. 46 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und 1400W

Mittelwerte des kontraktiven Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=10$ Tiere) * /# signifikant zur Ktr/LPS-inkubierten Arteriensegmenten, one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, * /# $P < 0,05$

Inkubation mit LPS und EPs® 7630

Die Inkubation mit einer Kombination aus LPS und verschiedenen Konzentrationen an EPs® 7630 (E_{\max} : 3 mg/mL: 86 %; 10 mg/mL: 83 %; 30 mg/mL: 70 %) beeinflusste die durch LPS verminderte Kontraktion (E_{\max} : 90 %) nicht. Die Inkubation mit EPs® 7630 allein (3-30 mg/mL) zeigte differierende maximale kontraktile Effekte. Während für 3 mg/mL und 30 mg/mL (E_{\max} : 91 % und 87 %) reduzierte E_{\max} -Werte beobachtet wurden, entsprach der Effekt von 10 mg/mL (E_{\max} : 116 %) der Ktr (E_{\max} : 121 %).

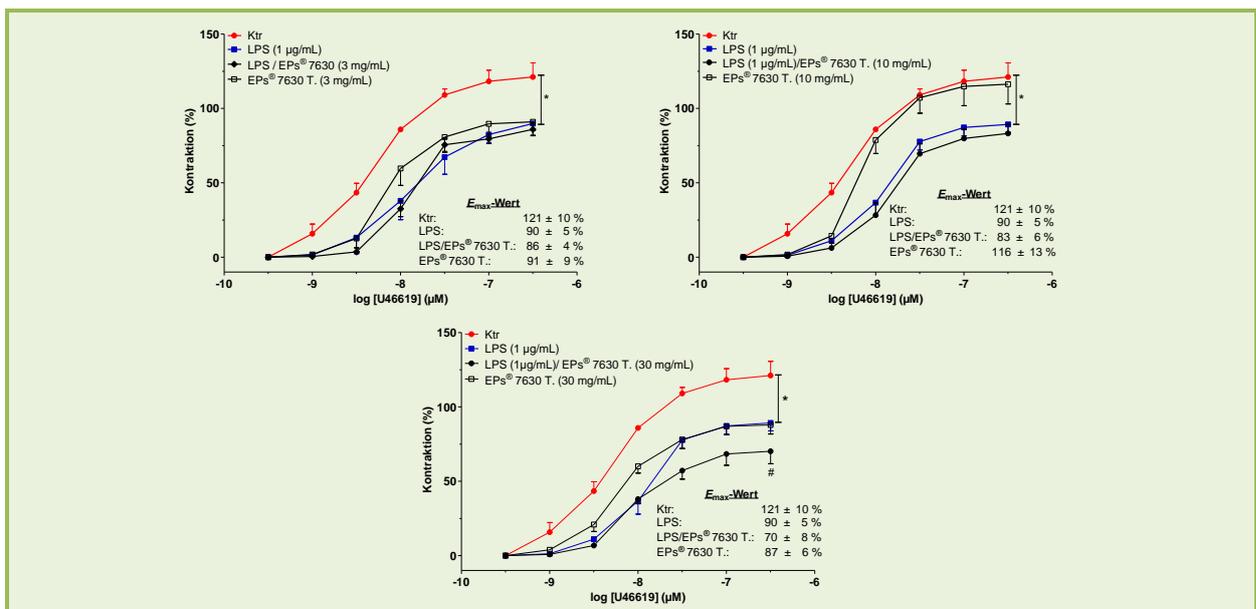


Abb. 47 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und EPs® 7630

Mittelwerte des kontraktiven Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=4$ Tiere) * signifikant zur Ktr, one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, * $P < 0,05$

Inkubation mit LPS und 2,3-*cis*-Nelia-Procyanidinen bzw. 2,3-*trans*-Salix-Procyanidinen

Weder die Kombination von LPS mit 2,3-*cis*-Nelia- (E_{\max} : 96 %) noch mit 2,3-*trans*-Salix-Procyanidinen (E_{\max} : 99 %) beeinflusste die LPS-induzierte Reduktion des E_{\max} -Wertes (E_{\max} : 93 %). Im Vergleich zur Ktr (E_{\max} : 114 %) zeigte die Einzelinkubation sowohl mit 2,3-*cis*-Nelia- (E_{\max} : 103 %) als auch mit 2,3-*trans*-Salix-Procyanidinen (E_{\max} : 115 %) keine signifikant veränderte Kontraktilität (Abb. 48).

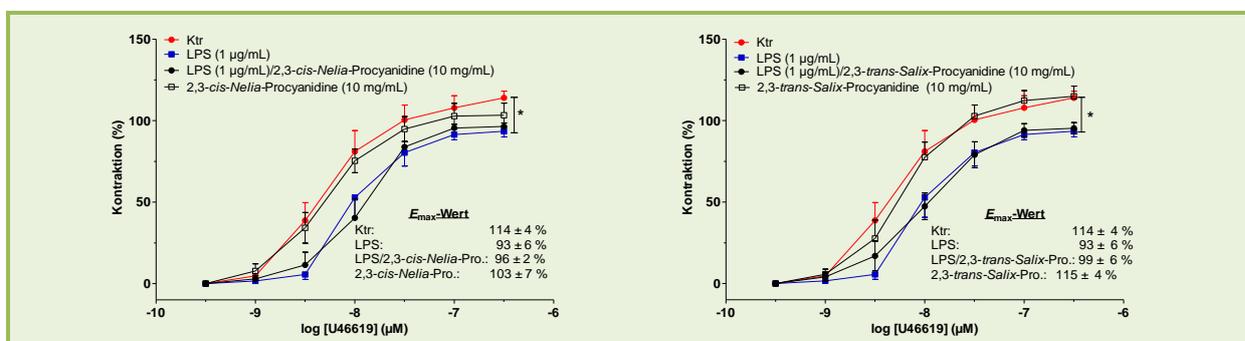


Abb. 48 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und 2,3-*cis*-Nelia- bzw. 2,3-*trans*-Salix-Procyanidinen

Mittelwerte des kontraktiven Effektes ± S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n = 7-8$ Tiere) * signifikant zur Ktr, one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, * $P < 0,05$

Inkubation mit LPS und Diospyros-Proanthocyanidinen bzw. mit einer EPs® 7630-Fraktion

Die Ko-Inkubation von LPS mit *Diospyros*-Proanthocyanidinen (E_{\max} : 79 %) bzw. der EPs® 7630-Fraktion (E_{\max} : 83 %) zeigte keine Beeinflussung der LPS-induzierten Depression der Kontraktilität (E_{\max} : 76 %). Verglichen zur Ktr (E_{\max} : 103 %) wurde für die alleinige Inkubation mit *Diospyros*-Proanthocyanidinen (E_{\max} : 114 %) bzw. der EPs® 7630-Fraktion (E_{\max} : 115 %) kein Einfluss auf das Ausmaß der Kontraktion beobachtet (Abb. 49).

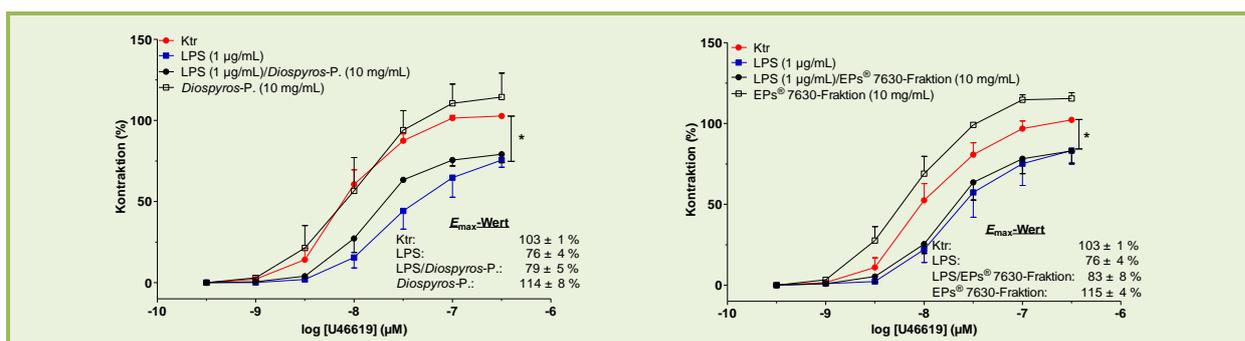


Abb. 49 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und *Diospyros*-Proanthocyanidinen bzw. der EPs® 7630-Fraktion

Mittelwerte des kontraktiven Effektes ± S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n = 4$ Tiere) * signifikant zur Ktr, one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, * $P < 0,05$

Inkubation mit LPS und Piceatannol

Im Vergleich zur Ktr (E_{\max} : 98 %) erfolgte durch die Inkubation mit LPS eine Reduktion des maximalen kontraktiven Effektes (E_{\max} : 79 %). In Kombination mit Piceatannol (10 μM \cong 2,4 μg/mL) wurde der Ausgangswert (E_{\max} : 99 %) wiederhergestellt (Abb. 50).

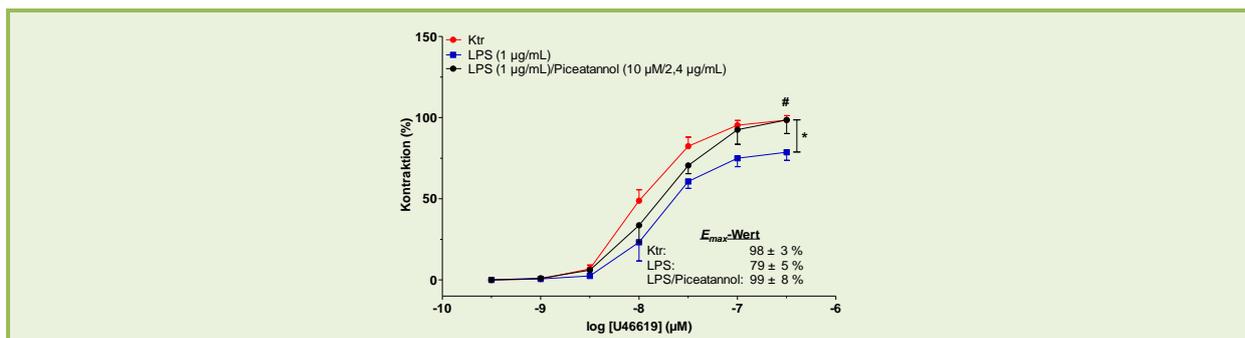


Abb. 50 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und Piceatannol

Mittelwerte des kontraktiven Effektes \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine U46619-induzierte Kontraktion ($n=3$ Tiere) */# signifikant verschieden zur Ktr/LPS-inkubierten Arteriensegmenten, one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, */# $P < 0,05$

3.4.5.2 Funktionalität des Endothels nach der Inkubation mit dem Lipopolysaccharid und den proanthocyanidinhaltigen Testsubstanzen

Zur Überprüfung der Funktionalität des Endothels nach der ca. 16-stündigen Inkubation mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder einer Kombination aus LPS und den Testsubstanzen erfolgte die Zugabe von Substanz P (10 nM). Tab. 25 und Abb. 51 fasst die Ergebnisse zusammen. Im Vergleich zur Ktr wiesen alle Arteriensegmente, die mit LPS, LPS und proanthocyanidinhaltiger Testsubstanz oder mit der Testsubstanz allein inkubiert wurden, ein signifikant vermindertes Relaxieren auf. Arteriensegmente die lediglich mit 2,3-*trans*-Salix-Procyanidinen, EPs[®] 7630 (10/30 mg/mL), der EPs[®] 7630-Fraktion (10 mg/mL), Diospyros-Proanthocyanidinen (10 mg/mL) sowie deren Kombination mit LPS zeigten ein vermindertes relaxieren als Segmente die mit LPS allein inkubiert wurden.

Tab. 25 Relaxationsvermögen nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und proanthocyanidinhaltigen Testsubstanzen

Inkubation		Relaxation (%)				
Ktr	-	89 ± 2	82 ± 3	85 ± 4	80 ± 4	75 ± 2
LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	47 ± 8	29 ± 8	41 ± 8	49 ± 9	65 ± 1
LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	EPs [®] 7630 (3 mg/mL)	33 ± 18	-	-	-	-
	EPs [®] 7630 (10 mg/mL)	-	$8,4 \pm 2,1$	-	-	-
	EPs [®] 7630 (30 mg/mL)	-	$2,0 \pm 1,2$	-	-	-
	2,3- <i>cis</i> -Nelia-P. (10 mg/mL)	-	-	42 ± 12	-	-
	2,3- <i>trans</i> -Salix-P. (10 mg/mL)	-	-	-	12 ± 1	-
	Diospyros-P. (10 mg/mL)	-	-	-	-	$6,2 \pm 4,6$
	EPs [®] 7630 Fraktion (10 mg/mL)	-	-	-	-	19 ± 10
-	EPs [®] 7630 (3 mg/mL)	32 ± 6	-	-	-	-
	EPs [®] 7630 (10 mg/mL)	-	23 ± 12	-	-	-
	EPs [®] 7630 (30 mg/mL)	-	$1,5 \pm 1,5$	-	-	-
	2,3- <i>cis</i> -Nelia-P. (10 mg/mL)	-	-	60 ± 8	-	-
	2,3- <i>trans</i> -Salix-P. (10 mg/mL)	-	-	-	22 ± 4	-
	Diospyros-P. (10 mg/mL)	-	-	-	-	$9,4 \pm 2,9$
	EPs [®] 7630 Fraktion (10 mg/mL)	-	-	-	-	39 ± 11

Mittelwerte der Relaxation der inkubierten Arteriensegmente \pm S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine Substanz P-induzierte Relaxation ($n=4-6$ Tiere)

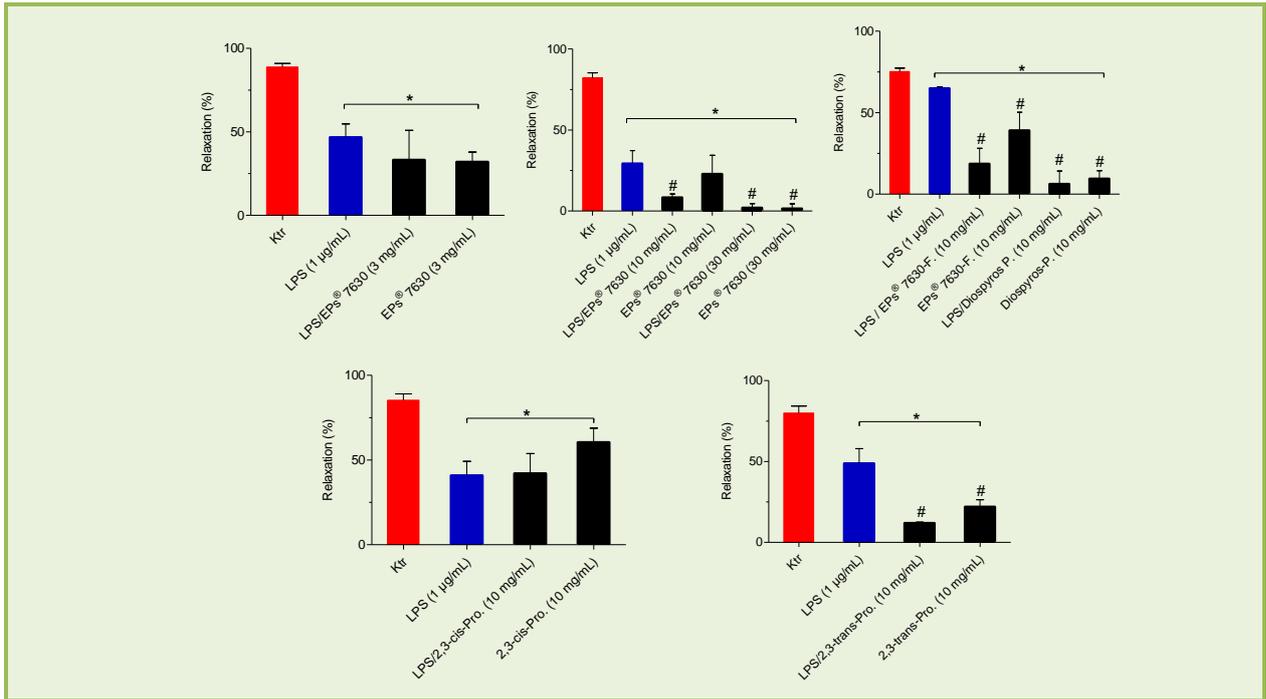


Abb. 51 Relaxationsvermögen nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und proanthocyanidinhaltigen Testsubstanzen

Mittelwerte der Relaxation ± S.E.M. in Prozent (%) bezogen auf eine Substanz P-induzierte Relaxation ($n= 4-6$ Tiere) */# signifikant zur Ktr/LPS-inkubierten Arteriensegmenten, one-way-ANOVA mit Bonferroni post hoc Analyse, */# $P > 0,05$

Diskussion

4 Diskussion

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der biologischen Aktivität von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen in Bezug auf das NA-inhibierende, vasodilatierende und vasoprotektive Potential. In der Tat scheint ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und mikrobiellen Infekten zu bestehen (Madjid et al., 2003, Corrales Medina et al., 2015). So wurde ein vermehrtes Auftreten von entzündlichen vaskulären Prozessen, endothelialer Dysfunktion, glatter Muskelzellproliferation und arteriosklerotischer Plaques während eines Infekts dokumentiert (Naghavi et al., 2003). Es besteht ein 2-8-fach gesteigertes Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen innerhalb der ersten 30 Tage nach einer Atemwegserkrankung (Corrales Medina et al., 2010). *In vivo*- und *in vitro*-Studien mit Procyanidinen und Flavan-3-olen bestätigen einen therapeutischen Effekt bei Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems und mikrobiellen Infekten (De Bruyne et al., 1999, Landete, 2012). Im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen wurde Anfang der 90er Jahre der Begriff „French Paradox“ geprägt. Hintergrund war die Beobachtung, dass Franzosen im Gegensatz zu anderen europäischen Nationen trotz fettreicher Nahrung ein vermindertes kardiovaskuläres Risiko aufwiesen (Renaud und De Lorgeril, 1992). Epidemiologische und klinische Studien brachten dies in Zusammenhang mit dem regelmäßigen Konsum von Rotwein und den darin enthaltenen Polyphenolen (Artaud Wild et al., 1993, Cook und Samman, 1996, Goldberg et al., 2001). Hinsichtlich der antiinfektiven Eigenschaften belegen Arbeiten den gesundheitsfördernden Effekt von polyphenolhaltigen Phytopharmaka bei Infektionen mit Influenzaviren (Droebner et al., 2007, Theisen und Muller, 2012). In den erwähnten Studien wurden zumeist wenig definierte, polyphenolhaltige Extrakte verwendet. Folglich sind Aussagen zum Einfluss des Polymerisationsgrades, des Substitutions- oder Hydroxylierungsmusters, der Stereochemie sowie der Verknüpfungsart der Flavanylbausteine auf die biologische Aktivität eher spärlich dokumentiert. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Fokus auf hochreine, strukturell differierende, proanthocyanidinhaltige Fraktionen und auf Flavan-3-ole gelegt. Mithilfe eines breitgefächerten Spektrums an Methoden wie dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay, bioinformatischer Techniken und Organbadstudien wurden die NA-inhibierenden, vasodilatierenden und vasoprotektiven Eigenschaften der Testsubstanzen untersucht. Bei den verwendeten Fraktionen handelte es sich um dimere bis hexamere Procyanidine. Während die oligomeren Procyanidine aus *Salix* spp. überwiegend aus [4 α ,8]-verknüpften Catechin-Einheiten aufgebaut sind, bestehen die Procyanidine aus *N. meyeri* und *Cephalophyllum* spp. vorwiegend aus [4 β ,8]-verknüpften Epicatechin-Bausteinen (Kolodziej, 1984, 1990). Die dimeren bis oligomeren Procyanidine aus *Betula* spp. und *Potentilla erecta* sind Gemische aus Catechin- und Epicatechin-Grundbausteinen (Schleep et al., 1986, Kolodziej, 1989). Die Fraktion aus *Rhus leptodictya* besteht überwiegend aus [4 α ,6]- und [4 α ,8]-verknüpften Fisetinidol- und Catechin-Einheiten und einem kleinen Anteil an [4 β ,8]-Fisetinidol- und Epicatechin-Bausteinen. Das chemische Merkmal dieser Profisetinidine ist die 5-Desoxyeinheit (Viviers et al., 1983). Die

Proanthocyanidine aus *D. kaki* enthalten einen hohen Anteil an Epigallocatechin-Einheiten (Li et al., 2010). Der industriell gefertigte Extrakt EPs® 7630 wird aus *Pelargonium sidoides* gewonnen und ist ein Gemisch aus Prodelphinidinen, Procyanidinen, und weiteren Inhaltsstoffen. Ergänzend dazu wurde eine EPs®-7630 Fraktion verwendet, die aus überwiegend dimeren Prodelphinidinen besteht (Kayser und Kolodziej, 1995, Schötz und Nöldner, 2007). In Ergänzung zu den Extrakten/Fractionen wurden folgende Reinsubstanzen verwendet: Procyanidin B2 (Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin), Procyanidin B2-3-O-gallat (Epicatechin-3-O-gallat-[4 β -8]-Epicatechin), Procyanidin B3 (Catechin-[4 α -8]-Catechin) und Procyanidin C1 (Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin). Aus der Reihe der Flavan-3-ole fanden Catechin, Gallocatechin, Catechin-3-O-gallat, Gallocatechin-3-O-gallat sowie deren Epimere Anwendung. Die verwendeten Substanzen sowie deren Strukturformeln sind in Tab. 1 und Tab. 26 aufgeführt.

4.1 Antigrippales Potential polyphenolischer Substanzen

Die Influenza ist eine Atemwegserkrankung, die durch Viren aus der Familie der Orthomyxoviridae hervorgerufen wird. Zu dieser Familie gehören unter anderem die Influenzaviren der Typen A, B und C, die sich hinsichtlich ihrer Membranproteine unterscheiden (vgl. Kapitel 1.2.1.1) (Julkunen et al., 2000). Hohe Infektionsraten treten vor allem bei Kindern unter 2 Jahren, Erwachsenen über 65 Jahren und Personengruppen mit geschwächtem Immunsystem auf. Zur Behandlung werden bevorzugt die NA-Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivircarboxylat empfohlen (World Health Organization, 2015). Beide genießen ein hohes Ansehen, wobei sich die Kritik an der Wirksamkeit mehrt. Zudem berichten Forscher über zunehmende Resistenzentwicklungen (vgl. Kapitel 1.2.1.2). Aus diesem Grund ist es ein Bedürfnis, nach neuen, effektiven Arzneistoffen zu forschen. Die Stoffgruppe der Polyphenole bietet aufgrund ihrer chemisch sehr heterogenen und vielzähligen Vertreter ein breitgefächertes Spektrum an aussichtsreichen Kandidaten. So fasst Hudson (2009) zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Studien zusammen, in denen polyphenolreiche Extrakte aus grünem Tee, aus Granatäpfeln und aus diversen Pflanzenfamilien wie z.B. Geraniaceae, Cistaceae und Asteraceae verwendet wurden. Im Gegensatz zu diesen chemisch wenig analysierten Extrakten fanden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen mit hochreinen, strukturell definierten proanthocyanidinhaltigen Fraktionen/Extrakten (2,3-*cis*-*Nelia*-Procyanidine, 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine, *Cephalophyllum*-Procyanidine, *Potentilla*-Procyanidine, *Betula*-Procyanidine, *Diospyros*-Proanthocyanidine, *Rhus*-Profisetinidine, prodelphinidinhaltiger EPs® 7630) statt. Die Testung von Vertretern aus der Stoffgruppe der Flavan-3-ole, Ellagitannine und Benzoessäurederivate unterstützten die angestrebte Erstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen. Ziel war es, Aussagen über den Einfluss des Polymerisationsgrades, des Substitutions- und Hydroxylierungsmusters, der 2,3-Stereochemie sowie der Interflavan-ylverknüpfung zu treffen.

4.1.1 Beurteilung des Testsystems

Die bisherige Literatur beschränkt sich vornehmlich auf den Vergleich verschiedener *in vitro*-Methoden zur Bestimmung der NA-hemmenden Aktivität (Barnett et al., 2000, Wetherall et al., 2003). Ein häufig nicht berücksichtigter, aber wesentlicher Parameter ist die Herkunft des Enzyms. Obwohl die Aktivitätsmessung gegenüber der viralen NA praxisnäher und aussagekräftiger ist, erfolgt die Suche nach potenten NA-Inhibitoren in der Regel aus Kostengründen mit bakteriellen NAs. Es war daher von Interesse, inwieweit die Verwendung einer bakteriellen bzw. viralen NA Einfluss auf die Messdaten nimmt. Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wurde der etablierte MuNANA-Fluoreszenz-Assay verwendet (Abb. 10) (Potier et al., 1979).

Vor dem Screening polyphenolischer Testsubstanzen auf ein NA-inhibierendes Potential erfolgte zunächst die Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer im Testsystem. Als Modellsubstanz diente Zanamivir, welches 2, 5 oder 11 min mit dem Enzym inkubiert wurde. Aufgrund der nicht signifikant differierenden IC_{50} -Werte wurde für die nachfolgenden Experimente die Zeitspanne von 2 min festgelegt. Weiterhin belegen die Ergebnisse die Umsetzung des Substrates MuNANA sowohl durch die bakterielle als auch die virale NA (vgl. Kapitel 3.1.2). Interessanterweise lassen die Daten aus dem Screening differierende inhibitorische Aktivitäten gegenüber beiden NAs erkennen (Tab. 12). So inhibierten die NA-Referenzsubstanzen Zanamivir und Oseltamivircarboxylat die *V. cholerae* NA im mikromolaren Konzentrationsbereich, die Influenzavirus A NA (N1) hingegen im nanomolaren Bereich. Beide Größenordnungen stehen im Einklang mit den bisherigen Literaturdaten und bestätigen die Validität des Testsystems (Wetherall et al., 2003, Liu et al., 2008, Janecki, 2012). Schlussfolgernd sind sowohl die *V. cholerae* als auch die Influenzavirus A NA (N1) im MuNANA-Fluoreszenz-Assay verwendbar. Die Übertragung von Messdaten und das Ziehen von Rückschlüssen aus dem bakteriellen Testsystem auf das virale Modell und umkehrt sollte nur mit Vorsicht erfolgen (Grienke et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Wirkstärke von polyphenolischen Testsubstanzen gegenüber beiden NAs im gleichen Testsystem ermittelt und anschließend miteinander verglichen werden. Zukünftig sollte unter Berücksichtigung des Forschungsziels und der klinischen Relevanz der Ergebnisse eine Anpassung des Testsystems im Hinblick auf die Herkunft des Enzyms erfolgen.

4.1.2 Inhibition der *V. cholerae* Neuraminidase

Eine vorangegangene Inhibitionsstudie im Arbeitskreis von Prof. Kolodziej belegte die NA-hemmende Aktivität des EPs® 7630, von hochreinen Proanthocyanidinen und ihren biogenetischen Vorstufen: den Flavan-3-olen. Anhand der Messdaten wurde ein Zusammenhang zwischen der Hemmwirkung und dem Polymerisationsgrad, dem Hydroxlierungs- sowie Substitutionsmuster der Testsubstanzen beobachtet (Janecki, 2012). Zur unterstützenden sowie eingehenderen Analyse dieser Ergebnisse erfolgte die Auswahl der für diese Arbeit relevanten Substanzen. So wurden neben den

Proanthocyanidinfraktionen aus *Betula* spp., *Salix* spp., *N. meyeri*, *D. kaki*, *Cephalophyllum* spp. und *Rhus leptodictya* sowie dem EPs® 7630, Reinsubstanzen aus den Stoffklassen der Flavan-3-ole, den Ellagitanninen und den Benzoessäurederivaten gegenüber der *V. cholerae* NA getestet (Tab. 1, Tab. 26).

Einfluss der Galloylierung

Interessanterweise inhibierten galloylierte Substanzen die bakterielle NA stärker oder zumindest mit ähnlicher Potenz wie die Positivkontrollen Zanamivir und Oseltamivircarboxylat (IC_{50} -Wert: 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 41 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 52 \mu\text{M}$ und 144 μM) (Tab. 12). Beispielhaft sei der ausgeprägte Hemmeffekt der *Diospyros*-Proanthocyanidine genannt, die einen Galloylierungsgrad von ca. 60 % aufweisen (IC_{50} -Wert: 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Auch (Gallo)Catechin-3-*O*-gallat sowie deren 3-Epimere zeigten eine nennenswerte Potenz (IC_{50} -Wert: 29-93 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 25$ -244 μM). Im Gegensatz dazu hemmten die ungalloylierten Flavan-3-ole wie (Epi)Catechin und Gallo(epi)catechin deutlich schwächer (IC_{50} -Wert: 595-670 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 1953$ -2186 μM). Offenbar hat die 3-*O*-Galloylierung am C-Ring einen maßgeblichen Anteil am hemmenden Effekt. Auch Janecki beobachtete für 3-*O*-galloylierte Flavan-3-ole eine effizientere Hemmung der *V. cholerae* NA als für ungalloylierte Vertreter (Janecki, 2012). Möglicherweise geht von den Hydroxysubstituenten des Gallussäurerests durch die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zur bakteriellen Bindungsdomäne ein stabilisierender Effekt aus.

In der Reihe der Ellagitannine zeigten die unacylierten Substanzen wie Granatin A und Casuariin (IC_{50} -Wert: 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 185 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 135 \mu\text{M}$ und 236 μM) sowie die monogalloylierten Vertreter wie Vescalagin, Carpinusin und Geraniin (IC_{50} -Wert: 73-236 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 124$ -185 μM) einen geringeren Hemmeffekt als Terchebin mit einer 1,3,6-Tri-*O*-Galloylierung (IC_{50} -Wert: 29 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 31 \mu\text{M}$) (Tab. 12). Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen der steigenden Anzahl an Gallussäureresten und dem Hemmpotential. Einen ähnlichen Rückschluss zogen Toda et al. im Rahmen von Untersuchungen zum α -glucosidasehemmenden Potential von Ellagitanninen (Toda et al., 2000). Der Vergleich der *in vitro*-Daten von Terchebin und Paeonianin C legt die Vermutung nahe, dass die 1-*O*-Galloylierung des Terchebins (IC_{50} -Wert: 25 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 15 \mu\text{M}$) die Bindungsdomäne besser ausfüllt als der voluminöse 1-Penta-*O*-galloylglucosylrest des Paeonianin C (IC_{50} -Wert: 25 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 31 \mu\text{M}$) (Tab. 12). Zudem scheint die Galloylierung für weitere biologische Aktivitäten, wie z.B. die antibakteriellen Eigenschaften, bedeutsam zu sein (Hattori et al., 1990, De Bruyne et al., 1999). Im Hinblick auf das Strukturmerkmal des (D)HHDP-Esters scheinen weder die Anwesenheit noch die Position einen signifikanten Einfluss auf die inhibitorische Aktivität gegenüber der *V. cholerae* NA zu nehmen. Möglicherweise passt der flexiblere Gallussäurerest besser in das aktive Zentrum als die rigide (D)HHDP-Gruppe.

Einfluss des Polymerisationsgrades

Janecki beobachtete, dass insbesondere Proanthocyanidine mit einer Mindestkettenlänge von drei Untereinheiten die *V. cholerae* NA inhibierten (Janecki, 2012). Ähnliches lässt sich anhand der Daten der dimeren bis hexameren Proanthocyanidine aus den Fraktionen von *Betula* spp., *Salix* spp.,

N. meyeri, *D. kaki*, *Cephalophyllum* spp. und *Potentilla erecta* (IC_{50} -Werte: 0,5-13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) feststellen. Dem Anschein nach geht der raumgreifende Proanthocyanidin-Grundkörper einen stabilisierenden Effekt mit der Bindungstasche ein oder verspermt den Zugang des Substrates MuNANA zum aktiven Zentrum. Nakahara et al. (1993) postulierten im Zuge von Experimenten zur Glycosyltransferase-Aktivität gleichfalls ein Zusammenhang zwischen dem Hemmeffekt und dem Polymerisationsgrad von Grüntee-Polyphenolen.

Einfluss der Stereochemie

Ableitend aus den ermittelten IC_{50} -Werten war erkennbar, dass alle Procyanidine mit homogenen 2,3-*cis*-Einheiten (z.B. *N. meyeri*, *Cephalophyllum* spp.; IC_{50} -Werte: 3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 6,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sowie 2,3-*trans*-Verknüpfungen (*Salix* spp.; IC_{50} -Werte: 4,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) das bakterielle Enzym effektiver inhibierten als Procyanidine mit unterschiedlich konfigurierten Bausteinen (*Potentilla erecta* und *Betula* spp.; IC_{50} -Werte: 9,2-13 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Kein signifikanter Unterschied war zwischen [4 β ,8]-verknüpften Epicatechin-Bausteinen (Fraktionen aus *N. meyeri*, *Cephalophyllum* spp.) und [4 α ,8]-verknüpften Catechin-Einheiten (Fraktion aus *Salix* spp.) zu beobachten. Da lediglich Fraktionen mit [4,8]-Verknüpfungen untersucht wurden, sollte in weiterführenden Experimenten der Aspekt der [4,8]- bzw. [4,6]-Interflavanylverknüpfung betrachtet werden. Interessanterweise wiesen 2,3-*cis*-*Nelia*-Procyanidine ein stärkeres Hemmpotential als 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine auf (Tab. 12). Rückschließend scheint die 2,3-*cis*-Stereochemie der Substituenten des Benzopyran-Grundkörpers einen positiven Einfluss auf die Wirkstärke zu nehmen. Ein Wirkunterschied zwischen *cis/trans*-Isomeren gegenüber einer NA wurde gleichfalls für das Stilben ϵ -Viniferin dokumentiert (Yuk et al., 2013).

Einfluss des Hydroxylierungsmusters

Neben der Galloylierung, dem Polymerisationsgrad und der Stereochemie scheint weiterhin das Hydroxylierungsmuster am Flavan-3-ol-Grundkörper einen Einfluss auf die inhibitorische Potenz zu nehmen. So führt die Pyrogallolteilstruktur der Prodelphinidine (*Diospyros*-Proanthocyanidine, EPs® 7630; IC_{50} -Wert: 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) im Vergleich zu den Procyanidinen mit *ortho*-ständigen Hydroxygruppen am B-Ring (Fraktionen aus *N. meyeri*, *Salix* spp., *Cephalophyllum* spp., *Potentilla erecta*, *Betula* spp.; IC_{50} -Wert: 3,2-13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zu einer Aktivitätssteigerung. Demzufolge steigt mit der Zahl der Hydroxysubstituenten am B-Ring das Hemmpotential. Unterstützend dazu dokumentierten Yuk et al. einen Zusammenhang zwischen der Zunahme an Hydroxygruppen und dem NA-inhibierenden Effekt für eine Reihe von Resveratrol-Derivaten (Yuk et al., 2013)

Neben dem B-Ring kommt offenbar auch der Hydroxylierung am C-5 des Benzopyran-Grundkörpers ein aktivitätssteigernder Effekt zu. Im Vergleich zu den 5-hydroxylierten Procyanidinen wie den 2,3-*cis*-*Nelia*-Procyanidinen (IC_{50} -Wert: 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) führt die 5-Desoxy-Einheit (A-Ring) der Profisetinidine (Fraktion aus *Rhus leptodictya*, IC_{50} -Wert: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zu einer verminderten Wirkung. Ein Bezug zwischen der Anzahl an Hydroxygruppen und der biologischen Aktivität findet sich

vielfach in der Literatur. So erhöht sich die antiparasitäre Wirkung von Flavonoiden mit zunehmender Zahl an Hydroxysubstituenten (Tasdemir et al., 2006).

Der Einfluss des Hydroxylierungsmusters spiegelt sich zudem in der Testreihe der Benzoesäure-derivate wider. Während die 2,6-Dihydroxybenzoesäure (IC_{50} -Wert: 821 μ M) ein moderates Hemmpotential aufwies, zeigten die Shikimisäure und die Gallussäure keine Aktivität (IC_{50} -Wert $\geq 100 \mu$ M \cong 5000 μ g/mL). Anscheinend führt die gesteigerte Azidität der 2,6-Dihydroxybenzoesäure infolge der intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxyfunktion und den *meta*-ständigen Hydroxygruppen zur Wechselwirkung mit basischen Aminosäureresten aus der Bindungstasche. Vergleichbar dazu wurde für die Carboxygruppe des Substrates Neu-5-Ac gleichfalls eine Wasserstoffbrücke zu Argininresten des aktiven Zentrums der bakteriellen NA beobachtet (Moustafa et al., 2004).

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 3-O-Galloylierung, der Kondensationsgrad, das Hydroxylierungsmuster und die 2,3-Stereochemie Einfluss auf den Hemmeffekt gegenüber der *V. cholerae* NA nehmen. Erstmals wurde für Vertreter der Ellagitannine ein Zusammenhang zwischen Zahl und Position der Galloyleinheiten und der inhibitorischen Aktivität belegt. Rückschließen aus den IC_{50} -Werten zeigten die Proanthocyanidine (2,3-*cis*-*Nelia*-Procyanidine, 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine, *Cephalophyllum*-Procyanidine, *Potentilla*-Procyanidine, *Betula*-Procyanidine, *Rhus*-Profisetinidine, *Diospyros*-Proanthocyanidine, prodelphinidinhaltiger EPs® 7630), die galloylierten Flavan-3-ole ([Gallo]Catechin-3-O-gallat sowie deren Epimere) und die Ellagitannine Terchebin und Paeonianin C ein ausgeprägtes Hemmpotential (IC_{50} -Werte: 0,5-25 μ g/mL). Die aufgeführten *in vitro*-Daten lassen eine therapeutische Relevanz erkennen, sodass weiterführende präklinische Studien in Betracht gezogen werden sollten. Ein denkbarer Einsatz wäre die Verhinderung bakterieller Sekundärinfektionen mit *S. pneumoniae* nach einem primären Virusinfekt. Demzufolge ist die Testung gegenüber einer pneumokokkalen NA empfehlenswert. 2,6-Dihydroxybenzoesäure und die Ellagitannine Casuariin, Vescalagin, Geraniin, Granatin A und Carpinusin wiesen eine moderate Aktivität auf (IC_{50} -Werte: 124-185 μ g/mL = 158-236 μ M). Aufgrund des schwachen Hemmpotentials der ungalloylierten Flavan-3-ole ([Gallo]Catechin sowie deren Epimere) und den Benzoesäurederivate Shikimisäure und Gallussäure, sind diese von geringer therapeutischer Relevanz (IC_{50} -Werte: 595 bis $\geq 1000 \mu$ g/mL = 2050 bis $\geq 5000 \mu$ M).

4.1.3 Inhibition der *V. cholerae* Neuraminidase durch Wirkstoffkombinationen

Wirkstoffkombinationen erfassen in der Regel mehrere krankheitsbestimmende Zielstrukturen. Dabei zeigen synergistisch wirkende Kombinationen eine gesteigerte therapeutische Effektivität. Weitere Vorteile sind zum einen die Reduktion von Nebenwirkungen durch niedrigere Dosen an Einzelkomponenten mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zum anderen das Entgegenwirken

von Resistenzentwicklungen (Chou, 2006). Auf dem Gebiet der Phytotherapie wirken pflanzliche Extrakte gleichfalls effektiver als deren Einzelkomponenten. So besitzt der Cannabisextrakt mit einem äquimolaren Gehalt an Tetrahydrocannabinol eine stärkere antispasmodische Wirkung als dieses allein. Ähnliches gilt für den Johanniskrautextrakt, dessen antidepressive Wirkung auf der Kombination der Wirkstoffe Hyperforin, Hypericin und Flavonoiden beruht. Demgegenüber unterscheidet sich das Wirkprofil der Einzelkomponenten (Wagner und Ulrich-Merzenich, 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, etablierte Arzneistoffe mit Naturstoffen wie z.B. den Polyphenolen zu kombinieren. Beispielsweise wurde für eine Kombination aus einem polyphenolhaltigen Granatapfelextrakt und Oseltamivir eine synergistische Hemmwirkung gegenüber mehreren viralen NAs beschrieben (Haidari et al., 2009). Vergleichbar dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Kombinationen aus Zanamivir und dem prodelphinidinhaltigen EPs® 7630 sowie Zanamivir und der 2,6-Dihydroxybenzoesäure gegenüber der *V. cholerae* NA getestet. Die Zusammenstellung beruhte auf dem *in vitro* und *in vivo* nachgewiesenem NA-inhibierendem Potential (Tab. 12) (Gubareva et al., 2000, Theisen und Muller, 2012). Zu berücksichtigen ist, dass die biologische Aktivität einer Wirkstoffkombination nicht durch Addition der Einzelpotentiale berechenbar ist. Vielmehr liegt ein dritter Wirkstoff mit individueller Wirkstärke vor. Als Grundlage für die durchgeführten Berechnungen diente die mittlere Wirkungsgleichung nach Chou (Chou und Talalay, 1984, Chou, 2006).

Die Messdaten der Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen streuten sehr stark und dies insbesondere in niedrigen fa -Bereichen (Abb. 14). Eine mögliche Ursache kann in der komplexen Zusammensetzung des EPs® 7630 liegen. Um theoretisch denkbare Abweichungen in der Probenzusammensetzung beim Einwiegen auszuschließen, wurde eine Wirkstoffkombination aus Zanamivir und der Reinsubstanz 2,6-Dihydroxybenzoesäure vermessen (Abb. 15). Mittels Levene-Test konnte die Varianzhomogenität widerlegt werden. Ähnliche Streuungen in mäßig bedeutsamen fa -Bereichen traten zugleich in anderen Kombinationsexperimenten auf (Chou, 2006, Hahn et al., 2013). Im Prinzip sind diese unbedeutend angesichts des Auftretens in therapeutisch weniger relevanten Bereichen ($fa < 0,5$).

Zur Beurteilung der inhibitorischen Aktivität der Wirkstoffkombinationen wurden die D_m -Werte, welche dem IC_{50} -Wert analog sind, für die Einzelsubstanzen und für die Kombination ermittelt (Tab. 13). Im Vergleich zum Hemmeffekt von Zanamivir (D_m : 17) allein verbesserte EPs® 7630 das Potential derjenigen Kombinationen (5:1/1:10 Kombination D_m : 7,8/9,1), in denen Zanamivir quantitativ überwog oder zu mindestens im äquivalenten Anteil vorlag (1:1 Kombination D_m : 7,8). Interessanterweise sind Zusammensetzungen, in denen EPs® 7630 (D_m : 1,7) quantitativ dominierte inhibitorisch am effektivsten (1:5/1:10 Kombination D_m : jeweils 1,4). Ähnliches war für die 1:8 Kombination aus Zanamivir und 2,6-Dihydroxybenzoesäure (1:8 Kombination D_m : 47) zu beobachten. Diese hemmte effizienter als Zanamivir (D_m : 17) und 2,6-Dihydroxybenzoesäure (D_m : 127) allein. Rückschließend inhibierten Kombinationen in denen die polyphenolische Komponente überwog die *V. cholerae* NA am stärksten. Offenbar scheinen Zusammensetzungen aus etablierten NA-Inhibitoren

und Naturstoffen eine effektive Therapiestrategie zu sein. Beispielsweise wurde für eine Kombination aus Oseltamivir und dem Manuka-Honig-Bestandteil Methylglyoxal eine Hemmung von Oseltamivir-sensitiven sowie -resistenten Influenzastämmen nachgewiesen (Charyasriwong et al., 2015).

Mit Blick auf den Gesamteffekt (f_a -Bereich: 0,5-0,95) wurde nahezu Additivität für die 1:5 Kombination aus Zanamivir und EPs® 7630 ermittelt. Demgegenüber sind die Zanamivir/EPs® 7630 Verhältnisse 5:1, 10:1 und 1:10 sowie die 1:8 Kombination aus Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure aufgrund des vorliegenden Synergismus therapeutisch relevanter (Tab. 14, Tab. 16). Ein gleichfalls synergistisch wirkender, antiviraler Effekt konnte für eine Isoquercetin/Amantadin-Zusammensetzung an Influenzavirus-infizierten Epithelzellen beobachtet werden (Kim et al., 2010). Eine Ausnahme bildet die 1:1 Kombination. Wenngleich der D_m -Wert der Kombination eine effektive Hemmwirkung impliziert, entspricht der Gesamteffekt im therapeutisch relevanten f_a -Bereich nach Chou einem Antagonismus (Tab. 14) (Chou, 2006).

Fazit

Unter Berücksichtigung des D_m -Wertes und des vorliegenden Gesamteffektes inhibierte die synergistisch wirkende 1:10 Kombination aus Zanamivir/EPs® 7630 die *V. cholerae* NA am effektivsten. Diese Erkenntnis ist angesichts der mathematischen Berechnung nach Chou (2006) mit Vorsicht zu betrachten. Dennoch ermutigt das Resultat zur Testung weiterer polyphenolhaltiger Kombinationen, da für die antivirale Therapie sowie zur Prävention bakterieller Sekundärinfektionen mit *S. pneumoniae* in vielerlei Hinsicht neue Behandlungsoptionen benötigt werden (Hayden, 1986, Król et al., 2014).

4.1.4 Inhibition der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Unter Verwendung von kommerziellen Testkits wurde für zahlreiche polyphenolische Substanzen neben einer bakteriellen NA-Inhibition die Hemmung der viralen Enzymvariante nachgewiesen (Ryu et al., 2009, Derksen et al., 2014). Erste Ansätze von Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden für die Stoffklasse der Flavonoide erstellt (vgl. 1.2.1.3) (Liu et al., 2008). Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf den Proanthocyanidinen und Flavan-3-olen. Dementsprechend wurden für das Screening strukturell differierende, proanthocyanidinhaltige Fraktionen (*Salix* spp., *N. meyeri*, *D. kaki*) ausgewählt. In Ergänzung dazu wurden der prodelphinidinhaltige EPs® 7630 und die Flavan-3-ole Catechin, Galocatechin, Catechin-3-O-gallat und Gallocatechin-3-O-gallat sowie deren Epimere überprüft. Analog der Testung gegenüber der *V. cholerae* NA wurde nachfolgend eine Influenzavirus A NA (N1) verwendet (vgl. Kapitel 3.1.2.1).

Zunächst konnte beobachtet werden, dass alle polyphenolischen Testsubstanzen die virale NA im mikromolaren Konzentrationsbereich hemmten (IC_{50} -Wert: 20-845 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Im Vergleich dazu inhibierten die NA-Referenzinhibitoren Oseltamivircarboxylat und Zanamivir das Enzym in

nanomolaren Konzentrationen (IC_{50} -Wert: 2,9/3,7 ng/mL \cong 11/10 nM). Vergleichbare Differenzen in der Dimension der Daten beschrieben Rakers et al. (2014).

Einfluss der Galloylierung

Derksen et al. (2014) postulierten einen Zusammenhang zwischen den 3-*O*-galloylierten Procyanidinen und der Blockade des viralen Eintritts in die Wirtszelle. Eine vergleichbare Struktur-Wirkungsbeziehung lässt sich anhand der *in vitro*-Daten aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay ableiten (Tab. 12). So inhibierten *Diospyros*-Proanthocyanidine (IC_{50} -Werte: 20 μ g/mL), welche einen hohen Anteil an 3-*O*-Galloylierungen aufweisen, die virale NA effektiver als Proanthocyanidine ohne dieses Strukturmerkmal (Fraktionen aus *N. meyeri* und *Salix* spp., EPs® 7630; IC_{50} -Werte: 32-61 μ g/mL). Unterstützend dazu dokumentierten Rakers et al. einen stabilisierenden Effekt durch den planaren Flavon-Grundkörper, während die 3-*O*-Galloyleinheit mit dem aktiven Zentrum der NA interagiert (Rakers et al., 2014).

Nahezu keine Aktivität besaßen die galloylierten Flavan-3-ole wie z.B. Catechin-3-*O*-gallat und Epi(gallo)Catechin-3-*O*-gallat (IC_{50} -Werte: 717-862 μ g/mL \cong 1565-1949 μ M). Vermutlich ist die Halbsesselform des heterozyklischen Systems dafür verantwortlich. Konträr dazu wurde in einem Plaque-Reduktions-Assay das Hemmpotential von Epi(gallo)Catechin-3-*O*-gallat gegenüber Influenza A-Virenstämmen nachgewiesen (Müller und Downard, 2015). Rückschließend scheinen galloylierte Flavan-3-ole nicht die NA zu inhibieren, sondern eine andere virale Struktur.

Die Ellagitannine Terchebin und Paeonianin C waren moderate NA-Inhibitoren. Das gemeinsame Strukturelement ist die 3,6-Di-*O*-Galloylierung. Offenbar passt die flexiblere 1-*O*-Galloyleinheit des Terchebins (IC_{50} -Wert: 101 μ M \cong 97 μ g/mL) besser in die virale Bindungsdomäne als der 1-Penta-*O*-galloylglucosylrest von Paeonianin C (IC_{50} -Wert: 344 μ M \cong 587 μ g/mL). Liu et al. dokumentierten gleichfalls ein abgeschwächtes NA-inhibierendes Potential für glykosidierte Flavonoide. Im Vergleich dazu inhibierten unglykosidierte Flavonoide weitaus effektiver (Liu et al., 2008). Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten weiterführende Testungen den Einfluss des Substituenten auf den Hemmeffekt eingehender untersuchen. Inwieweit das Strukturelement des (D)HHDP-Esters Einfluss auf die antivirale Aktivität nimmt, lässt sich anhand der Daten nicht sagen.

Einfluss des Polymerisationsgrades und Hydroxylierungsmusters

Im Rahmen der NA-Inhibitionsstudien von Theisen et al. stellten diese einen Zusammenhang zwischen dem Kondensationsgrad von Proanthocyanidinen und der Wirkstärke fest (Theisen und Müller, 2012, Theisen et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit waren die Proanthocyanidine aus den Fraktionen *Salix* spp., *N. meyeri*, *D. kaki* und der EPs® 7630 gleichfalls potente Hemmstoffe der viralen NA (IC_{50} -Werte: 20-61 μ g/mL). Vermutlich trägt hierzu die Molekülgröße bei. So dokumentierten Rakers et al. im Zuge von Docking-Studien einen stabilisierenden Effekt des Flavon-Grundkörpers in der viralen NA (Rakers et al., 2014). Möglicherweise trifft dies auch auf das Flavan-3-ol-Gerüst der verwendeten Proanthocyanidine zu.

Neben dem Polymerisationsgrad scheint das Hydroxylierungsmuster eine essentielle Rolle zu spielen. Bisher wurde der maßgebliche Einfluss der 4'- und 7-Hydroxylierung am Benzopyran-Grundkörper auf die inhibitorische Aktivität beschrieben (Liu et al., 2008). Interessanterweise hemmten die 3',4'-dihydroxylierten Procyanidine (Fraktionen aus *N. meyeri* und *Salix* spp.; IC_{50} -Werte: 29-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) die virale NA effektiver als der EPs® 7630, welcher überwiegend Prodelphinidine enthält, die einen 3',4',5'-trihydroxylierten B-Ring aufweisen (IC_{50} -Wert: 61 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Im Hinblick auf die Flavan-3-ole zeigten die 3',4',5'-trihydroxylierten Vertreter wie (Epi)Gallocatechin und Epigallocatechin-3-O-gallat kaum eine Aktivität (IC_{50} -Werte: 717-862 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Tab. 12). Demnach scheint mit zunehmender Zahl an Hydroxysubstituenten die Wirkstärke abzunehmen.

Einfluss der Stereochemie

Eine positive Ausnahme in der Reihe der Flavan-3-ole war die moderate inhibitorische Wirkung von Gallocatechin-3-O-gallat (IC_{50} -Wert: 396 $\mu\text{M} \triangleq 181 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Tab. 12). Vermutlich dirigiert das S-konfigurierte C-3 die Galloyl-Einheit in eine günstige Position zur viralen Bindungsdomäne. Kein signifikanter Unterschied war zwischen [4 β ,8]-verknüpften Epicatechin-Bausteinen der 2,3-*cis*-*Nelia*-Procyanidine (IC_{50} -Werte: 29 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und [4 α ,8]-verknüpften Catechin-Einheiten der 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine (IC_{50} -Werte: 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zu beobachten. Offenbar scheinen weder die *cis/trans*-Isomerie noch die Interflavanylverknüpfung (4 α oder 4 β) Einfluss zu nehmen.

Fazit

Im Rahmen des Screenings zeigten die Proanthocyanidine (2,3-*cis*-*Nelia*-, 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine, prodelphinidinhaltiger EPs® 7630, *Diospyros*-Proanthocyanidine) ein effektives, therapeutisch relevantes Potential gegenüber der Influenzavirus A NA (N1) (IC_{50} -Wert: 20-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Ellagitannine Terchebin sowie Paeonianin C und das Flavan-3-ol Gallocatechin-3-O-gallat (IC_{50} -Wert: 97-312 $\mu\text{g}/\text{mL} \triangleq 101$ -396 μM) wiesen ein moderates Hemmpotential auf. Demgegenüber zeigten die Flavan-3-ole Catechin, Gallocatechin und Catechin-3-O-gallat sowie deren Epimere eine sehr geringe Aktivität. Im Hinblick auf die chemischen Strukturmerkmale konnte die Bedeutung der 3-O-Galloylierung und des Kondensationsgrades für den Hemmeffekt herausgestellt werden. Bei den Flavan-3-olen scheint der Gallussäurerest eine abgeschwächte Wirkung hervorzurufen. Die dokumentierten Struktur-Wirkungsbeziehungen erweitern das Verständnis der NA-inhibierenden Aktivität von Proanthocyanidinen und Flavan-3-olen und liefern Hinweise für die Erforschung zukünftiger NA-inhibierender Hemmstoffe.

4.1.5 Vergleich der Inhibition der *V. cholerae* Neuraminidase und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Auffällig war, dass insbesondere Proanthocyanidine (2,3-*cis*-*Nelia*-, 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine, *Diospyros*-Proanthocyanidine, EPs® 7630; IC_{50} -Werte: 0,5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) die bakterielle NA effektiver bzw. ähnlich stark hemmten wie die NA-Referenzsubstanzen Zanamivir und Oseltamivircarboxylat

(IC_{50} -Werte: 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 41 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Konträr dazu inhibierten Zanamivir und Oseltamivircarboxylat (IC_{50} -Werte: 2,9 ng/mL ; 3,7 ng/mL) das virale Enzym effektiver als die Proanthocyanidine (IC_{50} -Werte: 20-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Solch eine Inversion der Messdaten beschrieben auch Gut et al., welche gleichfalls Inhibitionsstudien mit bakteriellen und viralen NAs durchführten (Gut et al., 2011). Die ausgeprägte Hemmung der viralen NA durch Zanamivir und Oseltamivircarboxylat ist vermutlich in der selektiven Entwicklung gegenüber dem viralen Enzym begründet (vgl. Kapitel 1.2.1.2) (von Itzstein et al., 1993).

Ähnlich wie die NA-Referenzinhibitoren zeigten die polyphenolischen Testsubstanzen differierende Wirkstärke gegenüber beiden Enzymvarianten. Beispielsweise hemmten Gallocatechin-3-O-gallat und Paeonianin C die bakterielle NA um das 15- und 20-fach effektiver als das virale Enzym (IC_{50} -Wert: Tab. 12). Für EPs® 7630 wurde eine Differenz um das ca. 35-fache festgestellt (IC_{50} -Wert: bakteriell 1,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. viral 61 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dies lässt die Vermutung zu, dass die virale und bakterielle Bindungstasche voneinander abweichen und/oder differierende Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Bindungsdomäne auftraten. Studien mit 2-Desoxy-2,3-didehydro-N-Acetylneuraminsäurederivaten offenbarten gleichfalls variierende Hemmpotentiale gegenüber viralen, bakteriellen und von Säugetieren stammenden NAs (Holzer et al., 1993). Erkennbar ist, dass unabhängig von der NA-Herkunft sowohl Proanthocyanidine (2,3-cis-Nelia- und 2,3-trans-Salix-Procyanidinen, Diospyros-Proanthocyanidine, EPs® 7630) als auch die Ellagitannine Paeonianin C und Terchebin am effektivsten inhibierten (IC_{50} -Werte: Tab. 12).

Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig mittels Datensätzen aus einem *in vitro*-Testsystem eine signifikante Korrelation zwischen dem Hemmeffekt (IC_{50} -Werte) von 14 flavanoiden Substanzen und der Herkunft der NA nachgewiesen (Spearman-Korrelationskoeffizient $r=0,57$). Alle Testsubstanzen hemmten die bakterielle NA stärker als die Referenzinhibitoren. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich gegenüber der viralen NA. Im Bewusstsein sollte der Wirkunterschied des jeweiligen Inhibitors gegenüber beiden NAs sein. Rückschließend aus den IC_{50} -Werten sind vor allem Proanthocyanidine (2,3-cis-Nelia- und 2,3-trans-Salix-Procyanidinen, Diospyros-Proanthocyanidine, EPs® 7630) therapeutisch relevante Inhibitoren, unabhängig von der Herkunft der NA. Forscher stellten in Anwesenheit oral vorkommender, NA-besitzender Bakterien wie *S. oralis* und *S. mitis* eine verstärkte Knospung von Influenzaviren sowie eine verminderte Wirksamkeit von Zanamivir fest (Kamio et al., 2015). Die parallele Hemmung beider NAs scheint somit ein erstrebenswerter Effekt.

4.1.6 Wechselwirkungen von Zanamivir und Oseltamivircarboxylat in der Bindungstasche der *V. cholerae* und der Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Bereits 1991 wies Henrissat auf die Substratspezifität katalytischer Domänen hin. Im Hinblick auf NAs wurden verschiedene Aktivitäten in der Umsetzung von *a*-2,3-, *a*-2,6- oder *a*-2,8-verknüpften Sialinsäuren beobachtet (Taylor, 1996). Der NA-Inhibitor Zanamivir besitzt eine ca. 1000-fach stärkere Potenz H5N3 zu hemmen als der NA-Inhibitor Neu-5-Ac-2-en. Konträr dazu inhibiert Neu-5-Ac-2-en die bakterielle *S. pneumoniae* NA effektiver als Zanamivir (Gut et al., 2011). Eine ähnliche Inversion des Hemmpotentials zeigte der Vergleich der IC_{50} -Werte aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay (vgl. Kapitel 4.1.5; Tab. 12). Zur Klärung dieses Phänomens erfolgte die Anwendung computergestützter Methoden aus der Bioinformatik. Zunächst erfolgte der Gegenüberstellung des dreidimensionalen Aufbaus der bakteriellen NA mit dem der viralen Enzymvariante. Im Anschluss wurden die Wechselwirkungen zwischen den Inhibitoren Zanamivir sowie Oseltamivircarboxylat und der bakteriellen sowie viralen NA analysiert.

4.1.6.1 Dreidimensionaler Aufbau der Neuraminidase

Ein Unterschied zwischen beiden NAs zeigte sich bereits in der Aminosäuresequenz (vgl. Kapitel 3.3.1., Tab. 19). Die *V. cholerae* NA wies eine Identität von 13 % und eine Ähnlichkeit von 21 % mit der Influenzavirus A NA (N1) auf. Auch weitere Forschergruppen berichten über solch geringe Übereinstimmungen zwischen NAs verschiedener Herkunft. Zudem wurden eine größere Strukturhomologie zwischen den bakteriellen NAs von *V. cholerae* und *S. typhimurium* dokumentiert als zwischen der *V. cholerae* NA und der viralen NA (N9) (Crennell et al., 1994, Taylor, 1996, von Grafenstein et al., 2015). Ein weiterer Unterschied besteht in der räumlichen Struktur, die zur enzymatischen Aktivität führt. Während die bakterielle NA als Monomer aktiv ist, ist die Aktivität und Strukturstabilität des viralen Enzyms an die Tetramerisierung gekoppelt (Wu et al., 2009, von Grafenstein et al., 2015). Zudem belegen Aktivitätsstudien mit viralen NAs eine Abhängigkeit zwischen den vier Untereinheiten (Amaro et al., 2007). Weiterhin tragen die divergierende Zahl und Lage der Ca^{2+} sowie die lediglich viral vorkommende Aminosäure Cystein zur differierenden Proteinfaltung bei. Ein Mangel des Cysteins an Position 76 der Aminosäuresequenz führt zu nicht infektiösen Viruspartikeln (Guangxiang et al., 1993). Eine Gemeinsamkeit beider NAs ist die β -Propeller-Struktur der katalytischen Domäne. Dabei sind vier der nur in der *V. cholerae* NA vorkommenden „Asp-box“en an der Ausbildung des β -Propellers beteiligt. Die fünfte bindet Ca^{2+} , welches zur Enzymaktivität beiträgt (Taylor, 1996). Literaturquellen bestätigen das Vorkommen des „Asp-box“-Motives in weiteren NA-exprimierenden Bakterienspezies. Im Gegensatz dazu tritt das Motiv nicht in der Aminosäuresequenz viraler NA auf (Quistgaard und Thirup, 2009). Zudem enthält das aktive Zentrum der *V. cholerae* NA ein RIP/RLP-Motiv (Arg-Ile-Pro/Arg-Leu-Pro), welches mit Carboxygruppen diverser Inhibitoren wechselwirkt. Im korrespondierenden, viralen REP-Motiv

(Arg-Glu-Pro) erfolgte der Austausch der Aminosäure Isoleucin zu Glutaminsäure, dennoch bleibt die Möglichkeit zur Wechselwirkung bestehen (Gaskell et al., 1995). Rückschließend gehören beide NAs zur gleichen Enzymklasse und setzen das verwendete Substrat MuNANA um. Demgegenüber liegen molekulare Unterschiede vor, wodurch zum einen die Theorie der Verschiedenheit beider NAs gestützt wird, zum anderen ein erster Hinweis zur Klärung der Wirkunterschiede der Inhibitoren vorliegt (vgl. Kapitel 1.2.1.1, Kapitel 4.1.1, Tab. 12).

4.1.6.2 Wechselwirkungen von Zanamivir und Oseltamivircarboxylat in der *V. cholerae* Neuraminidase und Influenzavirus A Neuraminidase (N1)

Mittels Docking-Studien konnten Wechselwirkungen zwischen Flavonoiden sowie Resveratrol-Derivaten und einer viralen NA simuliert werden (Rakers et al., 2014, Li et al., 2015, Müller und Downard, 2015). An Röntgenstrukturdaten von Ko-Kristallisaten aus einer NA und einer polyphenolischen Substanz mangelt es hingegen. Folglich wurde in Zusammenarbeit mit dem Helmholtz Zentrum eine Ko-Kristallisation der *V. cholerae* NA mit dem Flavan-3-ol Epigallocatechin-3-O-gallat angestrebt. Trotz vieler Bemühungen konnte kein geeignetes Ko-Kristallisat gewonnen werden. Angesichts dessen wurden Zanamivir und Oseltamivircarboxylat als Modellschubstanzen für eine weitere Ko-Kristallisation ausgewählt (vgl. Kapitel 4.1.6). Ein zusätzlicher Vorteil waren die Verfügbarkeit bereits existierender Röntgenstrukturdaten von Ko-Kristallisaten aus viralen NAs mit beiden Inhibitoren (Tab. 9). Hintergrund dieser Untersuchungen war, anhand der Wechselwirkung zwischen NA-Inhibitor und NA ein besseres Verständnis für den Wirkunterschied gegenüber der bakteriellen und viralen NA zu erlangen.

Eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Ko-Kristallisation ist die biologische Aktivität des Enzyms. Daher erfolgte zunächst die Bestimmung der Enzymkinetik der exprimierten *V. cholerae* NA. Die erhaltenen Parameter $K_m = 1,48 \text{ mM}$ und $v_{max} = 126 \text{ } \mu\text{mol/min}$ sowie die Aktivität von $26,7 \text{ U/ml}$ belegen, dass das Substrat MuNANA durch ein aktives Enzym umgesetzt wurde. Die Werte entsprachen den Literaturdaten, weshalb das Enzym für die Ko-Kristallisation weiterverwendet wurde (vgl. Kapitel 2.7, Kapitel 3.2.2) (Potier et al., 1979).

Wechselwirkungen der NA-Inhibitoren mit der *V. cholerae* NA

Ableitend von den IC_{50} -Werten aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay inhibierte Zanamivir (IC_{50} -Wert: $52 \text{ } \mu\text{M}$) die *V. cholerae* NA effektiver als Oseltamivircarboxylat (IC_{50} -Wert: $144 \text{ } \mu\text{M}$) (Tab. 12). Die Analyse der Röntgenstrukturdaten ergab, dass die Carboxygruppe, unabhängig von der Position (Zanamivir: C-1, Oseltamivircarboxylat C-2), vergleichbare Wasserstoffbrücken zur basischen Bindungsdomäne (Arg 250, Arg 661, Arg 738) ausbildete (Abb. 23). Auch die Wechselwirkungen ausgehend von den Ringsystemen spielen offenbar eine essentielle Rolle bei der Hemmung der *V. cholerae* NA. Während der Dihydro-4H-Pyranring (Zanamivir) mit der Hydroxygruppe des Try 766 wechselwirkte, interagierte der Cylohex-1-enring (Oseltamivircarboxylat) mit Phe 664 (Abb. 23). Beide

Grundgerüste imitieren den Übergangszustand des Substrates Neu-5-Ac, besitzen aber eine höhere Bindungsaffinität zur Bindungstasche (Taylor und von Itzstein, 1994). In Docking-Studien mit der NA von *S. typhimurium* wurde gleichfalls eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Dihydro-4H-Pyranring (Zanamivir) und einem Tyrosinrest beobachtet (Taylor, 1996).

Ein möglicher Lösungsansatz zur Klärung der differierenden Wirkstärken von Zanamivir und Oseltamivircarboxylat könnte die unterschiedliche Anzahl an stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen sein. Zanamivir bildet über die 4-Guanidinogruppe und 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylseitenkette insgesamt sechs Wasserstoffbrücken mit der bakteriellen Bindungstasche (Asp 151, Trp 178, Glu 276) aus. Die vergleichbaren Strukturelemente des Oseltamivircarboxylats, die 5-Amino- und 3-(1')-Ethylprooxygruppe, wechselwirkten lediglich über eine Wasserstoffbrücke mit dem aktiven Zentrum (Glu 119) (Abb. 21). Gut et al. (2011) beschrieben ähnliche Wechselwirkungen zwischen der NA von *S. pneumoniae* und Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat.

Fazit

Anhand der Röntgenstrukturdaten konnte erstmalig die Wechselwirkungen zwischen Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat und der *V. cholerae* NA analysiert werden. Im Vergleich zeigten sowohl die Carboxygruppe sowie die Ringsysteme beider NA-Inhibitoren ähnliche Wechselwirkungen mit der Bindungstasche. Im Gegensatz zu Oseltamivircarboxylat wechselwirkte Zanamivir mittels der 4-Guanidinogruppe und 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylseitenkette über eine höhere Anzahl stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen mit der Bindungsdomäne. Zum Schutz vor dem humanen Immunsystem bildet das Bakterium *P. aeruginosa* mithilfe der NA einen Biofilm aus. *In vitro*-Studien belegten eine verminderte Produktion des Films in Anwesenheit von Oseltamivircarboxylat. Aufgrund der starken Konservierung bakterieller NAs könnten in der *P. aeruginosa* NA ähnliche Wechselwirkungen wie in der *V. cholerae* NA vorliegen und dies den inhibitorischen Effekt von Oseltamivircarboxylat erklären (Soong et al., 2006).

Wechselwirkungen der NA-Inhibitoren mit der Influenzavirus A NA (N1)

Im Hinblick auf die Hemmung der Influenzavirus A NA (N1) belegen die *in vitro*-Daten nahezu identische Wirkstärken für Zanamivir und Oseltamivircarboxylat (IC_{50} -Werte beide jeweils 0,01 μ M) (Tab. 12). Die Auswertung der Röntgenstrukturdaten ergab, dass die Sesselform des jeweiligen Ringsystems die äquatoriale Stellung der 2- bzw. 1-Carboxy- und der Carbonylgruppe der 5- bzw. 4-Acetamidofunktion (Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat) gewährleistete. Sowohl die Carboxy- als auch die Acetamidogruppe wechselwirkten mit der viralen Bindungsdomäne über die gleiche Anzahl an Wasserstoffbrücken mit ähnlicher Länge (Abb. 23). In der Literatur wird die äquatoriale Stellung mehrfach mit dem NA-inhibierenden Effekt in Verbindung gebracht (Varghese et al., 1983, von Itzstein et al., 1993, Smith et al., 1996). Differierende Wechselwirkungen zeigten die 4-Guanidino- (Zanamivir) und 5-Aminogruppe (Oseltamivircarboxylat). Die anionische Bindungstasche für die 4-Guanidinofunktion bestand aus zwei sauren und einer unpolaren Aminosäure (Asp 151, Glu 227,

Trp 178), die der 5-Aminogruppe hingegen aus zwei sauren Aminosäuren (Glu 119, Asp 151) (Abb. 23). Im Fall von Zanamivir scheint die voluminösere Guanidinogruppe die virale Bindungstasche mehr auszufüllen als die Aminofunktion des Oseltamivircarboxylats. Ähnliche Wechselwirkungen wurden in der NA vom Subtyp N9 beobachtet (Masukawa et al., 2003). Zudem besitzen beide NA-Inhibitoren aufgrund der Basizität der Guanidino- bzw. Aminofunktion eine höhere Affinität, Effektivität und Spezifität zur Bindungsdomäne als der 4-O-hydroxylierte Inhibitor Neu-5-Ac-2-en (von Itzstein et al., 1993, Kim et al., 2013). Weiterhin wurde eine Wasserstoffbrücke zwischen der Aminosäure Glu 276 und der 1'-Hydroxygruppe der 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylseitenkette (Zanamivir) festgestellt. Die Hydroxygruppe scheint einen positiven Einfluss auf den inhibitorischen Effekt zu haben, da Studien mit dem 1'-O-methylierten NA-Inhibitor Laninamivir eine schwächere Hemmung belegten (Vavricka et al., 2011). Die 3-(1')-Ethylproxyseitenkette (Oseltamivircarboxylat) ging hingegen eine hydrophobe Wechselwirkung mit der Seitenkette des Ile 222 ein (Abb. 23). Im Hinblick auf das jeweilige Ringsystem zeigte der Cyclohex-1-enring (Oseltamivircarboxylat) keine Wechselwirkungen, während der fast planare Dihydro-4H-Pyranring (Zanamivir) mit der Hydroxygruppe des Try 406 wechselwirkte. Hintergrund ist die Stabilisierung des Oxocarbenium-Ions (Taylor, 1996). Forscher erklären anhand dieses Effektes die verminderte Resistenzentwicklung gegenüber Zanamivir (Masukawa et al., 2003, Vavricka et al., 2011).

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Carbonylgruppe der 4- bzw. 5-Acetamidofunktion, die 1- bzw. 2-Carboxy-, die 4-Guanidino- bzw. 5-Aminogruppierung von Zanamivir bzw. Oseltamivircarboxylat nahezu identische Wechselwirkungen mit der viralen Bindungstasche aufwiesen. Im Vergleich zur 3-(1')-Ethylproxyseitenkette und zum Cyclohex-1-enring (Oseltamivircarboxylat) zeigten der Dihydro-4H-Pyranring und die 6-(1',2',3')-Trihydroxypropylgruppe (Zanamivir) verschiedene Wechselwirkungen.

Vergleich der Wechselwirkungen der NA-Inhibitoren mit der Influenzavirus A NA (N1) und der *V. cholerae* NA

Wie im Kapitel 4.1.5 beschrieben, inhibierten Zanamivir und Oseltamivircarboxylat die virale NA in einer nanomolaren Konzentration, während die Hemmung der *V. cholerae* NA im mikromolaren Konzentrationsbereich lag (Tab. 12). Der Vergleich der Wechselwirkungen zeigte, dass sowohl in der viralen als auch bakteriellen Bindungsdomäne der Dihydro-4H-Pyran- (Zanamivir) und der Cyclohex-1-enring (Oseltamivircarboxylat) in einer ²C₅-Konformation vorlagen. Solch eine Sesselform nehmen des Weiteren die NA-Inhibitoren Laninamivir und Neu-5-Ac-2-en ein (Varghese et al., 1983, von Itzstein et al., 1993, Moustafa et al., 2004, Gut et al., 2011). Forscher belegten, dass die ²C₅-Konformation eine essentielle Voraussetzung für die Entfaltung des inhibitorischen Potentials ist (Colman et al., 1983, Varghese et al., 1983). Ähnlich wie für das Substrat Neu-5-Ac beobachtet, gewährleistet diese die äquatoriale Stellung der Carboxy- und der Acetamidogruppe (Tab. 20, Tab. 21,

Abb. 23). Da Zanamivir und Oseltamivircarboxylat sowohl in der bakteriellen als auch in der viralen NA die Sesselform einnehmen, kann der Wirkunterschied gegenüber beiden NAs hieran nicht erklärt werden. Ebenfalls auszuschließen sind die Wechselwirkungen ausgehend von der 1- bzw. 2-Carboxygruppe (Oseltamivircarboxylat bzw. Zanamivir). So waren die Anzahl und die Bindungslängen der Wasserstoffbrücken zu den Argininresten der bakteriellen bzw. viralen Bindungsdomäne nahezu identisch. Ähnlich wie die ${}^2\text{C}_5$ -Konformation ist die Carboxygruppe maßgeblich am inhibitorischen Effekt beteiligt (Taylor, 1996).

Der Wirkunterschied gegenüber beiden NAs ergibt sich offenbar durch den lediglich viral vorkommenden 150-loop (Aminosäuren 147-152). So bilden die Aminosäuren Asp 151 und Arg 152 Wasserstoffbrücken zur 4-Guanidino- bzw. 5-Aminogruppe und der Carbonylgruppe der 5- bzw. 4-Acetamidofunktion (Zanamivir bzw. Oseltamivir) aus (Abb. 23). Vergleichbare Wechselwirkungen des 150-loops der NA vom Subtyp N1 wurden mit dem NA-Inhibitor Peramivir beschrieben (Malaisree et al., 2008). Solche Wasserstoffbrücken wurden nicht mit der *V. cholerae* NA beobachtet (Abb. 19). Auch humane Sialidasen wechselwirken nicht mit der 4-Guanidino- bzw. 5-Aminogruppe. Dies bietet den Vorteil verminderter Nebenwirkungen (Gut et al., 2011).

Wie bereits beschrieben, spielt die Imitierung des Übergangszustandes des Substrates Neu-5-Ac eine entscheidende Rolle für die Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum der NA. In Bezug auf Flavan-3-ole und Proanthocyanidine scheint das starre Ringsystem (A- und C-Ring) offenbar nicht in der Lage zu sein, diesen Zustand nachzuahmen. Möglicherweise erklärt dies den Wirkunterschied zu den NA-Referenzinhibitoren. Vergleichbar dazu beschrieben Rakers et al. einen stabilisierenden Effekt des Flavon-Grundkörpers außerhalb der Bindungsdomäne für NA-Inhibitoren (Rakers et al., 2014). Müller und Downard (2015) postulierten für das Flavan-3-ol Catechin eine gänzlich abweichende Bindungstasche.

Fazit

Die effektivere Wirkstärke von Zanamivir und Oseltamivircarboxylat gegenüber der viralen NA liegt an den Wechselwirkungen mit den Aminosäuren des 150-loops. Essentielle Strukturmerkmale für die Hemmwirkung gegenüber beiden NAs sind: die 1- bzw. 2-Carboxy-, die 4-Guanidino- bzw. 5-Aminogruppe sowie die Carbonylgruppe der 5-bzw. 4-Acetamidogruppe (Zanamivir bzw. Oseltamivir). Die fehlende Nachahmung des Übergangszustandes des Substrates Neu-5-Ac erklärt möglicherweise die geringere inhibitorische Aktivität flavanoider Testsubstanzen. Die Ergebnisse untermauern die Erkenntnisse aus dem MuNANA-Fluoreszenz-Assay und verdeutlichen, dass sowohl *in vitro*- als auch *in silico*-Testmodelle im Hinblick auf die Herkunft der NA anzupassen sind (vgl. Kapitel 4.1). Zwar scheint die Verwendung der viralen NA praxisrelevanter, jedoch sind Studien an bakteriellen NAs wie z.B. von *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae* nicht zu vernachlässigen.

4.2 Vasorelaxierendes Potential polyphenolischer Substanzen

4.2.1 Screening von Flavan-3-olen und Procyanidinen auf vasorelaxierendes Potential an Koronararterien des Schweins

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems, wozu z.B. arterieller Bluthochdruck, koronare Herzerkrankung oder Arteriosklerose zählen (Vanhoutte, 2009). Häufig sind diese Erkrankungen mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert, wodurch unter anderem eine Vasokonstriktion auftritt (vgl. Kapitel 1.2.2.3). Zahlreiche epidemiologische Studien stellen einen Zusammenhang zwischen dem regelmäßigen Konsum polyphenolischer Nahrungs- und Genussmittel und dem verminderten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen her (Arts et al., 2001, Hooper et al., 2008, Chiva-Blanch et al., 2013). *In vivo*-Studien belegen, dass polyphenolhaltige Extrakte aus Weintraubenschalen oder flavonoidreiche, dunkle Schokolade einer endothelialen Dysfunktion entgegenwirken (Clifton, 2004, Engler et al., 2004, Hall et al., 2008). Unter Verwendung verschiedener *in vitro*-Methoden wie z.B. Organbadstudien, Western Blot-Verfahren oder zellbasierten Assays wurde für zahlreiche polyphenolreiche Extrakte neben der konzentrations- und endothel(un)abhängigen Vasodilatation die involvierte Signalkaskade nachgewiesen (Schini-Kerth et al., 2011, Hun Kim et al., 2014). Dabei fanden zumeist chemisch wenig definierte Extrakte Anwendung (Fitzpatrick et al., 1993, Anselm et al., 2007, Madeira et al., 2008, Anselm et al., 2009). Infolge der Verwendung von polyphenolischen Reinsubstanzen konnten erste Struktur-Wirkungsbeziehungen erstellt werden. So wurde beispielsweise das Hydroxylierungsmuster und die 2,3-Stereochemie oligomerer Flavan-3-ole mit dem relaxierenden Effekt in Verbindung gebracht (Auger et al., 2010, Tokoudagba et al., 2010, Kurita et al., 2013, Kaufeld, 2015, Lorenz et al., 2015). Im Folgenden wurde das Augenmerk auf die Stoffklasse der Flavan-3-ole und der Procyanidine gelegt. Ergänzend dazu fand eine Fraktion aus *Diospyros kaki* Anwendung, welche einen hohen Anteil an Epigallocatechin-Bausteinen enthielt.

Die Ergebnisse der kumulativen Zugabe von Epicatechin, Epigallocatechin, Epicatechin-3-*O*-gallat bzw. Epigallocatechin-3-*O*-gallat (alle jeweils 3-100 mg/mL) zu vorkontrahierten Koronararterien zeigten, dass alle Testsubstanzen geringfügige Ansätze einer endothelabhängigen Dilatation hervorriefen (Abb. 20). Epigallocatechin-3-*O*-gallat induzierte dabei den deutlichsten Effekt (E_{\max} : 58 %). Unterstützend dazu induzierten auch die acylierten Flavan-3-ole Catechin-3-*O*-gallat (E_{\max} : 35 %) sowie Gallocatechin-3-*O*-gallat (E_{\max} : 30 %) eine Relaxation, wenngleich nicht vollständig (Abb. 24). Folglich scheinen zumeist galloylierte Flavan-3-ole im Konzentrationsbereich bis zu 100 mg/mL moderat vasodilatierend zu wirken. Möglicherweise nehmen sowohl die 3-*O*-Acylierung sowie der Epigallocatechin-Grundbaustein Einfluss auf das Relaxationsvermögen. Literaturquellen belegen, dass Epigallocatechin-3-*O*-gallat (5-15 μ M) gleichfalls auf die *Aorta thoracica* von Ratten dilatierend wirkte (Lorenz et al., 2004, Lorenz et al., 2015). Weiterhin konnte in Endothelzellen die mit Epi(gallo)catechin-3-*O*-gallat behandelt wurden p-Akt und p-eNOS nachgewiesen werden. Beide

Enzyme sind an der endothelabhängigen vasorelaxierenden Signalkaskade beteiligt (Auger et al., 2010). Analog zu den Flavan-3-olen untermauern die Relaxationsversuche mit den ausgewählten Procyanidinen die Bedeutung des Galloylsubstituenten (Abb. 21). So induzierte die kumulative Zugabe von Procyanidin B2-3-O-gallat (Epicatechin-3-O-gallat-[4 β -8]-Epicatechin) (E_{\max} : 89 %; $pEC_{50}=2,1$ [2,0-2,2] mg/mL) ein signifikantes, nahezu vollständiges Dilatieren (jeweils 3-32 μ g/mL). Procyanidin B2 (Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin), Procyanidin B3 (Catechin-[4 α -8]-Catechin) und Procyanidin C1 (Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin) wirkten hingegen moderat relaxierend (E_{\max} : 30-59 %; jeweils 1-100 mg/mL). Anhand von Relaxationsversuchen mit Rattenaorten postulierten Fitzpatrick et al. gleichfalls einen Zusammenhang zwischen dem dilatierenden Effekt und der 3-O-Galloylierung von Procyanidinen (Fitzpatrick et al., 2002). Ein vergleichbares Potential wie Procyanidin B2-O-gallat zeigte die Fraktion aus *D. kaki* (E_{\max} : 95 %; $pEC_{50}=2,6$ [2,5-2,7]), welche Prodelphinidine mit Procyanidin-Anteilen enthielt. Der Grad der Galloylierung liegt bei ca. 60 %.

Fazit

Das Screening auf vasorelaxierendes Potential in der Stoffklasse der Flavan-3-ole und der Procyanidine ergab, dass das Strukturelement der 3-O-Galloylierung Einfluss auf das Relaxationsvermögen nimmt. Aufgrund des stark ausgeprägten Effektes wurde nachfolgend das Augenmerk auf Procyanidin B2-O-gallat (Epicatechin-3-O-gallat-[4 β -8]-Epicatechin) und die Fraktion aus *D. kaki* gelegt. Die weniger stark relaxierenden Flavan-3-ole wie Epi(gallo)catechin, (Epi)catechin-3-O-gallat und Gallocatechin-3-O-gallat sowie die Procyanidine B2, B3 und C1 wurden im Folgenden nicht weiter betrachtet.

4.2.2 Charakterisierung der Signalkaskade(n) der endothelabhängigen Relaxation durch *Diospyros*-Proanthocyanidine und Procyanidin B2-3-O-gallat

Mit einigen wenigen Ausnahmen induzieren polyphenolhaltige Extrakte/Fraktionen eine Vasorelaxation zumeist über integres Endothel. Schini-Kerth et al. (2011) fassen hierzu eine Reihe von Beispielen zusammen, die an vorkontrahierten Gefäßen verschiedener Spezies eine endothelabhängige Dilatation hervorriefen. Im Gegensatz dazu zeigten Gefäße, deren Endothel entfernt wurde, kein Relaxieren (Abeywardena et al., 2002, Kwan et al., 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte kein Dilatieren von Koronararterien mit entferntem Endothel durch *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie Procyanidin B2-3-O-gallat (Abb. 26). Folglich scheint für den Relaxationsmechanismus ein intaktes, funktionstüchtiges Endothel entscheidend zu sein. Ähnliches konnte für einen procyanidinhaltigen Traubenextrakt beobachtet werden. Dieser induzierte gleichfalls ein endothelabhängiges Relaxieren von Rattenaorten, welches nach Entfernung des Endothels ausblieb (Fitzpatrick et al., 1993). Eine Vielzahl von Literaturquellen belegen unter anderem die Beteiligung des PI3/Akt-, NO/cGMP- und/oder EDHF-Signalweges am vasodilatierenden Effekt (vgl. Kapitel 1.2.2.4). Zur Charakterisierung der Signalkaskade wurden isolierte Arteriensegmente mit Inhibitoren

oder Mimetika inkubiert, anschließend kontrahiert und mittels *Diospyros*-Proanthocyanidine bzw. Procyanidin B2-3-*O*-gallat kumulativ relaxiert (vgl. Kapitel 2.9.1).

4.2.2.1 Beteiligung des NO/cGMP-Signalwegs

Verschiedene Mediatoren stimulieren die eNOS zur Generierung des second messengers NO. Dieser diffundiert in die glatte Muskelzelle und aktiviert die sGC, wodurch das Gefäß nachgeschaltet dilatiert (vgl. Kapitel 1.2.2.2.1.). In Organbadversuchen wurde in Gegenwart des spezifischen eNOS-Inhibitors L-NAME sowie des sGC-Hemmstoffs ODQ das Relaxationsvermögen von procyanidin-haltigen Fraktionen inhibiert (Kaufeld, 2015). In Analogie dazu konnte in Anwesenheit von L-NAME die *Diospyros*-Proanthocyanidin- sowie Procyanidin-B2-3-*O*-gallat-vermittelte Dilatation nahezu vollständig unterbunden werden (Abb. 30). Demzufolge spielt der Botenstoff NO eine entscheidende Rolle im Relaxationsmechanismus. Demgegenüber zeigten procyanidinreiche Fraktionen aus *Pakia biglobosa* und Äpfeln lediglich partielle Relaxationen. Untersuchungen ergaben die parallele Beteiligung des EDHF-Signalwegs (Matsui et al., 2009, Tokoudagba et al., 2010). Ähnlich wie für Epigallocatechin-3-*O*-gallat postuliert, scheint bei beiden Testsubstanzen, die gleichfalls 3-*O*-Galloylierungen aufweisen, der NO-vermittelte Signalweg im Vordergrund zu stehen (Lorenz et al., 2004, Kim et al., 2007). Zur Überprüfung des NO-vermittelten cGMP-Signalwegs erfolgte die Inkubation mit dem sGC-Inhibitor ODQ. Aufgrund des verminderten Dilatationsvermögens beider Testsubstanzen scheint NO den second messenger cGMP zu aktivieren (Abb. 30). Vergleichbar dazu wurde für einen procyanidinreichen *Crataegus*-Extrakt die Beteiligung des NO/cGMP-Signalwegs am Relaxieren von Rattenaorten nachgewiesen (Kim et al., 2000).

Fazit

Das spontan-auftretende Dilatieren von Koronararterien des Schweins durch Procyanidin-B2-3-*O*-gallat sowie *Diospyros*-Proanthocyanidine erfolgte über ein intaktes, funktionelles Endothel. Daran war vornehmlich der NO/cGMP-Signalweg beteiligt, wobei weitere Signalkaskaden nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. Möglicherweise spielt die Beteiligung einer zweiten, parallel gekoppelten Signalkaskade eine sekundäre Rolle und wird erst bei einer unzureichenden NO-vermittelten Vasodilatation und/oder pathogenen Zuständen aktiviert (Garland et al., 1995). Das *Diospyros*-Proanthocyanidin- sowie Procyanidin-B2-3-*O*-gallat-induzierte Relaxieren über den NO/cGMP-Signalweg ist in Abb. 52 abgebildet.

4.2.2.2 Beteiligung von K⁺-Kanälen

Über die Beteiligung von K⁺-Kanälen an der Polyphenol-induzierten Dilatation liegen eine Vielzahl von Annahmen vor. Beispielsweise beobachteten Byun et al. (2012) in Endothelzellen von Ratten in Anwesenheit von Procyanidin C1 ein BK_{Ca}-Kanal-vermitteltes Hyperpolarisieren. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf dem Ca^{2+} -Sparks-induzierbaren BK_{Ca} - und auf dem K_v -Kanal. Das Öffnen von K^+ -Kanälen und der anschließende K^+ -Efflux führen zu einer Änderung des glattmuskulären Membranpotentials, wodurch VOCCs schließen und der verminderte Ca^{2+} -Einstrom zum Relaxieren der glatten Muskelzelle beiträgt (vgl. 1.2.2.2.3) (Nelson et al., 1990). Literaturdaten belegen in Gegenwart des BK_{Ca} -Kanal-Inhibitors TEA sowie des K_v -Kanal-Inhibitors 4-AP ein vermindertes Relaxationsvermögen des Phytoalexins Resveratrol (Nagaoka et al., 2007). Im Rahmen der eigenen Studien konnte dies für *Diospyros*-Proanthocyanidine nicht verifiziert werden (Abb. 32, Abb. 33). Folglich sind weder BK_{Ca} - noch K_v -Kanäle am Relaxationsmechanismus beteiligt.

4.2.2.1 Beteiligung des EDHF-Signalwegs

Die intensive Erforschung der EDHF-vermittelten Gefäßdilatation zeigte, dass hierunter mehrere Faktoren zusammengefasst werden müssen (vgl. Kapitel 1.2.2.2.3). Aktivierte endotheliale SK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanäle führen durch den K^+ -Ausstrom zum Hyperpolarisieren der Endothelzelle. Die nachgeschaltete Erregungsleitung induziert in der glatten Muskelzelle ein Absenken des $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wodurch diese relaxiert. Byun et al. belegten eine endotheliale Hyperpolarisation durch Apfel-Procyanidine, welche in Anwesenheit verschiedener K^+ -Kanal-Inhibitoren unterbunden wurde (Byun et al., 2012). Im Rahmen der durchgeführten Inhibitionsstudien nahm die Anwesenheit der Kombination aus CTX, einem unselektiven BK_{Ca} - und IK_{Ca} -Kanal-Inhibitor, und Apamin, einem SK_{Ca} -Kanal-Hemmstoff, keinen Einfluss auf das Relaxationsvermögen der Testsubstanzen (Abb. 34). Auch der Austausch von CTX mit dem spezifischen IK_{Ca} -Kanal-Blocker TRAM 34 führte zu keinem veränderten Dilatieren (Abb. 35). Erst durch die Kombination mit L-NAME erfolgte ein vermindertes Relaxieren (Abb. 35). Im Vergleich zum Relaxationsvermögen in Anwesenheit von L-NAME allein war dieses hingegen nicht signifikant verschieden (Abb. 35). Rückschließend scheint der EDHF bei der Relaxation durch *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie Procyanidin B2-3-O-gallat eine sekundäre Rolle zu spielen. Im Testsystem wurden Koronararterien mit einem Innendurchmesser von über 200 μm verwendet. Möglicherweise ist der EDHF-Signalweg bevorzugt am Relaxieren kleiner Koronararterien beteiligt, wie von Gefäßen mit einem Innendurchmesser von ca. 0,06-1,50 mm berichtet (Shimokawa et al., 1996).

4.2.2.3 Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies

Der Nachweis einer Polyphenol-induzierten Gefäßdilatation durch endotheliale ROS erfolgte an verschiedenen Gefäßtypen unterschiedlicher Spezies (Duarte et al., 2004, Sarr et al., 2006, Auger et al., 2010). Als ROS-Quellen sind unter anderem die NADPH-Oxidase, die Xanthinoxidase und die mitochondriale Atmungskette bekannt (vgl. Kapitel 1.2.2.2.5). Im Folgenden wurde die Beteiligung von ROS sowie zellulärer ROS-Lieferanten an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation überprüft.

ROS

Ndiaye et al. (2005) dokumentierten an Koronararterien des Schweins eine intrazelluläre ROS-abhängige Dilatation durch Rotweinpolyphenole. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Anwesenheit des unspezifischen ROS-Scavengers NAC sowie des spezifischen O_2^- -Scavengers Tiron kein vermindertes Relaxieren beobachtet (Abb. 23, Abb. 24). Folglich ist die Beteiligung von ROS an der Testsubstanz-induzierten Dilatation auszuschließen. Konträr dazu konnte ein Zusammenhang zwischen dem Relaxationsvermögen eines polyphenolhaltigen Extraktes und der ROS-Generierung nachgewiesen werden. Zurückzuführen war dies vor allem auf die 3-O-Galloylierung und deren Hydroxysubstituenten (Anselm et al., 2007, Auger et al., 2010, Tokoudagba et al., 2010). *Diospyros*-Proanthocyanidine und Procyanidin B2-3-O-gallat weisen gleichfalls das Strukturelement der Galloylierung auf. Weshalb die ROS-vermittelte Relaxation nicht stattfand, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht klären.

Superoxiddismutase

Die SOD ist ein Enzym, welches als zelluläres Entgiftungssystem fungiert, indem es O_2^- in H_2O_2 umwandelt. Der Zusatz des zellgängigen SOD-Mimetikums MnTMPyP verstärkt den Abbau von O_2^- . Ndiaye et al. (2003) dokumentierten in Gegenwart von MnTMPyP ein vermindertes Dilatationsvermögen von Rotweinpolyphenolen. Ähnliches konnte für *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie Procyanidin B2-3-O-gallat beobachtet werden (Abb. 27). Rückschließend scheinen endotheliale O_2^- am Dilatationsmechanismus beteiligt zu sein. Vergleichbar dazu konnten *in vitro* und *ex vivo* in Gegenwart des Flavan-3-ols Epigallocatechin-3-O-gallat und eines polyphenolhaltigen Traubenextraktes erhöhte ROS-Spiegel sowie ein Einfluss auf die Vasodilatation nachgewiesen werden (Madeira et al., 2008, Kurita et al., 2013).

Zelluläre ROS-Quellen: Xanthin- und NADPH-Oxidase, mitochondriale Atmungskette

Ursprungsquellen von O_2^- sind unter anderem die elektronenübertragenden Xanthin- sowie NADPH-Oxidasen und die mitochondriale Atmungskette (vgl. Kapitel 1.2.2.2.5). An Koronararterien des Schweins erfolgte in Gegenwart einer Kombination aus dem Xanthinoxidase-Hemmstoff Allopurinol und dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin ein vermindertes Relaxationsvermögen procyanidinhaltiger Fraktionen aus *Salix* spp. und *N. meyeri* (Kaufeld, 2015). In Bezug auf *Diospyros*-Proanthocyanidine und Procyanidin-3-O-gallat scheinen beide Enzyme keine Rolle zu spielen (Abb. 25). In Studien mit einem polyphenolhaltigen Extrakt aus Traubenschalen konnte die Beteiligung der Xanthin- und der NADPH-Oxidase gleichfalls ausgeschlossen werden (Madeira et al., 2008). Interessanterweise wurde in Anwesenheit des mitochondrialen Komplex I-Inhibitors Rotenon die Procyanidin B2-3-O-gallat-vermittelte Dilatation vermindert, die der *Diospyros*-Proanthocyanidine blieb hingegen unbeeinflusst (Abb. 26). Folglich induziert lediglich Procyanidin-3-O-gallat eine ROS-Generierung über die Atmungskette.

Fazit

Mittels Organbadstudien erfolgte der Nachweis der Beteiligung von O_2^- an der endothelvermittelten Dilatation durch *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie Procyanidin-B2-3-O-gallat. Als intrazelluläre ROS-Quelle konnte für Procyanidin B2-3-O-gallat die mitochondriale Atmungskette identifiziert werden. Für die Fraktion aus *D. kaki* ist die Xanthin- und NADPH-Oxidase sowie die Atmungskette als ROS-Lieferant auszuschließen. Die Beteiligung von endothelialen O_2^- an der Testsubstanz-induzierten Vasorelaxation ist in Abb. 52 dargestellt.

4.2.2.4 Beteiligung von Redox-sensitiven Kinasen

Zell- und Organbadstudien belegen eine Redox-sensitive Aktivierung von Zielproteinen wie z.B. der Akt und/oder der p38-MAPK durch polyphenolhaltige Extrakte aus Rotwein, Apfelbeeren sowie Erdbeeren (Ndiaye et al., 2005, Edirisinghe et al., 2008, Hun Kim et al., 2014). In Gegenwart des PI3K-Inhibitors Wortmannin konnte eine PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt durch einen polyphenolhaltigen Traubensaft unterbunden werden (Anselm et al., 2007). Auch die *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie Procyanidin B2-3-O-gallat zeigten ein vermindertes Relaxationsvermögen in Anwesenheit von Wortmannin (Abb. 28). Demzufolge scheint die Redox-sensitive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs an der Vasodilatation beteiligt zu sein. Für Polyphenole aus schwarzem Tee wurde neben der Aktivierung der PI3K/Akt die Stimulation der p38-MAPK belegt (Anter et al., 2004). Im Gegensatz dazu blieb die *Diospyros*-Proanthocyanidin- sowie Procyanidin-B2-3-O-gallat-vermittelte Relaxation in Anwesenheit des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 unbeeinflusst (Abb. 29). Folglich ist die Beteiligung der p38-MAPK auszuschließen. Ähnliches wurde in Endothelzellen der Rinderaorta in Gegenwart des Flavan-3-ols Epigallocatechin-3-O-gallat beobachtet. Während eine Stimulation der Akt nachgewiesen werden konnte, blieb die der p38-MAPK aus (Kim et al., 2007). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs und dem Strukturelement der Galloylierung, da sowohl *Diospyros*-Proanthocyanidine und Procyanidin-B2-3-O-gallat als auch Epigallocatechin-3-O-gallat dieses Merkmal aufweisen.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass an der endothelabhängigen Relaxation der *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie von Procyanidin-B2-3-O-gallat der Redox-sensitive PI3K/Akt-Signalweg beteiligt ist, nicht dagegen die p38-MAPK. Die Testsubstanz-induzierte Vasodilatation über den Redox-sensitiven PI3K/Akt-Signalweg ist in Abb. 52 dargestellt.

4.2.2.5 Beteiligung von Ca^{2+}

Eine endothelial erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ stimuliert zum einen die Bindung von Calmodulin an die eNOS, führt zum anderen zur gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit von K_{Ca} -Kanälen. Nachgeschaltet

induzieren der second messenger NO und/oder die erhöhte interzelluläre K^+ -Konzentration das glattmuskuläre Dilatieren (Carré et al., 2007). Im Gegensatz zur endothelial erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ liegt während des Relaxierens in der glatten Muskelzelle eine erniedrigte $[Ca^{2+}]_i$ vor (vgl. Kapitel 1.2.2.2.4).

SOCCs und IP_3 -Rezeptoren

Die Aktivierung ER-membranärer IP_3 -Rezeptoren führt zur Freisetzung von Ca^{2+} . Das Entleeren induziert wiederum ein Öffnen plasmamembranärer SOCCs, wodurch extrazelluläres Ca^{2+} einströmt (Lewis, 1999). Dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hemmstoff 2-APB kommt aufgrund der konzentrationsabhängigen Blockade zellulärer Strukturen eine besondere Rolle zu. Während ca. 10 μM hauptsächlich IP_3 -Rezeptoren blockieren, werden ab ca. 100 μM zusätzlich SOCCs inhibiert (Kukkonen et al., 2001).

Experimente mit einer Konzentration von 10 μM 2-APB belegen, dass der IP_3 -Rezeptor nicht am Relaxationsmechanismus der *Diospyros*-Proanthocyanidine beteiligt ist. Im Gegensatz dazu führte die Anwesenheit von 100 μM 2-APB zu einem verminderten Dilatationsvermögen (Abb. 38). Demzufolge scheinen *Diospyros*-Proanthocyanidine einen endothelialen Ca^{2+} -Einstrom über SOCCs zu induzieren. Unterstützend dazu belegten Duarte et al. und Martin et al. an Endothelzellen verschiedener Spezies erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ in Anwesenheit von Rotweinpolyphenolen (Martin et al., 2002, Duarte et al., 2004). Die Kombination von 2-APB (100 μM) mit L-NAME führte, wie die Inkubation mit L-NAME allein, zu einem verminderten Relaxationsvermögen. Beide waren jedoch nicht signifikant verschieden zueinander (Abb. 30, Abb. 38). Folglich scheint die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Stimulation der eNOS eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Neben der Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren und SOCCs führt eine endothelial erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ zu einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit von K_{ca} -Kanälen (Féletou, 2011). Dies ist für *Diospyros*-Proanthocyanidine auszuschließen, da in Gegenwart der Kombination aus 2-APB und CTX/Apamin kein verändertes Relaxationsvermögen vorlag (Abb. 38). Konträr dazu konnte ein gesteigertes Öffnen von K_{ca} -Kanälen durch Polyphenole aus Rotwein belegt werden (Ndiaye et al., 2003).

Ryanodin-Rezeptor

Die Aktivierung des RyR führt zu einem Ca^{2+} -Efflux aus dem ER/SR. In Zellkulturstudien wurde in Anwesenheit von Rotweinpolyphenolen eine erhöhte endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ nachgewiesen, nicht hingegen in Gegenwart des RyR-Antagonisten Ryanodin (Meissner, 1994, Martin et al., 2002). In den Inhibitionsexperimenten erfolgte unter Einfluss von Ryanodin eine nach links verschobene Konzentrations-Wirkungskurve der *Diospyros*-Proanthocyanidine (Abb. 40). Weshalb die Gefäßrelaxation in Anwesenheit des Antagonisten rascher erfolgt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht erklären.

Transient receptor potential channels und voltage operated Ca^{2+} channels

TRPV channels sind unter anderem auf der endothelialen und der glattmuskulären Zellmembran lokalisiert. Die Öffnung dieser Kanäle induziert über einen komplexen Mechanismus das Schließen

von VOCCS und initiiert letztlich das glattmuskuläre Dilatieren (vgl. Kapitel 1.2.2.2.3) (Clapham, 1995, Félétou, 2011). Rückschließend aus den Experimenten mit dem TRPV-Kanal-Inhibitor Rutheniumrot ist die Beteiligung des TRPV-Kanals an der Procyanidin-B2-3-O-gallat-induzierten Relaxation auszuschließen (Abb. 39). Demgegenüber konnte für das galloylierte Monomer Epigallocatechin-3-O-gallat eine Aktivierung des Kanals nachgewiesen werden (Guo et al., 2015).

In den Versuchen im Ca^{2+} -freien Medium zeigten Arterienringe, die mit *Diospyros*-Proanthocyanidinen (1-50 mg/mL) inkubiert wurden, kein verändertes Kontraktionsvermögen. Hintergrund war die Annahme, dass die Testsubstanz Einfluss auf die Öffnungswahrscheinlichkeit von VOCCs hat und durch den verminderten Ca^{2+} -Einstrom die Arteriensegmente weniger stark kontrahieren. Dieser Effekt kann für *Diospyros*-Proanthocyanidinen ausgeschlossen werden (Abb. 41). Konträr dazu konnte am Rattenmodell für das Phytoalexin Resveratrol eine antagonistische Wirkung auf VOCCs belegt werden (Hsia et al., 2011).

Ca^{2+} -Pumpe des sarko- und endoplasmatischen Retikulums

Das (Wieder-)Auffüllen des ER/SRs mit $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgt durch die SERCA. Diese trägt zum einen zur Beendigung der Kontraktion bei, unterbindet zum anderen spontane intra- und extrazelluläre Ca^{2+} -Einströme (Schatzmann, 1989). In den Inhibitionsstudien führte die Anwesenheit des SERCA-Inhibitors Thapsigargin zu einem verminderten Relaxationsvermögen der Testsubstanzen (Abb. 40). Die SERCA scheint essentiell für die *Diospyros*-Proanthocyanidin- sowie Procyanidin B2-3-O-gallat-vermittelte Vasodilatation zu sein. Infolge der Hemmung der ATPase akkumuliert intrazelluläres Ca^{2+} , wodurch die glatte Muskelzelle kontrahiert.

Fazit

Die Organbadstudien verdeutlichen die Bedeutung von Ca^{2+} im *Diospyros*-Proanthocyanidin- sowie Procyanidin B2-3-O-gallat-induzierten Relaxationsmechanismus. Eine erhöhte endotheliale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultiert vorwiegend über den SOCE-Signalweg. Die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären IP_3 - und Ryanodin-sensitiven- Ca^{2+} -Speichern sowie ein extrazellulärer Einstrom über TRPV-Kanäle und VOCCs scheint von sekundärer Bedeutung. Kein Zusammenhang konnte zwischen der erhöhten endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen eNOS-Aktivierung oder der Stimulation von K_{Ca} -Kanälen beobachtet werden. Die Beteiligung von SOCCs an der Testsubstanz-induzierten Vasorelaxation ist in Abb. 52 abgebildet.

4.2.2.6 Beteiligung der Na^+/K^+ -ATPase

Die Na^+/K^+ -ATPase ist auf der Zellmembran der glatten Muskelzelle lokalisiert. Die ATPase dient der Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gradienten von Na^+ und K^+ und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus (Pérez-Vizcaíno et al., 1999). An Koronararterien des Schweins wurde ein vermindertes Relaxationsvermögen eines

polyphenolhaltigen Traubensaftextraktes in Anwesenheit des Na⁺/K⁺-ATPase-Inhibitors Ouabain nachgewiesen (Anselm et al., 2007). Ähnliches konnte für *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie Procyanidin B2-3-*O*-gallat beobachtet werden (Abb. 37). Offenbar scheint die Na⁺/K⁺-ATPase an der vasorelaxierenden Signalkaskade beteiligt zu sein. Dies erschien zunächst kontrovers, da der EDHF-Signalweg, welcher zu einer erhöhten, extrazellulären K⁺-Konzentration und somit zur Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase führt, für die getesteten Substanzen ausgeschlossen wurde (vgl. Kapitel 4.2.2.2.1). Möglicherweise wird die Na⁺/K⁺-ATPase über NO stimuliert (Gupta et al., 1994). Die Beteiligung der Na⁺/K⁺-ATPase an der Testsubstanz-induzierten Vasorelaxation ist in Abb. 52 dargestellt.

4.2.2.7 Beteiligung des Estrogenrezeptors

Neben der Redox-sensitiven Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs (vgl. Kapitel 4.2.2.4) wurde für Resveratrol und Schwarztee-Polyphenole eine estrogenrezeptorabhängige Stimulation beschrieben (Anter et al., 2005, Klinge et al., 2005). Im Gegensatz dazu belegten die Inhibitionsstudien in Gegenwart des Estrogenrezeptor-Antagonisten ICI82,780 kein verändertes Relaxationsvermögen der *Diospyros*-Proanthocyanidine. Offenbar scheint der Estrogenrezeptor für die Vasorelaxation unbedeutend zu sein. Auch für das Dilatieren durch den polyphenolhaltigen *Crataegus* WS® 1442-Spezialextrakt wurde der Rezeptor ausgeschlossen (Anselm et al., 2009).

4.2.2.8 Beteiligung der Phosphodiesterase-3

In Muskelzellen führt die Blockade der PDE-3 zu einem verminderten Abbau von cAMP. Dies aktiviert die Proteinkinase A, welche die Myosin-Leichtketten-Kinase und die SERCA-Steuerungseinheit Phospholamban phosphoryliert und somit das Dilatieren der glatten Muskelzelle initiiert (Yan et al., 2007). Untersuchungen ergaben für das Flavan-3-ol Epigallocatechin-3-*O*-gallat die Hemmung verschiedener vaskulärer PDE-Isoformen (Álvarez et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigten *Diospyros*-Proanthocyanidine, welche gleichfalls das Strukturelement der Galloylierung aufweisen, in Anwesenheit des PDE-3-Hemmers Milrinon kein verändertes Dilatationsverhalten (Abb. 31). Somit ist die PDE-3 nicht an der Vasorelaxation beteiligt.

4.2.2.9 Beteiligung von gap junctions

Die Übertragung einer endothelialen Hyperpolarisation auf die glatte Muskelzelle erfolgt unter anderem über gap junctions. Dieser Mechanismus wurde vorrangig in kleinen Arterien nachgewiesen (Busse et al., 2002). Während Studien an der Mesenterialarterie der Ratte eine Rotweinpolyphenol-induzierte Relaxation über gap junctions belegen, sind diese an der Dilatation durch *Diospyros*-Proanthocyanidine nicht beteiligt (Dal-Ros et al., 2009) (Abb. 40). Demnach erfolgt die Gefäßdilatation nicht durch die Übertragung von second messengern wie Ca²⁺ und IP₃ (Isakson et al., 2007).

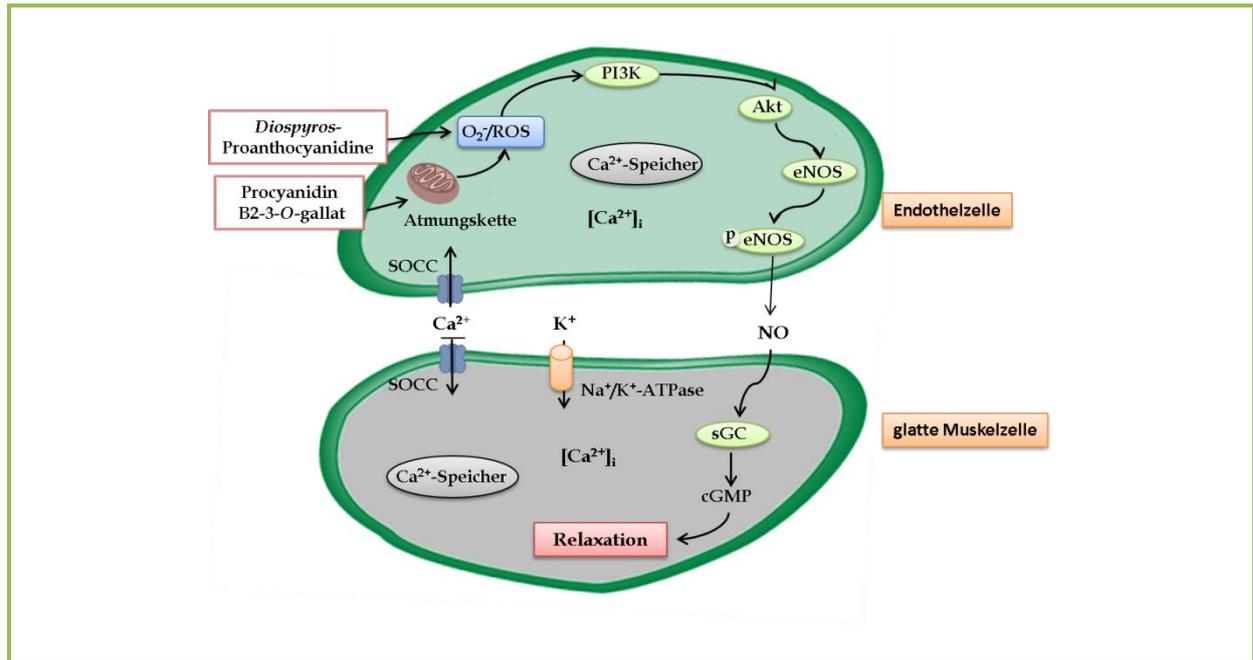


Abb. 52 Beteiligter Signalweg für *Diospyros*-Proanthocyanidine und Procyanidin B2-3-O-gallat

4.2.3 Charakterisierung der Signalkaskade(n) der endothelunabhängigen Vasodilatation

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehen zumeist mit einer eingeschränkten Funktionalität des Endothels einher. So sind gefäßregulierende Prozesse unter anderem zugunsten der Vasokonstriktion, der Thrombozytenaggregation, inflammatorischer Prozesse und der glatten Muskelzellproliferation verschoben (Lüscher und Noll, 1995, Bonetti et al., 2003). Diese Erkrankungen betreffen nicht nur ältere Menschen, sondern zunehmend Erwachsene im mittleren Lebensalter. Laut Statistiken gehören kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen (Aghamohammadzadeh et al., 2015). Folglich ist die Erforschung innovativer, medikamentöser Behandlungsansätze ein dringendes Anliegen. Zur Überprüfung der endothelunabhängigen Vasorelaxation durch *Diospyros*-Proanthocyanidine wurden Koronararterien verwendet, deren Endothel mechanisch entfernt wurde. Analog zu den Experimenten mit intaktem Endothel wurden die Arteriensegmente mit entferntem Endothel mit U46619 kontrahiert und mittels kumulativer Zugabe der Testsubstanz dilatiert. Entgegen dem spontanen, nahezu vollständigen Relaxieren mit intaktem Endothel (3-32 mg/mL) waren hierfür höhere Konzentrationen nötig (3-100 mg/mL) (Abb. 21, Abb. 43). Offenbar besteht ein Zusammenhang zwischen Testsubstanzkonzentration und endothelunabhängiger Dilatation. Ähnliches wurde für einen polyphenolhaltigen Extrakt aus *Cuphea carthagenensis* beobachtet. Im Vergleich zur endothelabhängigen Relaxation trat die endothelunabhängige erst in höheren Konzentrationen auf (Schuldt et al., 2000). Zur Aufklärung der beteiligten Signalkaskade(n) wurde entsprechend den Studien mit intaktem Endothel die

Arterienringe mit Inhibitoren bzw. Mimetika inkubiert, anschließend mit U46619 kontrahiert und durch kumulative Zugabe von *Diospyros*-Proanthocyanidinen relaxiert.

Einfluss von ROS, des K_v -Kanals sowie des β_2 -Adrenorezeptors

Weder die Anwesenheit des unspezifischen ROS-Scavengers NAC, des O_2 -Scavengers Tiron, des SOD-Mimetikums MnTMPyP noch des Inhibitors der mitochondrialen Atmungskette Rotenon rief ein verändertes Relaxationsvermögen der Testsubstanz hervor (Abb. 44). Dies ist konträr zu den Ergebnissen mit intaktem Endothel (Abb. 23, Abb. 24, Abb. 26, Abb. 27). Offenbar scheinen sowohl ROS als auch die Atmungskette als ROS-Lieferant keinen Einfluss auf das glattmuskuläre Relaxieren zu haben. Des Weiteren wurde die Beteiligung des K_v -Kanals überprüft. Studien belegten ein vermindertes Resveratrol-induziertes Dilatieren von Arterien mit entferntem Endothel in Anwesenheit des K_v -Kanal-Inhibitors 4-AP (Novakovic et al., 2006, Gojkovic-Bukarica et al., 2008). In analogen Experimenten zeigten *Diospyros*-Proanthocyanidine kein verändertes Relaxationsvermögen (Abb. 44). Ähnlich wie in Experimenten an Rattenaorten mit dem Flavonoid Pinocrembin ist die Beteiligung des K_v -Kanals an der Dilatation der glatten Muskelzelle auszuschließen (Zhu et al., 2007). Ein weiterer endothelunabhängiger Relaxationsmechanismus erfolgt über den Gs-gekoppelten β_2 -Adrenorezeptor. Dessen Stimulation führt zu einem erhöhten cAMP-Spiegel, wodurch glatte Muskelzellen dilatieren (vgl. Kapitel 4.2.2.8) (Peters und Michel, 2003). Literaturdaten belegen für das Isoflavon Genistein ein β -Adrenorezeptor-vermitteltes Relaxieren von Rattenaorten (Satake et al., 2000). Im Vergleich dazu konnte in Gegenwart des β_2 -Rezeptoragonisten Salbutamol kein verändertes Dilatationsvermögen der *Diospyros*-Proanthocyanidine beobachtet werden (Abb. 44). Folglich scheint der β_2 -Adrenorezeptor nicht am glattmuskulären Dilatieren beteiligt zu sein. Unterstützend dazu wurde der β_2 -Rezeptor für das Relaxieren von Rattenaorten ohne Endothel durch das Flavonoid Scutellarin gleichfalls ausgeschlossen (Pan et al., 2008).

Fazit

Die Experimente an Arterien mit entferntem Endothel belegen, dass *Diospyros*-Proanthocyanidine eine endothelunabhängige Dilatation hervorrufen. An der involvierten Signalkaskade sind weder ROS, der K_v -Kanal noch der β_2 -Adrenorezeptor beteiligt.

4.3 Vasoprotektives Potential polyphenolischer Substanzen

Sepsis ist eine systemische, vaskuläre Infektion, welche mit einer komplexen Entzündungsreaktion einhergeht. Toxine vaskulär zirkulierender Pathogene aktivieren unter anderem in Endothelzellen den Transkriptionsfaktor $NF_{\kappa}B$, welcher letztlich die Expression der iNOS induziert (vgl. Kapitel 1.2.3) (Wort und Evans, 1999). Die nachgeschaltete übermäßige Freisetzung von NO führt zu einem starken Blutdruckabfall und einem verminderten Ansprechen der Vaskulatur auf vasoaktive Substanzen (Lush und Kvietys, 2000). Im Rahmen der Immunantwort und/oder durch die Pathogene selbst kommt es zu mikrovaskulären Verletzungen bis zum Verlust der endothelialen Integrität. Trotz

breitgefächerter Behandlungsoptionen wie z.B. Antibiotika, Inotropika und Vasopressoren liegt die Sterblichkeitsrate bei einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock bei ca. 50 % (Nguyen et al., 2014). Dieser unzureichende Therapieerfolg zeigt die Notwendigkeit einer effektiven medikamentösen Therapie. Aussichtsreiches Potential scheint hierfür die Stoffklasse der Polyphenole aufzuweisen. Shapiro et al. (2009) fassen eine Reihe polyphenolischer Vertreter zusammen, denen präventives und therapeutisches Potential zur Behandlung einer Sepsis zugesprochen wurde (Shapiro et al., 2009). Beispielhaft sei das galloylierte Flavan-3-ol Epigallocatechin-3-O-gallat genannt. Behandelte Ratten zeigten eine signifikant reduzierte LPS-induzierte Hypotonie und eine gesteigerte Überlebensrate. Komplementierende *in vitro*-Experimente dokumentierten die Suppression der NF κ B-Aktivierung sowie der iNOS-Expression (Wheeler et al., 2007). Al-Shalmani et al. (2011) belegten anhand von Organbadstudien an LPS-inkubierten Koronararterien des Schweins die antiinflammatorischen Effekte von Quercetin und dessen Stoffwechselmetabolite. Ergänzende *in vitro*-Studien zeigten die Hemmung der LPS-induzierten iNOS-Expression sowie der posttranskriptionalen NO-Produktion. In Analogie wurde in der vorliegenden Arbeit das vasoprotektive Potential hochreiner, strukturell definierter Proanthocyanidinfraktionen überprüft. Exemplarisch wurden 2,3-*cis*-*Nelia*- und 2,3-*trans*-*Salix*-Procyanidine, *Diospyros*-Proanthocyanidine und der EPs[®] 7630 getestet. Letzterer ist ein Gemisch aus Prodelphinidinen, Procyanidinen und weiteren Inhaltsstoffen. In Ergänzung dazu wurde eine hochreine EPs[®] 7630-Fraktion überprüft, die überwiegend dimere Prodelphinidinen enthielt (Tab. 1). Des Weiteren erfolgte die Verwendung des Stilbens Piceatannol. Im Testmodell wurden isolierte Arterienringe ca. 16 Stunden mit LPS bzw. LPS und der Testsubstanz inkubiert und anschließend kumulativ kontrahiert. Durch die Inkubation mit der Testsubstanz allein wurde der Einfluss auf den kontraktilen Effekt ausgeschlossen (vgl. Kapitel 2.9.1.3).

4.3.1 Hemmung einer Lipopolysaccharid-induzierten, vaskulären iNOS-Expression durch proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen

Überprüfung des Testsystems

Im Vergleich zur Ktr (E_{max} : 117 %) wiesen die LPS-behandelten Arteriensegmente eine signifikant verminderte Kontraktilität auf (E_{max} : 91 %) (Abb. 45). Übereinstimmend dazu belegen Literaturdaten ein geringeres Zusammenziehen von Herzmuskelzellen in Anwesenheit von LPS. Der Zusatz des NOS-Inhibitors L-NAME sowie des Glukokortikoids Dexamethason inhibierte diesen Effekt (Brady et al., 1992). Vergleichbar dazu zeigten Arteriensegmente, die mit LPS und dem selektiven iNOS-Inhibitor 1400W (E_{max} : 107 %) ko-inkubiert wurden, ein signifikant stärkeres Kontrahieren als die mit LPS allein behandelten Arterienringe (E_{max} : 91 %) (Abb. 46). Rückschließend scheint das Endotoxin LPS die vaskuläre iNOS-Expression zu stimulieren (Boyle et al., 2000).

Inkubation von LPS mit verschiedenen Konzentrationen an EPs® 7630

Im Vergleich zu den LPS-behandelten Arteriensegmenten (E_{max} : 90 % und 76 %) konnte weder die Inkubation mit 3 mg/mL, 10 mg/mL oder 30 mg/mL EPs® 7630 (E_{max} : 70-86 %) oder der EPs® 7630-Fraktion (E_{max} : 83 %) die Kontraktilität wiederherstellen (E_{max} Ktr: 121 % und 103 %) (Abb. 47, Abb. 49). Folglich scheinen weder EPs® 7630 noch die EPs® 7630-Fraktion die vaskuläre iNOS-Expression zu hemmen. Demgegenüber konnte an Krebszellen die Blockade des iNOS-Induktors NF κ B nachgewiesen werden (Meyer et al., 2011). Interessanterweise verminderte die Anwesenheit von EPs® 7630 (30 mg/mL) allein den kontraktilen Effekt (E_{max} : 87 % vers. Ktr: 121 %) (Abb. 47). Dies warf zunächst Fragen auf, da anzunehmen war, dass der Extrakt selbst keinen Einfluss nimmt. Literaturdaten belegen an *Leishmanien*-infizierten Makrophagen einen erhöhten iNOS-mRNA-Spiegel in Gegenwart von EPs® 7630 (50 mg/mL) (Trun et al., 2006). Möglicherweise stimuliert der Extrakt die vaskuläre iNOS-Expression.

Inkubation von LPS mit proanthocyanidinhaltigen Fraktionen

Studien an LPS-stimulierten Makrophagen belegen eine Regulation der iNOS-bedingten NO-Produktion durch Procyanidin C1 (Byun et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit nahm weder die Inkubation von LPS mit 2,3-*cis-Nelia*- (E_{max} : 96 %) noch mit 2,3-*trans-Salix*-Procyanidinen (E_{max} : 99 %) einen signifikanten Einfluss auf die durch LPS-Inkubation verminderte Kontraktilität (E_{max} : 93 %) (Abb. 48). Ähnliches spiegelt sich in Anwesenheit der *Diospyros*-Proanthocyanidine wider. Im Vergleich zu den LPS-behandelten Ringen (E_{max} : 76 %) führte der ergänzende Zusatz der *Diospyros*-Proanthocyanidine zu keiner signifikant veränderten Kontraktilität (E_{max} : 79 %) (Abb. 49). Konträr dazu konnte in verschiedenen Geweben LPS-behandelter Ratten eine verminderte iNOS- und NO-Konzentration in Gegenwart eines procyanidinhaltigen Traubenkernextraktes nachgewiesen werden (Pallarès et al., 2013). Rückschließend scheinen die ausgewählten Testsubstanzen keinen inhibitorischen Charakter aufzuweisen.

Inkubation von LPS mit Piceatannol

Das Resveratrol-Analogon Piceatannol wird häufig mit der Inhibition der NF κ B-Aktivierung und einer reduzierten iNOS-Expression in Verbindung gebracht (Islam et al., 2004, Djoko et al., 2007). In den Organbadstudien konnte die LPS-induzierte, verminderte Kontraktilität (E_{max} : 79 %) durch die parallele Inkubation mit Piceatannol (E_{max} : 99 %) vollständig aufgehoben werden (E_{max} Ktr: 98 %) (Abb. 50). Folglich scheint das Stilben die LPS-induzierte iNOS-Synthese zu inhibieren. Unterstützend dazu belegen Zellkulturstudien eine NF κ B-Blockade in Gegenwart von Piceatannol (Ashikawa et al., 2002, Lee et al., 2009).

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Stilben Piceatannol die LPS-induzierte iNOS-Expression und die nachgeschaltete NO-Freisetzung inhibierte. Demgegenüber zeigten 2,3-*cis-Nelia*- und 2,3-*trans-Salix*-Procyanidine, *Diospyros*-Proanthocyanidine, der EPs® 7630 sowie die EPs® 7630-

Fraktion keinen Einfluss. Möglicherweise führt die Langzeitgabe zum gewünschten Hemmpotential. So zeigten LPS-behandelte Ratten, welchen zuvor sieben Tage das polyphenolische Phytoalexin Resveratrol verabreicht wurde, geringere inflammatorische Effekte als nach einmaliger Gabe (Sebai et al., 2009).

4.3.2 Protektive Wirkung proanthocyanidinhaltiger Extrakte/Fraktionen auf das Endothel

Während einer Sepsis oder einem septischen Schock bildet das Endothel eine Barriere für zirkulierende Pathogene und initiiert die Immunantwort (Peters et al., 2003). Schädigungen des Endothels treten zumeist durch den Erreger selbst und/oder das überschießende Immunsystem auf. Ein Kennzeichen ist z.B. die Veränderung von Zellstrukturen. Durch nekrotische und apoptotische Endothelzellen kommt es zur eingeschränkten Barrierefunktion. Des Weiteren liegt ein Ungleichgewicht der gefäßregulierenden Eigenschaften vor. Merkmale sind unter anderem Hypotonie und eine erhöhte Zelladhäsion (Aird, 2003). Die medikamentöse Behandlung umfasst die Gabe vasoaktiver und antimikrobieller Substanzen. Ein Mangel herrscht hingegen an Arzneistoffen, die eine endothelschützende Funktion ausüben (Nguyen et al., 2006). Gonzales et al. (2011) geben einen Überblick über polyphenolische Substanzen, die in verschiedenen Studiendesigns einen solchen Charakter aufwiesen. Beispielsweise blockierten Polyphenole aus Açaifrüchten und Trauben die NF κ B-Aktivierung in LPS-stimulierten Endothelzellen (Noratto et al., 2011). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der LPS-Inkubationsassay für die Untersuchung der endothelschützenden Eigenschaft von Proanthocyanidinen genutzt. So wurden die procyanidinreichen Fraktionen aus *Salix* spp., *N. meyeri* und *D. kaki*, der prodelphinidinreiche EPs[®] 7630, die EPs[®]-7630 Fraktion ausgewählt. Im Anschluss an die Überprüfung der Kontraktilität der LPS- bzw. LPS/Testsubstanz-behandelten Arteriensegmente (Kapitel 4.3.1) erfolgte ein endothelabhängiges Relaxieren durch Substanz P (10 nM) (vgl. 2.9.1.3).

Im Vergleich zur Ktr (Relaxation: 75-89 %) zeigten die LPS-inkubierten Arteriensegmente ein signifikant vermindertes Relaxieren (Relaxation: 29-65%) (Tab. 26, Abb. 57). Demzufolge beeinträchtigt LPS das endothelvermittelte Dilatieren durch Substanz P. Unterstützend dazu belegen Literaturquellen ein vermindertes Relaxieren LPS-inkubierter Koronararterien weiterer Spezies (Kessler et al., 1997). Substanz P induziert ein Relaxieren durch die Aktivierung der eNOS. LPS-behandelte Arterienringe zeigen eine Überproduktion von NO. Möglicherweise führt das gesteigerte Angebot von NO über einen negativen Feedbackmechanismus zur eingeschränkten eNOS-Aktivität (Vaziri und Wang, 1999). Die parallele Inkubation von LPS mit proanthocyanidinhaltigen Fraktionen/Extrakten hob das verminderte Relaxieren nicht auf (Relaxation: 2-33 %). Arterienringe, die lediglich mit der Testsubstanz inkubiert wurden, wiesen gleichfalls ein reduziertes Dilatieren auf (Relaxation: 32-39 %) (Tab. 25, Abb. 51). Rückschließend erfolgte kein Nachweis eines

endothelschützenden Effekts durch proanthocyanidinhaltige Fraktionen/Extrakte. Möglicherweise scheint, wie Kapitel 4.4.2 postuliert, die Dauer der Inkubation eine Rolle zu spielen.

4.4 Fazit und Ausblick

In deutschen Apotheken wurden 2012 ca. 114 Millionen Packungen an Phytopharmaka verkauft, was einem Anteil von rund 8 % an allen verkauften Arzneimitteln entspricht (Statistika, 2015). Wissenschaftliche Studien belegen einen Zusammenhang zwischen einer Influenza-Infektion und kardiovaskulären Erkrankungen. Laut Schätzungen des statistischen Bundesamtes zählen Letztere zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. In der vorliegenden Arbeit konnten das NA-inhibierende und das vasorelaxierende Potential von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen nachgewiesen werden.

Eine inhibitorische Aktivität gegenüber der *V. cholerae* und Influenzavirus A NA (N1) wiesen insbesondere fraktionierte Proanthocyanidine und einige Vertreter der Ellagitannine auf. Abgeleitete Struktur-Wirkungsbeziehungen verdeutlichen den Einfluss des Kondensationsgrades, des Hydroxylierungs-musters, der 3-O-Galloylierung und der 2,3-Stereochemie auf die Wirkstärke. Weiterhin wurde für eine Kombination aus Zanamivir und EPs® 7630 (1:10) ein synergistischer Hemmeffekt gegenüber der *V. cholerae* NA belegt. Die differierenden IC_{50} -Werte der NA-Inhibitoren Zanamivir und Oseltamivircarboxylat gegenüber beiden NAs begründen sich an den divergierenden Wechselwirkungen mit der jeweiligen Bindungstasche. Rückschließend aus den Ergebnissen wären ein denkbare therapeutisches Einsatzgebiet die Behandlung von primären Influenza-Infektionen sowie die Prävention vor Sekundärinfekten mit NA-exprimierenden Bakterien. Die positiven Ergebnisse bilden eine Grundlage für weiterführende *in vitro*- und *in vivo*-Studien, sodass zukünftig polyphenolische Substanzen selbst oder deren Kombination mit etablierten NA-Inhibitoren die bestehenden medikamentösen Therapieoptionen positiv ergänzen könnten.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte an Koronararterien des Schweins ein konzentrations-abhängiges, dilatierendes Potential von *Diospyros*-Proanthocyanidinen sowie Procyanidin B2-3-O-gallat nachgewiesen werden. Beide Testsubstanzen weisen das Strukturelement einer Galloylierung auf. Der vasorelaxierende Effekt wurde nahezu vollständig über integres Endothel ausgelöst, woran primär der NO/cGMP-Signalweg beteiligt war. Angesichts der vasorelaxierenden Eigenschaften könnten beide Proanthocyanidine in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt werden, die mit einer Vasokonstriktion einhergehen. In einer modifizierten Organbadstudie konnte die Hemmung einer LPS-induzierten, vaskulären iNOS-Expression sowie einer posttranslationalen NO-Produktion durch das Stilben Piceatannol belegt werden. So könnte Piceatannol selbst zur Behandlung einer sepsisbedingten Hypotonie verwendet werden oder als Leitstruktur für die Erforschung künftiger medikamentöser Behandlungsoptionen bei Sepsis dienen.

5 Zusammenfassung

Neuere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und bakteriellen/viralen Infektionen einschließlich der Influenza. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind häufig mit endothelialer Dysfunktion assoziiert und gehören zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. Infektionserreger initiieren und fördern chronische Entzündungsprozesse, welche Einfluss auf die Ätiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen nehmen. Epidemiologische und klinische Studien belegen bei einem regelmäßigen Verzehr polyphenolischer Nahrungsmittel eine gesundheitsfördernde Wirkung auf die Vaskulatur. Ferner besitzen zahlreiche Flavonoide und Proanthocyanidine antivirale und entzündungshemmende Eigenschaften.

Die vorliegende Studie betrachtete das antigrippale, vasorelaxierende und vasoprotektive Potential einer Reihe von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen und sollte einen Einblick in deren Wirkungsweise geben.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Hemmpotential der Testsubstanzen gegenüber einer bakteriellen (*V. cholerae*) und einer viralen Influenzavirus A (California/04/2009[H1N1]) Neuraminidase (NA) mittels eines 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetylneuraminsäure (MuNANA)-Fluoreszenz-Assays überprüft. Die Messdaten belegten, dass das Substrat MuNANA von beiden NAs umgesetzt wurde. Im Vergleich zu den Positivkontrollen Zanamivir und Oseltamivircarboxylat inhibierten proanthocyanidinreichen Fraktionen (*Salix* spp., *N. meyeri*, *Cephalophyllum* spp., *Betula* spp., *Potentilla erecta*, *Rhus leptodictya*, *Diospyros kaki*, *Pelargonium sidoides*) und Ellagitannine (Geraniin, Granatin A, Carpinusin, Terchebin, Casuariin, Vescalagin, Paeonianin C) die bakterielle NA signifikant effektiver. Im Gegensatz dazu hemmten alle polyphenolischen Substanzen die virale NA bei Weitem weniger als die NA-Referenzinhibitoren. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigten, dass der Polymerisationsgrad, die 2,3-Stereochemie, das Hydroxylierungsmuster und die 3-O-Galloylierung Einfluss auf die inhibitorische Aktivität der untersuchten Flavan-3-ole und Proanthocyanidine nehmen. In der Reihe der Ellagitannine ist der Grad der Galloylierung entscheidend. In Ergänzung dazu wurde ein synergistischer Hemmeffekt einer Zanamivir/EPs® 7630-Kombination (1:10) gegenüber der *V. cholerae* NA nachgewiesen.

Die computergestützte Analyse bestätigte die molekulare Verschiedenheit beider Enzyme. Die Auswertung der Röntgenstrukturdaten von Ko-Kristallisaten *V. cholerae* NA bzw. Influenzavirus A NA (N1) mit entweder Zanamivir oder Oseltamivircarboxylat ergab, dass beide NA-Inhibitoren das virale Enzym effektiver hemmen als die bakterielle NA. Dies begründet sich durch die Wechselwirkungen mit dem lediglich viral vorkommenden 150-loop.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mittels Organbadstudien das vasorelaxierende Potential überprüft. Koronararterienringe des Schweins wurden mit U46619 (Thromboxan A₂-Mimetikum) vorkontrahiert und durch die kumulative Zugabe polyphenolischer Testsubstanzen relaxiert. Das Augenmerk lag dabei auf galloylierten Verbindungen. In der Reihe der Flavan-3-ole und der chemisch definierten proanthocyanidinhaltigen Fraktionen induzierten galloylierte Substanzen eine konzentrationsabhängige Vasodilatation. Die mechanische Entfernung des Endothels unterband diesen Effekt. Die Experimente zeigten, dass *Diospyros*-Proanthocyanidine sowie Procyanidin-B2-3-O-gallat die Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B, die endotheliale NO-Synthase und die löslichen Guanylylcyclase stimulierten. Schlussfolgernd schienen die Testsubstanzen eine endothelabhängige Relaxation primär über den NO/cGMP-Signalweg zu induzieren. Ferner wurde die Beteiligung der Na⁺/K⁺-ATPase am Relaxationsmechanismus nachgewiesen.

Im Hinblick auf die Bedeutung der [Ca²⁺]_i an der endothelabhängigen Relaxation induzierten beide Proanthocyanidine einen extrazellulären Ca²⁺-Influx über Speicher-aktivierende Ca²⁺-Kanäle (SOCCs). Des Weiteren wurde die ROS-Produktion in Abhängigkeit von der Testsubstanz untersucht und für Procyanidin B2-3-O-gallat die mitochondriale Atmungskette als potentielle ROS-Quelle identifiziert.

In einer modifizierten Organbadstudie wurde das vasoprotektive Potential anhand einer Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten, vaskulären Beeinträchtigung überprüft, die mit einer Überproduktion an NO einherging. Während die proanthocyanidinhaltigen Substanzen keinen Einfluss auf die reduzierte Kontraktilität nahmen, steigerte die parallele Inkubation mit dem Stilben Piceatannol die Kontraktilität, vermutlich durch die Hemmung der vaskulären iNOS-Expression und der erhöhten, posttranskriptionalen NO-Freisetzung.

Zusammenfassend bekräftigen die durchgeführten Studien das antigrippale und vasorelaxierende Potential der Flavan-3-ole und der Proanthocyanidine.

6 Summary

Recent studies have demonstrated a correlation between cardiovascular diseases and bacterial/viral infections including influenza. Cardiovascular diseases are commonly associated with endothelial dysfunction and are the leading cause of death in Western industrialized countries. Infectious agents may initiate and promote a chronic inflammatory process with impact on the etiology of cardiovascular syndromes. Epidemiological and clinical evidences have suggested health-promoting effects of a regular consumption of polyphenol-rich food on the vascular system. Furthermore numerous flavonoids and proanthocyanidins have been shown to exert antiviral and anti-inflammatory activities.

The present study was undertaken to evaluate the anti-influenza, vasorelaxant and vasoprotective potential of a series of flavan-3-ols and proanthocyanidins and to gain insight into the mode of action.

The first part of this thesis addressed the inhibitory potential of the tested substances against a bacterial (*V. cholera*) and a viral influenza A (California/04/2009[H1N1]) neuraminidase (NA), using a 2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MuNANA)-fluorescence-based assay. The present study verified that the substrate MuNANA is recognized by both NAs. Compared to the positive controls zanamivir und oseltamivir carboxylic acid, the studied proanthocyanidin enriched fractions (*Salix* spp., *Nelia meyeri*, *Cephalophyllum* spp., *Betula* spp., *Potentilla erecta*, *Rhus leptodictya*, *Diospyros kaki*, *Pelargonium sidoides*) and ellagitannins (Geraniin, Granatin A, Carpinusin, Terchebin, Casuariin, Vescalagin, Paeonianin C) were significantly more effective against the bacterial NA. In contrast, all polyphenolic samples were far less effective inhibitors of the viral NA than the reference samples. Structure-activity relationships indicated that the degree of polymerization, the 2,3-stereochemistry, hydroxylation patterns and the presence of a 3-O-galloyl group largely affected the inhibitory potential of the tested flavan-3-ols and proanthocyanidins. The degree of galloylation appeared crucial in the series of ellagitannins. In addition, the combination of Zanamivir with EPs® 7630 (1:10) showed a synergistic inhibitory effect in studies against *V. cholerae* NA.

Computer-aided analysis revealed the molecular diversity of both enzymes. The evaluation of co-crystal data of the bacterial respectively viral NA and either Zanamivir or oseltamivir carboxylate showed that both drugs inhibit the viral enzyme more effectively than the bacterial NA. Due to the interactions with the only viral occurring 150-loop.

In the second part of this thesis the vasorelaxant potential was investigated using a tissue bath protocol. Porcine coronary arterial rings were pre-contracted with U46619 (thromboxane A2 mimetic) and relaxed by cumulative addition of the polyphenolic samples. Special attention was payed to galloylated substances. Within the series of flavan-3-ols and chemically defined proanthocyanidin-

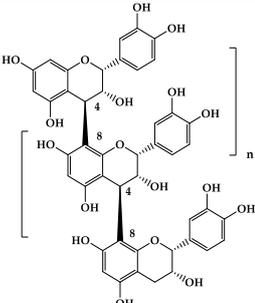
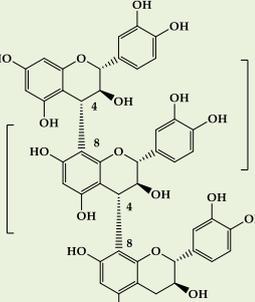
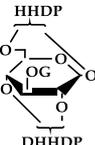
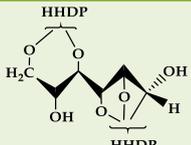
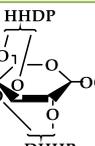
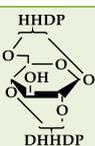
enriched fractions, galloylated compounds induced a concentration-dependent vasodilatation. Mechanical removal of the endothelium prevented this effect. The experiments showed that *Diospyros*-proanthocyanidins and procyanidin B2-3-*O*-gallate stimulated phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B, endothelial NO synthase, and soluble guanylyl cyclase, respectively. It is concluded that the samples evoked endothelium-dependent relaxations primarily via the NO/cGMP pathway. In addition, Na⁺/K⁺-ATPase was involved in the relaxant response to these polyphenols. With reference to the role of [Ca²⁺]_i in endothelium-dependent relaxation, both proanthocyanidin samples induced an extracellular Ca²⁺ influx through activated store-operated calcium channels (SOOCs). Intracellular ROS formation in response to the proanthocyanidin samples was verified and the mitochondrial respiratory chain identified as a potential source of reactive oxygen species for the procyanidin B2-3-*O*-gallate.

Using a modified tissue bath protocol, the vasoprotective potential against lipopolysaccharide (LPS)-induced adverse effects associated with excessive NO production was evaluated. While the proanthocyanidin samples did not affect reduced contractility, the simultaneous incubation with the stilben piceatannol increased the contractility, presumably by inhibiting vascular iNOS expression and increased post-transcriptional NO release.

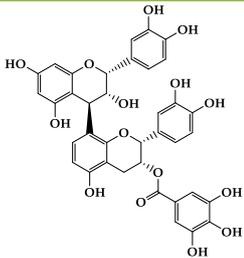
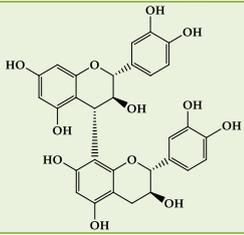
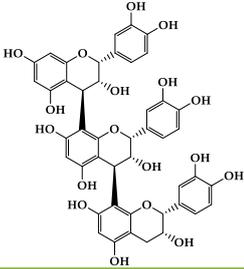
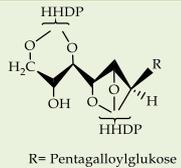
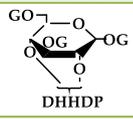
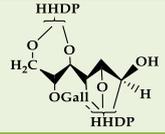
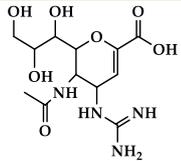
In summary, the studies confirm the reported anti-influenza and vasorelaxant potential of flavan-3-ols and proanthocyanidins.

7 Anhang

Tab. 26 Strukturformeln einiger wichtiger in der Arbeit verwendeter Strukturen

Bezeichnung	Strukturformel
<p>2,3-<i>cis</i> oligomere Procyanidine [4β,8]-verknüpfte Epicatechin-Bausteine</p>	
<p>2,3-<i>trans</i> oligomere Procyanidine [4α,8]-verknüpfte Catechin-Bausteine</p>	
<p>Carpinusin</p>	
<p>Casuariin</p>	
<p>Geraniin</p>	
<p>Granatin A</p>	

Bezeichnung				Strukturformel																																							
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Flavan-3-ole</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> <th>Konfiguration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>(+)-Catechin</td> <td>H</td> <td>H</td> <td rowspan="4">2<i>R</i>, 3<i>S</i></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>(+)-Gallocatechin</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>(+)-Catechin-3-<i>O</i>-gallat</td> <td>galloyl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>(+)-Gallocatechin-3-<i>O</i>-gallat</td> <td>galloyl</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>(-)-Epicatechin</td> <td>H</td> <td>H</td> <td rowspan="4">2<i>R</i>, 3<i>R</i></td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>(-)-Epigallocatechin</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>(-)-Epicatechin-3-<i>O</i>-gallat</td> <td>galloyl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>(-)-Epigallocatechin-3-<i>O</i>-</td> <td>galloyl</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table>				Flavan-3-ole		R ¹	R ²	Konfiguration	1	(+)-Catechin	H	H	2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>	2	(+)-Gallocatechin	H	OH	3	(+)-Catechin-3- <i>O</i> -gallat	galloyl	H	4	(+)-Gallocatechin-3- <i>O</i> -gallat	galloyl	OH	5	(-)-Epicatechin	H	H	2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>	6	(-)-Epigallocatechin	H	OH	7	(-)-Epicatechin-3- <i>O</i> -gallat	galloyl	H	8	(-)-Epigallocatechin-3- <i>O</i> -	galloyl	OH	<p>1-4</p> <p>5-8</p>
Flavan-3-ole		R ¹	R ²	Konfiguration																																							
1	(+)-Catechin	H	H	2 <i>R</i> , 3 <i>S</i>																																							
2	(+)-Gallocatechin	H	OH																																								
3	(+)-Catechin-3- <i>O</i> -gallat	galloyl	H																																								
4	(+)-Gallocatechin-3- <i>O</i> -gallat	galloyl	OH																																								
5	(-)-Epicatechin	H	H	2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>																																							
6	(-)-Epigallocatechin	H	OH																																								
7	(-)-Epicatechin-3- <i>O</i> -gallat	galloyl	H																																								
8	(-)-Epigallocatechin-3- <i>O</i> -	galloyl	OH																																								
Neu-5-Ac																																											
Neu-5-Ac-2-en																																											
Laninamivir																																											
Oseltamivircarboxylat																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Proanthocyanidine</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Procyanidine</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Prodelphinidine</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Profisetinidine</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>				Proanthocyanidine	R ¹	R ²	Procyanidine	OH	H	Prodelphinidine	OH	OH	Profisetinidine	H	H	<p>n</p>																											
Proanthocyanidine	R ¹	R ²																																									
Procyanidine	OH	H																																									
Prodelphinidine	OH	OH																																									
Profisetinidine	H	H																																									
Procyanidin B2 Epicatechin-[4β,8]-Epicatechin																																											

Bezeichnung	Strukturformel
Procyanidin B2-3-O-gallat Epicatechin-[4 β ,8]-Epicatechin-3-O-gallat	
Procyanidin B3 Catechin-[4 <i>a</i> ,8]-Catechin	
Procyanidin C1 Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin-[4 β -8]-Epicatechin	
Paeonianin C	 <p>R= Pentagalloylglukose</p>
Terchebin	
Vescalagin	
Zanamivir	

8 Literatur- und Abbildungsverzeichnis

8.1 Literaturverzeichnis

Abeywardena M., Runnie I., Nizar M. und Head R. (2002) Polyphenol-enriched extract of oil palm fronds (*Elaeis guineensis*) promotes vascular relaxation via endothelium-dependent mechanisms. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11: 467-472.

Adams P. D., Afonine P. V., Bunkóczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L., Kapral G. J. und Grosse-Kunstleve R. W. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66: 213-221.

Aghamohammadzadeh R., Ormandy D. und Heagerty A. M. Arterial Disorders. Ed. Barbari A und Mancina G. Cham: Springer, 2015, 1. Aufl. Kapitel 1: Definition and epidemiology of arterial disease. 12: 3.

Aird W. C. (2003) The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 101: 3765-3777.

Aktan F. (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75: 639-653.

Al-Shalmani S., Suri S., Hughes D., Kroon P., Needs P., Taylor M., Tribolo S. und Wilson V. (2011) Quercetin and its principal metabolites, but not myricetin, oppose lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of the porcine isolated coronary artery. *British Journal of Pharmacology*, 162: 1485-1497.

Álvarez E., Campos-Toimil M., Justiniano-Basaran H., Lugnier C. und Orallo F. (2006) Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*, 147: 269-280.

Amaro R. E., Minh D. D., Cheng L. S., Lindstrom W. M., Olson A. J., Lin J. H., Li W. W. und Mc Cammon J. A. (2007) Remarkable loop flexibility in avian influenza N1 and its implications for antiviral drug design. *Journal of the American Chemical Society*, 129: 7764-7765.

Anselm E., Chataigneau M., Ndiaye M., Chataigneau T. und Schini-Kerth V. B. (2007) Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovascular Research*, 73: 404-413.

Anselm E., Socorro V. F. M., Dal-Ros S., Schott C., Bronner C. und Schini-Kerth V. B. (2009) *Crataegus* special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 53: 253-260.

Anter E., Chen K., Shapira O. M., Karas R. H. und Keaney J. F. (2005) p38-mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor α -dependent pathway in response to black tea polyphenols. *Circulation Research*, 96: 1072-1078.

Anter E., Thomas S. R., Schulz E., Shapira O. M., Vita J. A. und Keaney J. F. (2004) Activation of endothelial nitric oxide synthase by the p38-MAPK in response to black tea polyphenols. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 46637-46643.

Aron P. M. und Kennedy J. A. (2008) Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52: 79-104.

Artaud Wild S. M., Connor S., Sexton G. und Connor W. (1993) Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. *Circulation*, 88: 2771-2779.

Arts I. C., Hollman P. C., Feskens E. J., De Mesquita H. B. und Kromhout D. (2001) Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen elderly study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 227-232.

- Ashikawa K., Majumdar S., Banerjee S., Bharti A. C., Shishodia S. und Aggarwal B. B. (2002) Piceatannol inhibits TNF-induced NF- κ B activation and NF- κ B-mediated gene expression through suppression of I κ B α kinase and p65 phosphorylation. *The Journal of Immunology*, 169: 6490-6497.
- Auger C., Kim J. H., Chabert P., Chaabi M., Anselm E., Lanciaux X., Lobstein A. und Schini-Kerth V. B. (2010) The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393: 162-167.
- Aviram M. und Fuhrman B. (1998) Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis*, 137: 45-50.
- Barnett J., Cadman A., Gor D., Dempsey M., Walters M., Candlin A., Tisdale M., Morley P., Owens I. und Fenton R. (2000) Zanamivir susceptibility monitoring and characterization of influenza virus clinical isolates obtained during phase II clinical efficacy studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 78-87.
- Berridge M. J., Bootman M. D. und Roderick H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 517-529.
- Bonetti P. O., Lerman L. O. und Lerman A. (2003) Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23: 168-175.
- Boyle W. A., Paroathaneni L. S., Bourlier V., Sauter C., Laubach V. E. und Cobb J. P. (2000) iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. *Circulation Research*, 87: 18-24.
- Brady A., Poole-Wilson P. A., Harding S. E. und Warren J. B. (1992) Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 263: 1963-1966.
- Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V. (2013) Der Arzneimittelmarkt in Deutschland in Zahlen. <https://www.bah-bonn.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=4089&token=3ec3eb2533e1c4c5ab6a42e783f0651d200c7e08>. 20.09.2015
- Burmeister W. P., Cusack S. und Ruigrok R. W. (1994) Calcium is needed for the thermostability of influenza B virus neuraminidase. *Journal of General Virology*, 75: 381-388.
- Busse R., Edwards G., Félétou M., Fleming I., Vanhoutte P. M. und Weston A. H. (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23: 374-380.
- Buxton R. C., Edwards B., Joo R. R., Voyta J. C., Tisdale M. und Bethell R. C. (2000) Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Analytical Biochemistry*, 280: 291-300.
- Byun E. B., Ishikawa T., Suyama A., Kono M., Nakashima S., Kanda T., Miyamoto T. und Matsui T. (2012) A procyanidin trimer, C1, promotes NO production in rat aortic endothelial cells via both hyperpolarization and PI3K/Akt pathways. *European Journal of Pharmacology*, 692: 52-60.
- Byun E. B., Korematsu S., Ishikawa T., Nishizuka T., Ohshima S., Kanda T. und Matsui T. (2012) Apple procyanidins induce hyperpolarization of rat aorta endothelial cells via activation of K⁺ channels. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23: 278-286.
- Cai H. und Harrison D. G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87: 840-844.
- Carré J., Singer M. und Moncada S. Ed. Vincent JL. Heidelberg: Springer, 2007, 1. Aufl. Kapitel 1: Nitric oxide. 453:77-95.
- Charyasriwong S., Watanabe K., Rahmasari R., Matsunaga A., Haruyama T. und Kobayashi N. (2015) *In vitro* evaluation of synergistic inhibitory effects of neuraminidase inhibitors and methylglyoxal against influenza virus infection. *Archives of Medical Research*, 46: 8-16.
- Chen C. C., Ke W. H., Ceng L. H., Hsieh C. W. und Wung B. S. (2010) Calcium- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by apigenin. *Life Sciences*, 87: 743-749.

- Chiva-Blanch G., Arranz S., Lamuela-Raventos R. M. und Estruch R. (2013) Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol and Alcoholism*, 48: 270-277.
- Chou T. (2006) Theoretical basis, experimental design and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58: 621-681.
- Chou T. und Talalay P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22: 27-55.
- Clapham D. E. (1995) Calcium signaling. *Cell*, 80: 259-268.
- Clifford M. N. und Scalbert A. (2000) Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1118-1125.
- Clifton P. M. (2004) Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects. *BioMed Research International*, 2004: 272-278.
- Colman P. M., Varghese J. N. und Laver W. G. (1983) Structure of the catalytic and antigenic sites in. *Nature*, 303: 41-44.
- Cook N. und Samman S. (1996) Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76.
- Corrales Medina V. F., Alvarez K. N., Weissfeld L. A., Angus D. C., Chirinos J. A., Chang C.-C. H., Newman A., Loehr L., Folsom A. R. und Elkind M. S. (2015) Association between hospitalization for pneumonia and subsequent risk of cardiovascular disease. *JAMA*, 313: 264-274.
- Corrales Medina V. F., Madjid M. und Musher D. M. (2010) Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *The Lancet Infectious Diseases*, 10: 83-92.
- Crennell S., Garman E., Laver G., Vimr E. und Taylor G. (1993) Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 9852-9856.
- Crennell S., Garman E., Laver G., Vimr E. und Taylor G. (1994) Crystal structure of *Vibrio cholerae* neuraminidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure*, 2: 535-544.
- Dal-Ros S., Bronner C., Schott C., Kane M. O., Chataigneau M., Schini-Kerth V. B. und Chataigneau T. (2009) Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in the rat mesenteric artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328: 478-486.
- Davignon J. und Ganz P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109: 27-32.
- De Bruyne T., Pieters L., Deelstra H. und Vlietinck A. (1999) Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 445-459.
- Dejana E. (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 261-270.
- DeLano W. L. (2002) The PyMOL molecular graphics system DeLans Scientific LLC, San Carlos, CA.
- Denninger J. W. und Marletta M. A. (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1411: 334-350.
- Derksen A., Hensel A., Hafezi W., Herrmann F., Schmidt T. J., Ehrhardt C., Ludwig S. und Kuhn J. (2014) 3-O-galloylated procyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of influenza A virus. *PLoS One*, 9: e110089.
- Dietz R. und Rauch B. (2003) http://www.dgpr.de/fileadmin/user_upload/DGPR/Leitlinien/LL_KHK_DGK.pdf. 28.08.2015

- Djoko B., Chiou R. Y., Shee J. J. und Liu Y. W. (2007) Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2376-2383.
- Droebner K., Ehrhardt C., Poetter A., Ludwig S. und Planz O. (2007) CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Research*, 76: 1-10.
- Duarte J., Andriambelason E., Diebolt M. und Andriantsitohaina R. (2004) Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiological Research*, 53: 595-602.
- Edirisinghe I., Burton-Freeman B., Varelis P. und Kappagoda T. (2008) Strawberry extract caused endothelium-dependent relaxation through the activation of PI3 kinase/Akt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9383-9390.
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G. und Cowtan K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66: 486-501.
- Engler M. B., Engler M. M., Chen C. Y., Malloy M. J., Browne A., Chiu E. Y., Kwak H. K., Milbury P., Paul S. M. und Blumberg J. (2004) Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 23: 197-204.
- Faraci F. M. und Didion S. P. (2004) Vascular protection superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24: 1367-1373.
- Féléto M. The endothelium: Part 1: multiple functions of the endothelial cells-focus on endothelium-derived vasoactive mediators. San Rafael, Morgan & Claypool Life Sciences Publisher; 2011: 293.
- Féléto M. und Vanhoutte P. (2009) EDHF: an update. *Clinical Science*, 117: 139-155.
- Fitzpatrick D. F., Bing B., Maggi D. A., Fleming R. C. und O' Malley R. M. (2002) Vasodilating procyanidins derived from grape seeds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957: 78-89.
- Fitzpatrick D. F., Hirschfield S. L. und Coffey R. G. (1993) Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 265: 774-778.
- Food and Drug Administration (2014) <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm427755.htm>. 22.12.2014
- Furchgott R. F. und Zawadzki J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376.
- Garland C. J., Plane F., Kemp B. K. und Cocks T. M. (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16: 23-30.
- Gaskell A., Crennell S. und Taylor G. (1995) The three domains of a bacterial sialidase: a β -propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. *Structure*, 3: 1197-1205.
- Glitsch H. G. (2001) Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiological Reviews*, 81: 1791-1826.
- Gojkovic-Bukarica L., Novakovic A., Kanjuh V., Bumbasirevic M., Lesic A. und Heinle H. (2008) A role of ion channels in the endothelium-independent relaxation of rat mesenteric artery induced by resveratrol. *Journal of Pharmacological Sciences*, 108: 124-130.
- Goldberg I. J., Mosca L., Piano M. R. und Fisher E. A. (2001) Wine and your heart a science advisory for healthcare professionals from the nutrition committee, council on epidemiology and prevention and council on cardiovascular nursing of the american heart association. *Circulation*, 103: 472-475.
- Graham H. N. (1992) Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21: 334-350.

- Griendling K. K., Sorescu D. und Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H oxidase role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 86: 494-501.
- Grienke U., Schmidtke M., von Grafenstein S., Kirchmair J., Liedl K. R. und Rollinger J. M. (2012) Influenza neuraminidase: a druggable target for natural products. *Natural Product Reports*, 29: 11-36.
- Guangxiang L., Jeffrey C. und Palese P. (1993) Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: deletions and insertions. *Virus Research*, 29: 141-153.
- Gubareva L., Kaiser L. und Hayden F. (2000) Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet*, 355: 827-835.
- Guo B. C., Wei J., Su K. H., Chiang A. N., Zhao J. F., Chen H. Y., Shyue S. K. und Lee T. S. (2015) Transient receptor potential vanilloid type 1 is vital for epigallocatechin-3-gallate mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59: 646-657.
- Gupta S., Mc Arthur C., Grady C. und Ruderman N. B. (1994) Stimulation of vascular Na⁺-K⁺-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 266: 2146-2151.
- Gut H., Xu G., Taylor G. L. und Walsh M. A. (2011) Structural basis for *Streptococcus pneumoniae* NanA inhibition by influenza antivirals zanamivir and oseltamivir carboxylate. *Journal of Molecular Biology*, 409: 496-503.
- Hahn J., Seeber F., Kolodziej H., Ignatius R., Laue M., Aebischer T. und Klotz C. (2013) High sensitivity of *Giardia duodenalis* to tetrahydrolipstatin (orlistat) *in vitro*. *PLoS One*, 8: e71597.
- Haidari M., Ali M., Casscells S. W. und Madjid M. (2009) Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, 16: 1127-1136.
- Hall W. L., Formanuk N. L., Harnpanich D., Cheung M., Talbot D., Chowienczyk P. J. und Sanders T. A. (2008) A meal enriched with soy isoflavones increases nitric oxide-mediated vasodilation in healthy postmenopausal women. *The Journal of Nutrition*, 138: 1288-1292.
- Hattori M., Kusumoto I. T., Namba T., Ishigami T. und Hara Y. (1990) Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 38: 717-720.
- Hayden F. G. (1986) Combinations of antiviral agents for treatment of influenza virus infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18: 177-183.
- He R. R., Wang M., Wang C. Z., Chen B. T., Lu C. N., Yao X. S., Chen J. X. und Kurihara H. (2011) Protective effect of apple polyphenols against stress-provoked influenza viral infection in restraint mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 3730-3737.
- Helper M., Koppensteiner H., Schneider M., Rebensburg S., Forcisi S., Müller C., Schmitt-Kopplin P., Schindler M. und Brack-Werner R. (2014) The root extract of the medicinal plant *Pelargonium sidoides* is a potent HIV-1 attachment inhibitor. *PLoS One*, 9: e87487.
- Heneghan C. J., Onakpoya I., Thompson M., Spencer E. A., Jones M. und Jefferson T. (2014) Zanamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *British Medical Journal*, 348: 1-16.
- Herrmann K. und Nagel C. W. (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 28: 315-347.
- Holmgren J., Lönnroth I., Månsson J. und Svennerholm L. (1975) Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72: 2520-2524.
- Holzer C. T., von Itzstein M., Jin B., Pegg M. S., Stewart W. P. und Wu W. Y. (1993) Inhibition of sialidases from viral, bacterial and mammalian sources by analogues of 2-deoxy-2,3-didehydro-N-acetylneuraminic acid modified at the C-4 position. *Glycoconjugate Journal*, 10: 40-44.
- Hooper L., Kroon P. A., Rimm E. B., Cohn J. S., Harvey I., Le Cornu K. A., Ryder J. J., Hall W. L. und Cassidy A. (2008) Flavonoids, flavonoid-rich foods and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88: 38-50.

- Hsia S. M., Wang K. L. und Wang P. S. (2011) Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on uterine contraction and Ca^{2+} mobilization in rats *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology*, 152: 2090-2099.
- Hun Kim J., Auger C. und Schini-Kerth V. B. (2014) Activation of eNOS by polyphenol-rich products and polyphenolic compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 20: 3521-3529.
- Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E. und Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 9265-9269.
- Isakson B. E., Ramos S. I. und Duling B. R. (2007) Ca^{2+} and inositol-1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction. *Circulation Research*, 100: 246-254.
- Islam S., Hassan F., Mu M. M., Ito H., Koide N., Mori I., Yoshida T. und Yokochi T. (2004) Piceatannol prevents lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and nuclear factor NF- κ B activation by inhibiting I κ B kinase. *Microbiology and Immunology*, 48: 729-736.
- Janecki A. (2012) Beitrag zur Kenntnis der Inhaltstoffe und der Wirkung des *Pelargonium sidoides* Spezialextraktes EPs® 7630. *Dissertationsschrift*, Freie Universität Berlin.
- Jefferson T., Jones M., Doshi P., Spencer E. A., Onakpoya I. und Heneghan C. J. (2014) Oseltamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments. *British Medical Journal*, 348: 1-18.
- Julkunen I., Melén K., Nyqvist M., Pirhonen J., Sareneva T. und Matikainen S. (2000) Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine*, 19: 32-37.
- Kamio N., Imai K., Shimizu K., Cueno M. E., Tamura M., Saito Y. und Ochiai K. (2015) Neuraminidase-producing oral mitis group streptococci potentially contribute to influenza viral infection and reduction in antiviral efficacy of zanamivir. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72: 357-366.
- Karima R., Matsumoto S., Higashi H. und Matsushima K. (1999) The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*, 5: 123-132.
- Karlsen A., Retterstøl L., Laake P., Paur I., Kjølrsrud-Bøhn S., Sandvik L. und Blomhoff R. (2007) Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *The Journal of Nutrition*, 137: 1951-1954.
- Kaufeld A. M. (2015) Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Procyanidin-induzierten Vasorelaxation an isolierten Arterien vom Schwein. *Dissertationsschrift*, Freie Universität Berlin.
- Kayser O. und Kolodziej H. (1995) Highly oxygenated coumarins from *Pelargonium sidoides*. *Phytochemistry*, 39: 1181-1185.
- Kessler P., Bauersachs J., Busse R. und Schini-Kerth V. B. (1997) Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 17: 1746-1755.
- Kim C. U., Lew W., Williams M. A., Liu H., Zhang L., Swaminathan S., Bischofberger N., Chen M. S., Mendel D. B. und Tai C. Y. (1997) Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *Journal of the American Chemical Society*, 119: 681-690.
- Kim J., Resende R., Wennkes T., Chen H., Bance N., Buchini S., Watts A., Pilling P., Streltsov V. und Petric M. (2013) Mechanism-based covalent neuraminidase inhibitors with broad-spectrum influenza antiviral activity. *Science*, 340: 71-75.
- Kim J. A., Formoso G., Li Y. H., Potenza M. A., Marasciulo F. L., Montagnani M. und 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. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 13736-13745.

- Kim S. H., Kang K. W., Kim K. W. und Kim N. D. (2000) Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sciences*, 67: 121-131.
- Kim Y., Narayanan S. und Chang K. O. (2010) Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research*, 88: 227-235.
- Klinge C. M., Blankenship K. A., Risinger K. E., Bhatnagar S., Noisin E. L., Sumanasekera W. K., Zhao L., Brey D. M. und Keynton R. S. (2005) Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors α and β in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 7460-7468.
- Ko W. C., Shih C. M., Lai Y. H., Chen J. H. und Huang H. L. (2004) Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, 68: 2087-2094.
- Kolodziej H. (1984) Occurrence of procyanidins in *Nelia meyeri*. *Phytochemistry*, 23: 1745-1752.
- Kolodziej H. (1989) Procyanidins from medicinal birch: bonding patterns and sequence of units in triflavanoids of mixed stereochemistry. *Phytochemistry*, 28: 3487-3492.
- Kolodziej H. (1990) Oligomeric flavan-3-ols from medicinal willow bark. *Phytochemistry*, 29: 955-960.
- Król E., Rychłowska M. und Szewczyk B. (2014) Antivirals-current trends in fighting influenza. *Acta Biochimica Polonica*, 61: 495-504.
- Krug M., Weiss M. S., Heinemann U. und Mueller U. (2012) XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *Journal of Applied Crystallography*, 45: 568-572.
- Kukkonen J., Lund P. und Åkerman K. (2001) 2-aminoethoxydiphenyl borate reveals heterogeneity in receptor-activated Ca^{2+} discharge and store-operated Ca^{2+} influx. *Cell Calcium*, 30: 117-129.
- Kurita I., Kim J., Auger C., Kinoshita Y., Miyase T., Ito T. und Schini-Kerth V. B. (2013) Hydroxylation of epigallocatechin-3-O-gallate at 3", but not 4", is essential for the PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in endothelial cells and relaxation of coronary artery rings. *Food & Function*, 4: 249-257.
- Kwan C. Y., Chen C. X., Deyama T. und Nishibe S. (2003) Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action. *Vascular Pharmacology*, 40: 229-235.
- Landete J. M. (2012) Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52: 936-948.
- Landry D. W. und Oliver J. A. (2001) The pathogenesis of vasodilatory shock. *New England Journal of Medicine*, 588-595.
- Lee B., Lee E. J., Kim D. I., Park S. K., Kim W. J. und Moon S. K. (2009) Inhibition of proliferation and migration by piceatannol in vascular smooth muscle cells. *Toxicology in Vitro*, 23: 1284-1291.
- Lewis R. S. (1999) Store-operated calcium channels. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, 33: 279-307.
- Lewis R. S. (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*, 446: 284-287.
- Li C., Fang J. S., Lian W. W., Pang X. C., Liu A. L. und Du G. H. (2015) *In vitro* antiviral effects and 3D QSAR study of resveratrol derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 neuraminidase. *Chemical Biology & Drug Design*, 85: 427-438.
- Li C., Leverage R., Trombley J. D., Xu S., Yang J., Tian Y., Reed J. D. und Hagerman A. E. (2010) High molecular weight persimmon (*Diospyros kaki* L.) proanthocyanidin: a highly galloylated, A-linked tannin with an unusual flavanol terminal unit, myricetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 9033-9042.
- Li Q., Qi J., Zhang W., Vavricka C. J., Shi Y., Wei J., Feng E., Shen J., Chen J., Liu D., He J., Yan J., Liu H., Jiang H., Teng M., Li X. und Gao G. F. (2010) The 2009 pandemic H1N1 neuraminidase N1 lacks the 150-cavity in its active site. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17: 1266-1268.

- Lin J. K., Liang Y. C. und Lin-Shiau S. Y. (1999) Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochemical Pharmacology*, 58: 911-915.
- Liu A. L., Wang H. D., Lee S. M., Wang Y. T. und Du G. H. (2008) Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their *in vitro* anti-viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 7141-7147.
- Lorenz M., Klinkner L., Baumann G., Stangl K. und Stangl V. (2015) Endothelial NO production is mandatory for epigallocatechin-3-gallate-induced vasodilation: results from eNOS knockout mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65: 607-610.
- Lorenz M., Wessler S., Follmann E., Michaelis W., Düsterhöft T., Baumann G., Stangl K. und 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. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 6190-6195.
- Lüscher T. F. und Noll G. (1995) The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*, 118: 81-90.
- Lush C. W. und Kvietys P. R. (2000) Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation*, 7: 83-101.
- Madeira S., Auger C., Anselm E., Chataigneau M., Chataigneau T., De Soares M. R. und Schini-Kerth V. B. (2008) eNOS activation induced by a polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries. *Journal of Vascular Research*, 46: 406-416.
- Madjid M., Naghavi M., Litovsky S. und Casscells S. W. (2003) Influenza and cardiovascular disease a new opportunity for prevention and the need for further studies. *Circulation*, 108: 2730-2736.
- Malaisree M., Rungrotmongkol T., Decha P., Intharathep P., Aruksakunwong O. und Hannongbua S. (2008) Understanding of known drug-target interactions in the catalytic pocket of neuraminidase subtype N1. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 71: 1908-1918.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. und Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.
- Marletta M. A. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-930.
- Martin S., Andriambelason E., Takeda K. und Andriantsitohaina R. (2002) Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology*, 135: 1579-1587.
- Masukawa K. M., Kollman P. A. und Kuntz I. D. (2003) Investigation of neuraminidase-substrate recognition using molecular dynamics and free energy calculations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 5628-5637.
- Matrosovich M. N., Matrosovich T. Y., Gray T., Roberts N. A. und Klenk H. D. (2004) Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology*, 78: 12665-12667.
- Matsui T., Korematsu S., Byun E. B., Nishizuka T., Ohshima S. und Kanda T. (2009) Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73: 2246-2251.
- Mc Cabe T. J., Fulton D., Roman L. J. und Sessa W. C. (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 6123-6128.
- Mc Coy A. J., Grosse-Kunstleve R. W., Storoni L. C. und Read R. J. (2005) Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61: 458-464.
- Meissner G. (1994) Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annual Review of Physiology*, 56: 485-508.

- Melzig M. F. und Loose R. (1998) Inhibition of lipopolysaccharide-induced endothelial cytotoxicity by selected flavonoids. *Planta Medica*, 64: 397-399.
- Meyer C., Pries R. und Wollenberg B. (2011) Established and novel NF- κ B inhibitors lead to downregulation of TLR3 and the proliferation and cytokine secretion in HNSCC. *Oral Oncology*, 47: 818-826.
- Minond D., Saldanha S. A., Subramaniam P., Spaargaren M., Spicer T., Fotsing J. R., Weide T., Fokin V. V., Sharpless K. B. und Galleni M. (2009) Inhibitors of VIM-2 by screening pharmacologically active and click-chemistry compound libraries. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17: 5027-5037.
- Morrison D. und Ulevitch R. (1978) The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *The American Journal of Pathology*, 93: 526-618.
- Moustafa I., Connaris H., Taylor M., Zaitsev V., Wilson J. C., Kiefel M. J., von Itzstein M. und Taylor G. (2004) Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 40819-40826.
- Mullard A. (2014) 2013 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13: 85-89.
- Müller P. und Downard K. M. (2015) Catechin inhibition of influenza neuraminidase and its molecular basis with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 111: 222-230.
- Mushtaq M. und Wani S. (2013) Polyphenols and human health - A review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4: 338-360.
- Nagaoka T., Hein T. W., Yoshida A. und Kuo L. (2007) Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and potassium channels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48: 4232-4239.
- Naghavi M., Wyde P., Litovsky S., Madjid M., Akhtar A., Naguib S., Siadaty M. S., Sanati S. und Casscells W. (2003) Influenza infection exerts prominent inflammatory and thrombotic effects on the atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 107: 762-768.
- Ndiaye M., Chataigneau M., Lobysheva I., Chataigneau T. und Schini-Kerth V. B. (2005) Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *The FASEB Journal*, 19: 455-457.
- Ndiaye M., Chataigneau T., Andriantsitohaina R., Stoclet J. C. und Schini-Kerth V. B. (2003) Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310: 371-377.
- Nelson M. T., Patlak J. B., Worley J. F. und Standen N. B. (1990) Calcium channels, potassium channels and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 259: 3-18.
- Nelson M. T. und Quayle J. M. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 268: 799-822.
- Nguyen H. B., Rivers E. P., Abrahamian F. M., Moran G. J., Abraham E., Trzeciak S., Huang D. T., Osborn T., Stevens D. und Talan D. A. (2006) Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Annals of Emergency Medicine*, 48: 28-54.
- Nguyen T. T. H., Kang H. K., Kim Y. M., Jang T. S. und Kim D. (2014) Inhibition effect of flavonoid compounds against neuraminidase expressed in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19: 70-75.
- Noratto G. D., Angel-Morales G., Talcott S. T. und Mertens-Talcott S. U. (2011) Polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and red muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) protect human umbilical vascular endothelial cells from glucose- and lipopolysaccharide-induced inflammation and target microRNA-126. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 7999-8012.
- Novakovic A., Gojkovic-Bukarica L., Peric M., Nezic D., Djukanovic B., Markovic-Lipkovski J. und Heinle H. (2006) The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery. *Journal of Pharmacological Sciences*, 101: 85-90.

- Öhman R., Rosenberg A. und Svennerholm L. (1970) Human brain sialidase. *Biochemistry*, 9: 3774-3782.
- Okuda T., Yoshida T., Hatano T. und Ito H. (2009) Ellagitannins renewed the concept of tannins. *Chemistry and Biology of Ellagitannins*, 122: 1-54.
- Pallarès V., Fernández-Iglesias A., Cedó L., Castell-Auó A., Pinent M., Ardévol A., Salvadó M. J., Garcia-Valloé S. und Blay M. (2013) Grape seed procyanidin extract reduces the endotoxic effects induced by lipopolysaccharide in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 60: 107-114.
- Palmer R. M., Ferrige A. G. und Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.
- Pan Z., Feng T., Shan L., Cai B., Chu W., Niu H., Lu Y. und Yang B. (2008) Scutellarin-induced endothelium-independent relaxation in rat aorta. *Phytotherapy Research*, 22: 1428-1433.
- Pérez-Vizcaíno F., Cogolludo A. und Tamargo J. (1999) Modulation of arterial Na⁺-K⁺-ATPase-induced [Ca²⁺]_i reduction and relaxation by norepinephrine, ET-1 and PMA. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 276: 651-657.
- Peters K., Unger R. E., Brunner J. und Kirkpatrick C. J. (2003) Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Research*, 60: 49-57.
- Peters S. L. und Michel M. C. (2003) cAMP-independent relaxation of smooth muscle cells via Gs-coupled receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 368: 329-330.
- Pohl U. und Busse R. (1990) Endothelium-dependent modulation of vascular tone and platelet function. *European Heart Journal*, 11: 35-42.
- Potier M., Mameli L., Belisle M., Dallaire L. und Melancon S. (1979) Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminic) substrate. *Analytical Biochemistry*, 94: 287-296.
- Prakriya M. und Lewis R. S. (2002) Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation channels. *The Journal of General Physiology*, 119: 487-508.
- Pugsley M. und Tabrizchi R. (2000) The vascular system: an overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44: 333-340.
- Quistgaard E. M. und Thirup S. S. (2009) Sequence and structural analysis of the Asp-box motif and Asp-box beta-propellers; a widespread propeller-type characteristic of the Vps10 domain family and several glycoside hydrolase families. *BMC Structural Biology*, 9: 1-18.
- Raetz C. R. und Whitfield C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 635-700.
- Rahman I., Biswas S. K. und Kirkham P. A. (2006) Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72: 1439-1452.
- Rakers C., Schwerdtfeger S. M., Mortier J., Duwe S., Wolff T., Wolber G. und Melzig M. F. (2014) Inhibitory potency of flavonoid derivatives on influenza virus neuraminidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24: 4312-4317.
- Rasmussen S. E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K. und Poulsen L. (2005) Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49: 159-174.
- Ray P. und Simmons R. (1972) Comparative effect of viral and bacterial neuraminidase on the complement sensitivity of lymphoid cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 10: 139-150.
- Reinhart K., Brunkhorst F. M., Bone H. G., Bardutzky J., Dempfle C. E., Forst H., Gastmeier P., Gerlach H., Gründling M., John S., Kern W., Kreymann G., Krüger W., Kujath P., Marggraf G., Martin J., Mayer K., Meier-Hellmann A., Oppert M., Putensen C., Quintel M., Ragaller M., Rossaint R., Seifert H., Spies C., Stüber F., Weiler N., Weimann A., Werdan K. und Welte T. (2010) Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 47: 185-207.

- Renaud S. und De Lorgeril M. (1992) Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339: 1523-1526.
- Rice P., Longden I. und Bleasby A. (2000) EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends in Genetics*, 16: 276-277.
- Ryu Y. B., Curtis-Long M. J., Lee J. W., Ryu H. W., Kim J. Y., Lee W. S. und Park K. H. (2009) Structural characteristics of flavanones and flavones from *Cudrania tricuspidata* for neuraminidase inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19: 4912-4915.
- Sarr M., Chataigneau M., Martins S., Schott C., El Bedoui J., Oak M. H., Muller B., Chataigneau T. und Schini-Kerth V. B. (2006) Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovascular Research*, 71: 794-802.
- Satake N., Imanishi M., Keto Y., Yamada H., Ishikawa M. und Shibata S. (2000) Genistein potentiates the relaxation induced by β 1- and β 2-adrenoceptor activation in rat aortic rings. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35: 227-233.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. und Jiménez L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287-306.
- Schatzmann H. (1989) The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. *Annual Review of Physiology*, 51: 473-485.
- Schenkman S., Eichinger D., Pereira M. und Nussenzweig V. (1994) Structural and functional properties of *Trypanosoma trans-sialidase*. *Annual Reviews in Microbiology*, 48: 499-523.
- Schewe T., Steffen Y. und Sies H. (2008) How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 102-106.
- Schini-Kerth V. B., Auger C., Kim J. H., Étienne-Selloum N. und Chataigneau T. (2010) Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 459: 853-862.
- Schini-Kerth V. B., Étienne-Selloum N., Chataigneau T. und Auger C. (2011) Vascular protection by natural product-derived polyphenols: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Planta Medica*, 77: 1161-1167.
- Schleep S., Friedrich H. und Kolodziej H. (1986) The first natural procyanidin with a 3,4-*cis* configuration. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 392-393.
- Schlegel N., Leweke R., Meir M., Germer C. T. und Waschke J. (2012) Role of NF- κ B activation in LPS-induced endothelial barrier breakdown. *Histochemistry and Cell Biology*, 138: 627-641.
- Schötz K. und Nöldner M. (2007) Mass spectroscopic characterisation of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of *Pelargonium sidoides* roots (EPs® 7630) and pharmacological screening in CNS models. *Phytomedicine*, 14: 32-39.
- Schuldt E. Z., Ckless K., Simas M. E., Farias M. R. und Ribeiro-Do-Valle R. M. (2000) Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 35: 234-239.
- Schumann R. R., Flaggs G., Gray P., Wright S., Mathison J., Tobias P. und Ulevitch R. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, 249: 1429-1431.
- Sebai H., Ben-Attia M., Sani M., Aouani E. und Ghanem-Boughanmi N. (2009) Protective effect of resveratrol in endotoxemia-induced acute phase response in rats. *Archives of Toxicology*, 83: 335-340.
- Shapiro H., Lev S., Cohen J. und Singer P. (2009) Polyphenols in the prevention and treatment of sepsis syndromes: rationale and pre-clinical evidence. *Nutrition*, 25: 981-997.
- Shen S. C., Lee W. R., Lin H. Y., Huang H. C., Ko C. H., Yang L. L. und Chen Y. C. (2002) *In vitro* and *in vivo* inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*, 446: 187-194.

- Shimokawa H., Yasutake H., Fujii K., Owada M. K., Nakaike R., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nagao T., Egashira K. und Fujishima M. (1996) The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 28: 703-711.
- Siegel G., Malmsten M., Klüßendorf D., Walter A., Schnalke F. und Kauschmann A. (1996) Blood-flow sensing by anionic biopolymers. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 57: 207-213.
- Sies H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91: 31-38.
- Silverthorn D. U. und Weber W. M. Physiologie. Ed. Cummings B. München: Pearson Deutschland GmbH, 2009, 4. Aufl. Kapitel 12: Muskulatur. 1408-598.
- Simon B. C., Noll B. und Maisch B. (1999) Endotheliale Dysfunktion - eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz*, 24: 62-71.
- Smith P., Starkey I., Howes P., Sollis S., Keeling S., Cherry P., von Itzstein M., Wu W. und Jin B. (1996) Synthesis and influenza virus sialidase inhibitory activity of analogues of 4-guanidino-Neu5Ac2en (GG167) with modified 5-substituents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 31: 143-150.
- Sobey C. G. (2001) Potassium channel function in vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21: 28-38.
- Söhl G. und Willecke K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, 62: 228-232.
- Soong G., Muir A., Gomez M. I., Waks J., Reddy B., Planet P., Singh P. K., Kanetko Y., Wolfgang M. C. und Hsiao Y. S. (2006) Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *The Journal of Clinical Investigation*, 116: 2297-2305.
- Statistika (2015) <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/271009/umfrage/absatz-von-phytopharmaka-in-deutschen-apotheken/>. 06.07.2015
- Sugaya N. (2011) Widespread use of neuraminidase inhibitors in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17: 595-601.
- Sumpio B. E., Riley J. T. und Dardik A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34: 1508-1512.
- Taniyama Y. und Griendling K. K. (2003) Reactive oxygen species in the vasculature molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*, 42: 1075-1081.
- Tasdemir D., Lack G., Brun R., Rüedi P., Scapozza L. und Perozzo R. (2006) Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ and FabI as drug targets for flavonoids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 3345-3353.
- Taylor G. (1996) Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Current Opinion in Structural Biology*, 6: 830-837.
- Taylor N. R. und von Itzstein M. (1994) Molecular modeling studies on ligand binding to sialidase from influenza virus and the mechanism of catalysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 37: 616-624.
- Theisen L. L., Erdelmeier C. A., Spoden G. A., Boukhallouk F., Sausy A., Florin L. und Muller C. P. (2014) Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. *PLoS One*, 9: e88062.
- Theisen L. L. und Muller C. P. (2012) EPs® 7630 (Umckaloabo®), an extract from *Pelargonium sidoides* roots, exerts anti-influenza virus activity *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research*, 94: 147-156.
- Toda M., Kawabata J. und Kasai T. (2000) α -Glucosidase inhibitors from clove (*Syzygium aromaticum*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 294-298.

- Tokoudagba J. M., Auger C., Bréant L., N' Gom S., Chabert P., Idris-Khodja N., Gbaguidi F., Gbenou J., Moudachirou M. und Lobstein A. (2010) Procyanidin-rich fractions from *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) leaves cause redox-sensitive endothelium-dependent relaxation involving NO and EDHF in porcine coronary artery. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 246-250.
- Touyz R. und Schiffrin E. (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*, 122: 339-352.
- Trun W., Kiderlen A. und Kolodziej H. (2006) Nitric oxide synthase and cytokines gene expression analyses in *Leishmania*-infected RAW 264.7 cells treated with an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630). *Phytomedicine*, 13: 570-575.
- Vanhoutte P. M. (2004) Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological Research*, 49: 503-508.
- Vanhoutte P. M. (2009) Endothelial dysfunction the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation Journal*, 73: 595-601.
- Varghese J., Lawer W. und Coleman P. (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*, 303: 35-40.
- Vavricka C. J., Li Q., Wu Y., Qi J., Wang M., Liu Y., Gao F., Liu J., Feng E. und He J. (2011) Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathogens*, 7: e1002249.
- Vaziri N. D. und Wang X. Q. (1999) cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension*, 34: 1237-1241.
- Viridis A., Ghiadoni L. und Taddei S. (2010) Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 459: 1015-1023.
- Viviers P., Kolodziej H., Young D., Ferreira D. und Roux D. (1983) Synthesis of condensed tannins. Part 11. Intramolecular enantiomerism of the constituent units of tannins from the anacardiaceae: stoichiometric control in direct synthesis: derivation of H nuclear magnetic resonance parameters applicable to higher oligomers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 527-533.
- von Grafenstein S., Wallnoefer H. G., Kirchmair J., Fuchs J. E., Huber R. G., Schmidtke M., Sauerbrei A., Rollinger J. M. und Liedl K. R. (2015) Interface dynamics explain assembly dependency of influenza neuraminidase catalytic activity. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33: 104-120.
- von Itzstein M., Wu W. Y., Kok G. B., Pegg M. S., Dyason J. C., Jin B., Van Phan T., Smythe M. L., White H. F. und Oliver S. W. (1993) Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature*, 363: 418-23.
- Wagner H. und Ulrich-Merzenich G. (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16: 97-110.
- Watzl R. (2001) Phenolsäuren. *Ernährungsumschau*, 48: 413-416.
- Webb R. C. (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, 27: 201-206.
- Wetherall N., Trivedi T., Zeller J., Hodges-Savola C., Mc Kimm-Breschkin J. L., Zambon M. und Hayden F. (2003) Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 742-750.
- Wheeler D. S., Lahni P. M., Hake P. W., Denenberg A. G., Wong H. R., Snead C., Catravas J. D. und Zingarelli B. (2007) The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate improves systemic hemodynamics and survival in rodent models of polymicrobial sepsis. *Shock*, 28: 353-359.
- Wolber G. und Langer T. (2005) LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45: 160-169.

- World Health Organization (1980) A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*, 58: 585-591.
- World Health Organization (2009) Clinical management of human infection with pandemic (H1N1) 2009: revised guidance. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical_management_h1n1.pdf. 19.08.2015
- World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance global report on surveillance. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/>. 18.09.2015
- World Health Organization (2015) <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-3-infectious-diseases-related-to-travel/influenza>. 06.07.2015
- Wort S. J. und Evans T. W. (1999) The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *British Medical Bulletin*, 55: 30-48.
- Wu Z. L., Ethen C., Hickey G. E. und Jiang W. (2009) Active 1918 pandemic flu viral neuraminidase has distinct N-glycan profile and is resistant to trypsin digestion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379: 749-753.
- Xu X., Zhu X., Dwek R., Stevens J. und Wilson I. (2008) Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. *Journal of Virology*, 82: 10493-10501.
- Yan C., Miller C. L. und Abe J. i. (2007) Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart. *Circulation Research*, 100: 489-501.
- Yen W., Cai B., Yang J., Zhang L., Zeng M., Tarbell J. M. und Fu B. M. (2015) Endothelial surface glycocalyx can regulate flow-induced nitric oxide production in microvessels *in vivo*. *PLoS One*, 10: e0117133.
- Yuan G. J., Gong Z. J., Sun X. M., Zheng S. H. und Li X. (2006) Tea polyphenols inhibit expressions of iNOS and TNF-alpha and prevent lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 5: 262-267.
- Yuk H. J., Ryu H. W., Jeong S. H., Curtis-Long M. J., Kim H. J., Wang Y., Song Y. H. und Park K. H. (2013) Profiling of neuraminidase inhibitory polyphenols from the seeds of *Paeonia lactiflora*. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 144-149.
- Zhu X. M., Fang L. H., Li Y. J. und Du G. H. (2007) Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. *Vascular Pharmacology*, 46: 160-165.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Beispiele für Phenolcarbonsäuren	2
Abb. 2 Beispiele für Flavan-3-ole.....	2
Abb. 3 Beispiele für Proanthocyanidine	3
Abb. 4 Beispiele für Verknüpfungen von D-Glukose mit (D)HHDP-Elementen	4
Abb. 5 Hydrolyse eines Sialinsäurerestes durch eine NA (Sialidase)	5
Abb. 6 Replikation des Influenzavirus A	6
Abb. 7 Beispiele für NA-Inhibitoren	7
Abb. 8 Überblick über die vasorelaxierenden Signalkaskaden	14
Abb. 9 Signalwege LPS-vermittelter iNOS-Expression.....	15
Abb. 10 NA-katalysierte Hydrolyse von MuNANA	42
Abb. 11 Inhibition der <i>V. cholerae</i> durch proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen	47
Abb. 12 Inhibition der <i>V. cholerae</i> NA durch Ellagitannine, Benzoesäurederivate und Flavan-3-ole.....	48
Abb. 13 Inhibition der Influenzavirus NA (N1) durch proanthocyanidinhaltige Extrakte/Fraktionen, ... Ellagitannine und Flavan-3-ole	49
Abb. 14 <i>fa-CI</i> -Diagramm der Zanamivir/EPs® 7630-Kombinationen	52
Abb. 15 <i>fa-CI</i> -Diagramm der 1:8 Zanamivir/2,6-Dihydroxybenzoesäure-Kombination	53
Abb. 16 links: doppelt-logarithmische Darstellung der 4-Methylumbelliferon-Konzentration gegen die rFU; rechts: Einfluss der Enzymkonzentration auf den MuNANA-Umsatz.....	55
Abb. 17 Effekt steigender MuNANA-Konzentrationen auf die Initialgeschwindigkeit des NA-..... katalysierten Umsatzes	55
Abb. 18 Kristallisationstropfen mit dem Ko-Kristallisat und den Kristallisationsbedingungen.....	56
Abb. 19 NA-Inhibitoren in der Bindungstasche der Influenzavirus A NA (N1) und der <i>V. cholerae</i> NA..	62
Abb. 20 Vasorelaxierender Effekt der Testsubstanzen	64
Abb. 21 Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaft der Testsubstanzen	64
Abb. 22 Relaxierender Effekt der Testsubstanzen an Arterien mit entferntem Endothel	65
Abb. 23 Beteiligung von ROS an der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation	66
Abb. 24 Beteiligung des O ₂ ⁻ an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation.....	66
Abb. 25 Beteiligung der Xanthin- und NADPH-Oxidase an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation...	66
Abb. 26 Beteiligung der Atmungskette an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation.....	67
Abb. 27 Beteiligung der SOD an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation.....	67
Abb. 28 Beteiligung des PI3/ Akt-Signalwegs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation.....	68
Abb. 29 Beteiligung der MAPK an der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation	68
Abb. 30 Beteiligung des NO/cGMP-Signalwegs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation.....	69
Abb. 31 Beteiligung der PDE an der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation.....	69

Abb. 32 Beteiligung des BK _{Ca} -Kanals an der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation.....	70
Abb. 33 Beteiligung des K _V -Kanals an der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation	70
Abb. 34 Beteiligung der K _{Ca} -Kanäle und der eNOS an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation	71
Abb. 35 Beteiligung der K _{Ca} -Kanäle und der eNOS an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation	71
Abb. 36 Beteiligung der gap junctions an der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation	72
Abb. 37 Beteiligung der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation	72
Abb. 38 Beteiligung des IP ₃ -Rezeptors und der SOCCs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation .	73
Abb. 39 Beteiligung des TRPV-Kanals an der Procyanidin-B2-3-O-gallat-vermittelten Relaxation	73
Abb. 40 Beteiligung der SERCA und des RyRs an der Testsubstanz-vermittelten Relaxation.....	74
Abb. 41 Kontraktiler Effekt nach der Inkubation mit <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidinen	74
Abb. 42 Beteiligung des Estrogenrezeptors an der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelten Relaxation	75
Abb. 43 Konzentrationsabhängige, relaxierende Eigenschaft der <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidine an..... Arterien mit mechanisch entferntem Endothel.....	76
Abb. 44 Endothelunabhängige <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidin-vermittelte Relaxation in An- und..... Abwesenheit von Inhibitoren bzw. Mimetika	77
Abb. 45 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS	78
Abb. 46 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und 1400W	79
Abb. 47 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und EPs® 7630.....	79
Abb. 48 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und 2,3- <i>cis-Nelia</i> - bzw. 2,3- <i>trans-Salix</i> - Procyanidinen.....	80
Abb. 49 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidinen..... bzw. der EPs® 7630-Fraktion.....	80
Abb. 50 Kontraktilität nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und Piceatannol.....	81
Abb. 51 Relaxationsvermögen nach ca. 16-stündiger Inkubation mit LPS und..... proanthocyanidinhaltigen Testsubstanzen	82
Abb. 52 Beteiligter Signalweg für <i>Diospyros</i> -Proanthocyanidine und Procyanidin B2-3-O-gallat	109

9 Danksagung

Von der ersten Idee bis zur fertigen Dissertationsschrift haben mich sehr liebgewonnene Menschen begleitet und unterstützt. Ich weiß ohne Euch hätte ich das nicht geschafft! Euch allen möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen. Ihr habt einen unsagbar wertvollen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Herbert Kolodziej. Zum einen für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die umfassende wissenschaftliche Betreuung und die konstruktive Kritik. Zum anderen für das nicht selbstverständliche persönliche Engagement und die vielseitige Unterstützung. Dies alles hat maßgeblich zum Entstehen dieser Dissertation beigetragen.

Teile dieser Doktorarbeit wären nicht möglich gewesen durch die Zusammenarbeit mit kompetenten Kooperationspartnern. Ich möchte Herrn Prof. Dr. Heinz H. Pertz für die Nutzung der Organbadanlagen und den wertvollen wissenschaftlichen Austausch danken. Dies betrifft auch Frau Dr. Schütz und das Team der Helmholtz Protein Sample Production Facility am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in Berlin-Buch.

Mein tiefer Dank gilt meinen ehemaligen Kommilitonen und späteren Mitdoktoranden Aurica-Maria Kaufeld und Martin Flemming. Eure fortwährende Ansprechbarkeit aber auch die Ideen, Anregungen und konstruktive Kritik bereicherten nicht nur meine Forschungstätigkeit. Ich bin froh, dass wir diesen Weg gemeinsam gemeistert haben! Zudem erinnere ich mich sehr gern an die Zeit mit den Doktoranden aus den Arbeitskreisen Melzig und Schäfer-Korting.

Neben dem Forschungsalltag erlebte ich schöne und abwechslungsreiche Stunden mit Frau Dr. Lazar-Schurreit bei der Durchführung der Lehrtätigkeit in der pharmazeutischen Biologie. Vielen Dank für ihre herzliche und liebevolle Art.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meinen lieben Freunden bedanken. Durch Euch rückte der anstrengende Laboralltag in den Hintergrund und in vielerlei Hinsicht seid ihr eine unschätzbare wertvolle Stütze gewesen. Vielen Dank Aurica & Sebastian, Madeleine & Daniel, Marlene & Michael sowie Lisa & Ansgar.

Ein sehr großer Dank gilt meiner Familie, die diesen außerordentlichen Lebensweg ermöglicht und mir auf manchem steinigem Abschnitt liebevollen Rückhalt und Unterstützung gegeben hat.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt wurde.

Berlin, den 05.10.15

Stefanie Jasmin Quosdorf