

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. P. Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Die Wirkung von Hydrolysaten aus Nahrungsproteinen
auf funktionelle Parameter von humanen
Aortenendothelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. Troph.)

vorgelegt von:

Diplom-Trophologin
Birgit Matthes

geboren am 14.01.1974
in Jena

Gutachter: Prof. Dr. habil K. Eder
PD. Dr. habil R. Ringseis
Prof. Dr. habil G. Stangl

Verteidigung am: 02.11.2009

Halle / Saale 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung und Zielstellung.....	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Material und Geräte.....	7
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	7
2.1.2 Zellen	11
2.1.3 Testkits.....	11
2.1.4 Puffer	11
2.1.5 Geräte	12
2.2 Methoden	14
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Screening nach biologisch aktiven Hydrolysaten	30
3.1.1 Einfluss von Hydrolysaten auf Proliferation und Viabilität der HAoEC.....	30
3.1.2 Einfluss von Hydrolysaten auf die Freisetzung vasoaktiver Substanzen.....	33
3.2 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf funktionelle Parameter der HAoEC	36
3.2.1 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die ACE-Aktivität	36
3.2.2 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Bildung von <i>second messengern</i>	37
3.2.3 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die NO-Freisetzung von TNF α -stimulierten HAoEC	40
3.2.4 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die mRNA-Expression von Endothelzellen	41
3.2.5 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle	45
3.2.6 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Monozytenadhäsion an HAoEC	47
3.2.7 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Translokation von p 50 und p 65 in den Zellkern	49
4 Diskussion	49
4.1.1 Einfluss von Hydrolysaten auf Proliferation und Viabilität der HAoEC.....	49
4.1.2 Einfluss von Hydrolysaten auf die Freisetzung vasoaktiver Substanzen.....	53

4.1.3	Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Bildung von <i>second messengern</i>	61
4.1.4	Adhäsionsmoleküle, Monozytenadhäsion und NF-κB	65
5	Schlussfolgerungen	69
6	Zusammenfassung	71
7	Summary	73
8	Literaturverzeichnis	75
A	Anhang	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: relative Proliferation und Viabilität von unstimulierten HAoEC nach 24h Behandlung mit Caseinhydrolysaten	31
Abbildung 2: relative Proliferation und Viabilität von unstimulierten HAoEC nach 24h Behandlung mit Sojahydrolysaten	32
Abbildung 3: Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die ACE-Aktivität von unstimulierten HAoEC.....	37
Abbildung 4: relative NO-Freisetzung (% der Kontrolle) von TNF α -stimulierten HAoEC nach 24h Inkubation mit C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD.....	40
Abbildung 5: relative mRNA-Expression (% der Kontrolle) von eNOS, COX-1 und COX-2 an unstimulierten HAoEC	41
Abbildung 6: relative mRNA-Expression (% der Kontrolle) von eNOS, COX-1 und COX-2 an TNF α -stimulierten HAoEC	42
Abbildung 7: relative mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle an unstimulierten HAoEC.....	43
Abbildung 8: relative mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle (% der Kontrolle) an TNF α -stimulierten HAoEC.....	44
Abbildung 9: relative Protein-Expression der Adhäsionsmoleküle an unstimulierten HAoEC.....	45
Abbildung 10: relative Protein-Expression der Adhäsionsmoleküle	46
Abbildung 11: relative Monozytenadhäsion der Zelllinie U 937 an unstimulierten HAoEC.....	47
Abbildung 12: relative Monozytenadhäsion der Zelllinie U 937 (% der Kontrolle) an TNF α -stimulierten HAoEC.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die im Rahmen der Arbeit eingesetzten Hydrolysate	25
Tabelle 2: Übersicht über die bei der PCR verwendeten Primer	35
Tabelle 3: Relative Konzentration vasoaktiver Substanzen je mg Zellprotein im Zellmedium der HAoEC nach Behandlung mit Hydrolysaten an unstimulierten Zellen	34
Tabelle 4: Relative Konzentration von Eicosanoiden je mg Zellprotein im Zellmedium der HAoEC nach Behandlung mit Hydrolysaten an unstimulierten Zellen	35
Tabelle 5: relative Translokation der NFκB-Untereinheiten p 50 und p 65 in den Zellkern von TNFα-stimulierten HAoEC	49
Tabelle A1: Grobcharakterisierung der Hydrolysate ohne Membranfraktionierung	49
Tabelle A2: Grobcharakterisierung der Hydrolysate mit Membranfraktionierung	49

Abkürzungsverzeichnis

5*TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer, 5fach-konzentriert
6-keto-PGF1 α	stabiler Metabolit von Prostazyklin
A. dest.	Aqua destillatum
AC	Adenylatzyklase
ACE	adenosine converting enzyme
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ANP	atriales natriuretisches Peptid (atrial natriuretic peptide)
Anti-CD106	VCAM-1 Antikörper
Anti-CD54	ICAM-1 Antikörper
Anti-mouse-IgG	anti-mouse-Immunglobulin G
AP-1	activator protein-1
ATF-2	Activating transcription factor-2
ATP	Adenosintriphosphat
B0,+	Aminosäuretransportsystem B0,+
BAEC	bovine Endothelzellen der Aorta (bovine aortic endothelial cell)
BAY 41-2272	Aktivator der löslichen Guanylatzyklase
BCECF-AM	2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)- carboxyfluorescein-Acetoxymethylester
bFGF	basic fibroblast growth factor
BH4	Tetrahydrobiopterin
BP	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Casein
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	copy bzw. complementary DNA
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
Ch	Chymotrypsin

COX	Cyclooxygenase
COXIBs	selektive COX-2-Hemmer
CPAE	calf pulmonal aortic endothelial cell
CRP	C-reaktives Protein (c-reactive protein)
Cryo-SFM	Serum-free medium for cryopreservation
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
E	Elastase
EA.hy 926	Endothelzelllinie
EC	Endothelzellen (endothelial cell)
ECE	Endothelin konvertierendes Enzym (endothelin converting enzyme)
ECG-MV-Medium	Endothelzellmedium
ECGS / H	Endothelzellmedium (Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NOS
ERK	Extracellular-signal Regulierte Kinasen
ET-1	Endothelin-1
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA	Transkriptionsfaktor
GC	Guanylatzyklase
HAoEC	humane Endothelzellen der Aorta (human aortic endothelial cells)
HBSS	Hank´s balanced salt solution
Hepes BSS	Hepes buffered salt solution
HSVEC	humane Endothelzellen der verborgenen Vene (human

	saphenous vein endothelial cell)
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cell)
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (intercellular adhesion molecule-1)
IL-1beta	Interleukin-1beta
iNOS	induzierbare NOS
IRF-1	interferon regulatory factor 1
IκBα	Inhibitorprotein κBα
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kD	kilo-Dalton
LDL	Lipoprotein mit niedriger Dichte (low density lipoprotein)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase (myosin light chain kinase)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
NADPH	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	nuclear factor- κB
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
ONOO-	Peroxynitrit
ONOOH	Peroxynitrosäure
P	Pepsin
p 38	p38 MAP-Kinase
p 50 / p 65	NF-κB Homodimere p 50 bzw. p 65
p70S6K	p70S6 Kinase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase

PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet derived growth factor)
PGE2	Prostaglandin E2
PGI ₂	Prostazyklin
PHAS-I	Anti-4E-binding protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
POD	Peroxidase
RAF-1	Signalprotein Raf-1 (MAPKinase Kinase Kinase)
rp-HPLC	reversed phase-high pressure liquid chromatography
rHu VEGF 165	rekombinanter humaner vaskularer endothelialer Wachstumsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPMI 1640	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SMC	Glatte Muskelzellen (smooth muscle cell)
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine
SP-1	specificity protein 1
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
T	Trypsin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNS	Trypsin-Neutralisierungslösung (trypsin neutralizing solution)
TRIS	Puffersubstanz (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan)
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB2	Thromboxan B2, stabiler Metabolit von TXA ₂
U 937	Monozytenzelllinie U 937
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (very low density lipoprotein)

1 Einleitung und Zielstellung

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, die von genetischer Disposition und einer Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren abhängig ist. Zugrundeliegend ist eine Erhöhung des Plasma-LDL-Cholesterins, dessen atherogene Wirkung durch arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Störungen der Gerinnung und Thrombozytenfunktion, sowie Nikotinabusus und Bewegungsmangel potenziert wird (Gerok *et. al.*, 2000). Sie ist eine der Hauptursachen für Erkrankungen und Sterblichkeit in den Industrieländern und zugrundeliegender Auslöser von Herzinfarkten, Schlaganfällen und peripheren Arterienerkrankungen (Lucas & Greaves, 2001).

Bei der Atherosklerose kommt es durch endotheliale Dysfunktionen zu pathologischen Veränderungen in den Gefäßwänden der Blutgefäße. Diese sind aus 3 Schichten aufgebaut. Die äußere Lamina adventitia besteht überwiegend aus Bindegewebe und beinhaltet die vegetativen Nervenfasern. Die Lamina media besteht aus glatter Muskulatur und elastischem Bindegewebe und wird durch die Elastica externa zur adventitia und durch die Elastica interna zur Lamina intima abgegrenzt. Die Lamina intima, die Innenauskleidung der Blutgefäße, besteht aus einem einschichtigen Endothel und dem angrenzenden Subendothelialraum. Durch seine Lage zwischen zellulären Blutbestandteilen und der glatten Gefäßmuskelschicht spielt das Endothel eine zentrale Rolle bei der Modulation des Gefäßtonus, der Thrombozytenaggregation, der Blutgerinnung und der Monozytenadhäsion. Diese werden durch die Bildung und Freisetzung von vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Substanzen reguliert (Gerok *et. al.*, 2000).

Die wichtigsten vasoaktiven Substanzen sind Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1 (ET-1) und die Prostaglandine Prostacyclin (PGI_2) und Thromboxan A₂ (TXA₂). Der Vasodilatator NO wird aus L-Arginin unter Bildung von L-Citrullin durch NO-Synthasen (NOS) gebildet. Die endotheliale NOS (eNOS) wird überwiegend in gesundem Gefäßendothel großer und mittelgroßer Arterien (Marsden *et. al.*, 1992) exprimiert. Die Freisetzung von NO durch Endothelzellen in den Blutgefäßen bewirkt cGMP-gekoppelt eine Inaktivierung von Blutplättchen (Ignarro, 1999) und die Relaxation von glatten Muskelzellen (SMC) (Moncada *et. al.*, 1991). Neben seiner Wirkung als Vasorelaxans hat NO auch einen inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation der

glatten Muskelzellen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Endothelin-Synthese (Toborek & Kaiser, 1999).

Das vasokonstriktorisches ET-1, der Gegenspieler von NO, wird über Zwischenstufen aus Prä-Proendothelin durch das Endothelin-konvertierende Enzym (ECE-1) freigesetzt (Toborek & Kaiser, 1999). Es bewirkt über den ET_A-Rezeptor der glatten Muskelzellen (SMC) eine Kontraktion der Blutgefäße.

Die Eicosanoide PGI₂ und der Gegenspieler TXA₂ kontrollieren den Blutfluß durch Beeinflussung der Aktivität der Blutplättchen und der glatten Muskelzellen. Aus Arachidonsäure werden durch Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) zunächst die Prostaglandine PGG₂ und PGH₂ gebildet. Die PGI₂-Synthase und die TXA₂-Synthase bilden in einem zweiten Schritt aus PGH₂ die Eicosanoide PGI₂ und TXA₂. PGI₂ bindet an G-Protein-gekoppelte Prostazyklin-Rezeptoren von Blutplättchen und glatten Muskelzellen und bewirkt über eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen AMP (cAMP) eine Hemmung der Gefäßkontraktion bzw. Inaktivierung von Blutplättchen. TXA₂ aktiviert die Thrombozytenaggregation über die Thromboxan-Rezeptoren der Thrombozyten und wirkt kontrahierend auf glatte Muskelzellen. Außerdem induziert es die Bildung von Adhäsionsmolekülen (Ishizuka *et. al.*, 1996) und damit die Umwandlung der endothelialen Oberfläche in ein vor-thrombotisches Stadium (Patrono & FitzGerald, 1997).

Die Bindung von Leukozyten wird über eine Vielzahl von Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche der EC gesteuert. Selektine initiieren zunächst eine lose Bindung, das Leukozyten „rolling“. Die feste Bindung der Leukozyten erfolgt hauptsächlich über Integrinrezeptoren, die Adhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule -1* (ICAM-1) und *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1), die von intaktem Gefäßendothel nur gering exprimiert werden. Unter physiologischen Bedingungen verhindert das Gefäßendothel die Bindung von Leukozyten und bildet eine Barriere gegen ihr Eindringen in den Subendothelialraum. Es überwiegen Faktoren, die die Thrombozytenaggregation, die Monozytenadhäsion und die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen inhibieren (Gerok *et. al.*, 2000).

Bei der Atherosklerose kommt es neben Veränderungen in der Sekretion von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Koagulationsfaktoren, Veränderungen der Permeabilität des Endothelzellverbandes, und der Aktivierung der glatten Gefäßmuskulatur auch zu einer veränderten Freisetzung von vasoaktiven Substanzen und einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (Cascieri, 2002). Diese Veränderungen werden ausgelöst durch pro-inflammatorische Substanzen wie

Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder Interleukin 1 β (IL-1 β), die über den Transkriptionsfaktor NF- κ B, bzw. dessen Untereinheiten p 50 und p 65 eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Genen wie die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die Cyclooxygenase-2 (COX-2), ICAM-1 oder VCAM-1 bewirken (Lawrence, *et. al.*, 2002).

So wird in humanen Endothelzellen die eNOS über bereits veränderten atherosklerotischen Läsionen großer und mittelgroßer Arterien (Marsden *et. al.*, 1992) nur noch vermindert exprimiert, was zu einer verschlechterten Bereitstellung von NO führt. (Wilcox *et. al.*, 1997). Die induzierbare NOS (iNOS) und neuronale NOS (nNOS), die in gesunden Endothelzellen nicht nachweisbar waren, wurden in beginnenden und bereits ausgeprägten atherosklerotischen Läsionen gefunden (Buttery *et. al.*, 1996), auch in Assoziation mit Makrophagen und Endothelzellen (Wilcox *et. al.*, 1997). Der Vasokonstriktor ET-1 und ECE-1 werden ebenfalls vermehrt in atherosklerotischen Plaques mit chronischen Entzündungen, in Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert (Ihling *et. al.*, 2001; Kinlay *et. al.*, 2001).

Durch Induzierung der COX-2 wird vermehrt Prostazyklin gebildet. Auch erhöhte Konzentrationen von TXA₂ können bei verschiedenen Thrombosen und Gefässkrankheiten nachgewiesen werden (Ogletree, 1987), dieses wird bei entzündlichen Prozessen hauptsächlich von aktivierten Blutplättchen aber auch von geschädigten Endothelzellen gebildet. Somit kommt es zu einer Verschiebung der vasoaktiven Substanzen zugunsten der Vasokonstriktoren. Nach Stimulierung mit Zytokinen wie IL-1 β und TNF α , oder Aktivierung durch oxidiertes LDL, werden auch die Adhäsionsmoleküle, wie E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 verstärkt exprimiert (Cotran & Pober, 1990). Die verstärkte Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle ist eine bedeutende Reaktion des Endothels auf verschiedene Risikofaktoren der Atherosklerose. Es kommt zur vermehrten Bindung von Monozyten an das Endothel und einem verstärkten Einwandern der Zellen in den Subendothelialraum.

Die Atherosklerose ist eine typische Humanerkrankung in Industrienationen, in denen eine protein- und fettreiche, aber ballaststoffarme Ernährung verbreitet ist. Der Zusammenhang zwischen einer Diät, die reich an tierischem Protein ist, und dem Auftreten einer Atherosklerose konnte erstmals 1908 von Ignatowski nachgewiesen werden (Kritchevsky, 1995). Durch Verfütterung von Fleisch, Eigelb und Milch an Kaninchen konnte nachweislich Atherosklerose induziert werden. 1940 konnten Meeker und Kesten nachweisen, dass tierisches Protein (Casein) atherogener ist als pflanzliches Protein (Soja). Sie folgerten, dass die Aminosäurezusammensetzung der

Proteine ausschlaggebend für die unterschiedliche atherogene Wirkung ist. Es folgten weitere Studien, die belegten, dass tierische Proteine den Serum-Cholesterinspiegel stärker erhöhen als pflanzliche Proteine, insbesondere Soja (Kritchevsky *et. al.*, 1959; Howard *et. al.*, 1965). 1980 untersuchten Huff & Carroll die Wirkung von Aminosäuremischungen, die in Anlehnung an die jeweiligen Proteine zusammengestellt wurden, um eventuell wirksame Aminosäuren als ursächlich für die beobachteten Veränderungen zu identifizieren. Auch hier zeigte sich, dass ein Sojaproteinisolat die niedrigsten Plasmacholesterolkonzentrationen verursacht.

Bioaktive Peptide aus Nahrungsproteinen zeigten bereits Effekte auf das Herz-Kreislauf-System, das Nervensystem und das Immunsystem. Aus Casein konnten Peptide mit antithrombotischen und blutdrucksenkenden Eigenschaften isoliert werden (Pihlanto-Leppälä, 2001). Bioaktive Peptide mit blutdrucksenkenden Eigenschaften sind natürliche Inhibitoren des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE), die zumeist aus 2 bis 20 Aminosäureresten bestehen und überwiegend nach dem proteolytischen Verdau von Milchproteinen freigesetzt werden. Aber auch aus Soja konnten bereits ACE-Inhibitoren isoliert werden (Wu & Ding, 2001).

Das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) konnte sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Makrophagen von atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Es bewirkt die Umwandlung von Angiotensin-1 in das vasokonstriktorisches Angiotensin-2 (Diet *et. al.*, 1996), welches Wachstum und Migration von glatten Muskelzellen stimuliert und Monozyten bzw. Makrophagen aktiviert. Die Koexistenz von Angiotensin-2, ACE und dem G-Protein-gekoppelten Angiotensin-2-Typ 1-Rezeptor (AT₁) in der Schulterregion von koronaren atherosklerotischen Plaques zeigt eine Verbindung und wahrscheinliche Beteiligung des Renin-Angiotensin-Systems an der Entstehung von Entzündungsprozessen in den Koronargefäßen (Schieffer *et. al.*, 2000).

Klinische Studien zeigen, dass die Verabreichung von ACE-Inhibitoren zu einer Verbesserung der klinischen Symptome, einer geringeren Erkrankungsrate und verminderten Mortalität bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen führt (Dzau, 2001). Sie bewirken über den Vasodilator Bradykinin eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (Govers & Rabelink, 2001). Eine verminderte NF-κB-Aktivierung und damit eine verminderte Bildung und Entwicklung von atherosklerotischen Plaques durch ACE-Inhibitoren zeigen Arbeiten von Hernandez-Presa *et. al.*, (1997); Ambrosioni *et. al.*, (2001); Luft, (2001a); Luft, (2001b). Auch bei *in vivo*-Studien mit natürlichen ACE-Inhibitoren konnten blutdrucksenkende Effekte (Cushman & Ondetti, 1999) nachgewiesen werden.

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Atherosklerose in Ländern mit einer sojareichen Ernährung selten auftritt. Für das in Soja enthaltene Isoflavon Genistein konnten u.a. bereits östrogenähnliche (Honore *et. al.*, 1997; Anthony *et. al.*, 1998) und antioxidative Effekte (May *et. al.*, 1996) nachgewiesen werden. Aus Casein können nach proteolytischem Verdau ACE-Inhibitoren freigesetzt und aktiviert werden, die eine blutdrucksenkende Wirkung haben. ACE-Inhibitoren führen über das Blut zu einer direkten Beeinflussung der Endothelfunktionen der Blutgefäße. Weitere bioaktive Peptide könnten nach dem proteolytischen Verdau aktiv über Peptidtransporter (Brandsch *et. al.*, 1997) oder passiv - parazellulär, durch Diffusion oder Endozytose - in den Blutkreislauf gelangen (Vermeirssen *et. al.*, 2002, Satake *et. al.*, 2002; Leibach & Ganapathy, 1996). Bisher fehlen systematische Studien über die Wirkung von Peptiden aus Nahrungsproteinen auf Blutgefäßendothelzellen.

Die Atherosklerose ist überwiegend auf die großen Arterien, Herzkranzgefäße, Aorta, Karotiden, sowie Becken- und Beinarterien beschränkt (Gerok *et. al.*, 2000). Während die Konstriktion mikrovaskulärer Gefäße überwiegend über die scherstressinduzierte Bildung von NO reguliert wird (Stepp *et. al.*, 2001), besteht im sogenannten „Arterienbaum“ aufgrund des geringen Scherstress (Asakura & Karino, 1990; Hajra *et. al.*, 2000; Ku *et. al.*, 1985) eine erhöhte Prädisposition zur Entwicklung einer Artherosklerose. Innerhalb der Aorta sind besonders die Regionen mit Gefäßabgängen befallen, in denen die Blutzirkulation und damit der Scherstress vermindert sind. Als Modell für unsere Studien wählten wir daher primäre Endothelzellen der humanen Aorta (HAoEC).

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Nahrungsproteinen auf atheroskleroserelevante Parameter von Endothelzellen der humanen Aorta. Mit in Anlehnung an den proteolytischen Verdau hergestellten Hydrolysaten aus Soja und Casein sollten folgende Parameter untersucht werden:

- Einfluß auf die Proliferation der HAoEC als Screeningparameter zum Auffinden von vasoaktiven Hydrolysaten.
- Einfluß von Hydrolysaten auf die Freisetzung der vasoaktiven Substanzen NO, ET-1 und der Eicosanoide PGI₂ und TXA₂.
- molekularbiologische Untersuchung der an der Freisetzung von vasoaktiven Substanzen beteiligten Enzyme an unstimulierten und TNF α -stimulierten HAoEC

- Untersuchung von Hydrolysaten auf ACE-Inhibitoren
- Einfluss von Hydrolysaten auf die Bildung der *second messenger* cGMP und cAMP
- Einfluß von Hydrolysaten auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Monozytenbindung an unstimulierten und TNF α -stimulierten HAoEC
- Untersuchung des Einflusses von Hydrolysaten auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B bei TNF α -stimulierten HAoEC.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

10 x Sybr® Green I	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
100 bp-DNA-Leiter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
200 U RevertAid™ MmuLV Reverse Transkriptase in 5 x Reaktionspuffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland
5 U Taq DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Agarose Serva Premium	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BAY 41-2272	Alexis Biochemicals
BCA	bicinchoninic acid
BCECF-AM (2,7'-bis-(2-carboxyethyl) -5-(and-6)-carboxyfluorescein)	Invitrogen Life Technologies
BioRad Protein Assay Farbstoff- Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Biotherm DNA-Polymerase	GENECRAFT GMBH, Lüdinghausen, Deutschland
Borsäure	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Chymotrypsin (Rinderpankreas)	Boehringer Mannheim, Deutschland

Cryo-SFM (Cryomedium, serumfrei)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	MERCK-Schuchhardt, Hohenbrunn, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid) Hybri Max®	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNA-Ladepuffer	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphat)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
ECG-MV-Medium Standard und phenolrotfrei	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Elastase (Schweinepankreas)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
FAD	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 35 %	Heidinger Chemikalien - Lehrmittel, Stuttgart, Deutschland
Forskolin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Gelladepuffer Roti®-Load DNA (mit Saccharose), DNase-frei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Gibco® Gentamycin, 10 mg/ml, flüssig	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gibco® HBSS ohne Phenolrot	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Gibco® RPMI 1640 mit 25mM Hepes Buffer, L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hippuryl-His-Leu	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
His-Leu	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hepes BSS	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK-Schuchhardt, Hohenbrunn, Deutschland
Laktatdehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
MTT	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
NADPH	Roche Diagnostics & Co., Indianapolis, USA
Natriumchlorid reinst p.A.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	MERCK-KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
n-Hexan	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Nitratreduktase	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
N-(1-(naphthyl))ethylendiamin	MERCK, Darmstadt, Deutschland

Oligo-dT-Primer	Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland
Pepsin (Magenmukosa)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
o-Phthaldialdehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
rHu VEGF 165	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Stop Reagenz	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Sulfanilamid	MERCK, Darmstadt, Deutschland
TMB	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
TNS Trypsin neutralising solution	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Trichlormethan (Chloroform)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
TRIS, > 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
TRIzol® Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin (Schweinepankreas)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypsin / EDTA 2	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
TNF α , human, recombinant	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Ultroser G	Ciphergen Biosystems, Cergy-Saint- Christophe, Frankreich
<u>Antikörper</u>	
Anti-CD 54, human (Anti-ICAM-1)	Calbiochem, Affiliate of MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland

Anti-CD 106, human (Anti-VCAM-1)	Calbiochem, Affiliate of MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-human-E-Selektin	Bender Med Systems GmbH, Vienna, Österreich
Anti-mouse-IgG, heavy and light chain	Calbiochem, Affiliate of MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland

Primer

fwd und rev Primer für eNOS	Metabion, Martinsried, Deutschland
fwd und rev Primer für GAPDH, COX-1, COX-2, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Oligo-dT-Primer	Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland

2.1.2 Zellen

HAoEC	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
U 937	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

2.1.3 Testkits

Cell Proliferation Biotrak	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland ELISA system
EIA-Kit 6-keto-PGF1a	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
EIA-Kit TXB 2	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Endothelin ELISA	IBL Hamburg, Hamburg, Deutschland
Trans AM™ NFκB family	Active Motif, Rixensart, Belgien
Nuclear extract kit	Active Motif, Rixensart, Belgien

2.1.4 Puffer

- PBS-Puffer

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g

Mit A. dest. auf 1L auffüllen, pH-Wert 7,4

- TRIS-Puffer (Lysispuffer Monozytenadhäsion)

50 mM TRIS

0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

pH-Wert 7,6 (mit HCl)

- NaCl-KH₂PO₄-Puffer (ACE-Aktivitätsmessung)

0,3 M NaCl

0,2 M KH₂PO₄

pH-Wert 8,3 (mit KOH)

- 5*TBE

Tris Base 54,0 g

Borsäure 27,5 g

EDTA 3,72 g

Mit A. dest. auf 1L auffüllen, pH-Wert 8,0 (mit NaOH oder Borsäure)

2.1.5 Geräte

Cellstar® Gewebe- 25 cm² und 75 cm², steril, mit Filter, Greiner Bio-One GmbH, kulturflaschen Frickenhausen, Deutschland

Cellstar® Zellkultur Mikroplatten, 24 well, steril, mit Abdeckplatte, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Cellstar®Zellkultur Mikroplatten, 96 well, F-Form, TC, steril, mit Abdeckplatte. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Elektrophoresekam- Owl Separation systems, Inc., Portsmouth (NH), mer (Agarosegele) USA

Falcon-Tubes, 10 und 50 ml, steril	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Gene Genius Gel Documentation	Analysis Systems SYNGENE, Cambridge, Großbritannien
Inkubator	Heraeus HeraCell, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Neubauerkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Plattenreader	Spektrafluor Plus Tecan + Photometersoftware, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Waagen	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Pumpe	Ilmvac Biovac 102, Ilmenau, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus HeraSafe, Kendro Laboratory products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler	Mastercycler ® Personal, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Biometra T-1 Thermoblock, Göttingen, Deutschland Thermomixer Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie 2, Janke & Kunkel GmbH und Co KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad	Julabo Shake Temp SW 22, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach / Schwarzwald, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-one GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 1 S-R, Langenselbold, Deutschland Micro-Zentrifuge AL 220 VAC, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Methoden

- Zellkultur

HAoEC (human aortic endothelial cell)

Die verwendeten Endothelzellen wurden aus der Aorta einer 28-jährigen weiblichen Spenderin isoliert. Die Kultur der Endothelzellen erfolgte in ECG-MV-Medium (beides von Promocell) in unterschiedlichen Kulturgefäßen im Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C. Das Medium wurde supplementiert mit:

ECGS / H	0,4 %
Epidermaler Wachstumsfaktor	10 ng / ml
Hydrocortison	1 µg / ml
Amphotericin B	50 ng / ml
Gentamycin	50 µg / ml

Anstelle von fetalem Kälberserum (FKS; 5 %) wurde als Schutz der Peptidstrukturen der getesteten Hydrolysate vor einem vorzeitigen Abbau durch das Kälberserum FKS der Serumersatz Ultrosor G verwendet (4 %). Dafür wurden die HAoEC nach dem Auftauen bis zur ersten Passage in FKS-Medium kultiviert. Nach dem erneuten Aussäen wurden die Zellkulturen allmählich bei 2-tägigem Mediumwechsel von FKS-haltigem auf Ultrosor G-haltiges Medium nach folgendem Schema umgestellt:

	FKS : Ultrosor G
Tag 1	50 : 50
Tag 3	25 : 75
Tag 5	10 : 90

Der Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-95 % wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde abgesaugt und anschliessend für 30 sec mit Hepes BSS gewaschen. Nach Entfernen des Waschpuffers wurden die Zellen für 2 min bei 37°C trypsinisiert mit Trypsin / EDTA 2. Die sich lösenden Zellen wurden abgeklopft und die Trypsinierungsreaktion mit TNS abgestoppt. Die Suspension wurde in ein Greiner-Röhrchen überführt, das Kulturgefäss noch einmal mit Medium nachgespült und anschliessend wurde bei 900 U und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Zellen in Kulturmedium wurde unter Verwendung einer Neubauerkammer die Zellzahl ermittelt. Die Aussaat der Zellen in die jeweiligen Kulturgefässe erfolgte zellzahlabhängig mit anschliessender Inkubation unter den oben aufgeführten Bedingungen.

Monozytenzelllinie U 937

Die Zellkultur erfolgte in 25 cm² oder 75 cm²-Kulturflaschen bei 5 % CO₂ und 37°C in RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin, welches mit 10 % FKS und 0,5 % Gentamycin supplementiert wurde. Der Mediumwechsel wurde je nach Zelldichte alle 2-4 Tage durchgeführt.

- Herstellung der Hydrolysate aus Casein und Soja

(Institut für biochemische Technologie der MLU Halle-Wittenberg)

Die Herstellung der Hydrolysate erfolgte durch in vitro-Verdau von Casein (Fa. Meggle, Wasserburg, Deutschland) bzw. Sojaproteinisolat (Numico research, Wageningen, Niederlande) unter Simulierung gastrointestinaler Bedingungen. Die kommerziell bezogenen Nahrungsproteine wurden zunächst auf Reinheit und Intaktheit der Untereinheiten (Glycinin, beta-Conglycinin bei Soja) bzw. Vollständigkeit (α_{s1} , α_{s2} , β , γ -Fraktionen bei Casein) durch reversed-phase-HPLC bzw. SDS-Elektrophorese im Vergleich mit Literaturangaben getestet.

Die Proteinisolate wurden in einem ersten Schritt in Wasser resuspendiert (25 mg/ml), mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und unter Zugabe von Pepsin (1 mg/ml) bei 37 °C für 3 h verdaut. Anschliessend wurde entweder der gesamte Pepsin-Verdau oder nur die unlöslichen, teilweise verdauten Komponenten durch Zugabe von NaHCO₃ neutralisiert, auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und durch Zugabe von Pankreasproteasen (Trypsin and Chymotrypsin: 0,5 mg/ml; Elastase: 0,12 mg/ml) in unterschiedlichen Kombinationen bei 37 °C weiter verdaut. Weiterhin wurden Proben

von in Wasser gelöstem Protein ohne vorherigen Pepsinverdau einer enzymatischen Behandlung nur mit Pankreasproteasen zugeführt.

Die dabei entstandenen Hydrolysate wurden anschliessend 15 min gekocht und zentrifugiert, um Proteaserestaktivitäten auszuschliessen. Einige Hydrolysate wurden fraktioniert, wobei die Proteaseaktivität und teilweise verdaute Komponenten durch Ultrafiltration unter Verwendung eines 5-kDa Membranscheibenfilters (Omega-Series, PALL, Ann Arbor, USA) während der laufenden Verdauung entfernt wurden. Für eine weiterführende Fraktionierung von 1-3 kD und < 1 kD- Peptidfraktionen wurden 3 kD und 1 kD-Membranscheibenfilter verwendet.

Alle Hydrolysate und Peptidfraktionen wurden anschliessend lyophilisiert. Die Parameter zur Hydrolysatcharakterisierung sind in den Tabellen A1 und A2 im Anhang aufgeführt. Das durchschnittliche Molekulargewicht und der Gehalt an freien Aminosäuren wurden nach Moore & Stein (1954) über spektralphotometrische Determination von freien Aminoresten mit Ninhydrinreagent (Sigma-Aldrich) im Verhältnis zur Proteinmenge und die Kupfer-Komplex-Methode nach Lowry *et. al.* (1951) bestimmt. Die Trypsinrestaktivität wurde ebenfalls spektralphotometrisch ermittelt nach Inkubation von 20 mg/ml Lyophilisat mit dem chromogenen Trypsinreagens N α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide hydrochloride (Sigma-Aldrich) bei 37 °C für 20 min. Der Salzgehalt der niedermolekularen Peptidfraktionen wurde ermittelt mittels Pierce-BCA-Proteinassay (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) unter Verwendung eines salzfreien Hydrolysates als Standard. Eine zusätzliche Charakterisierung erfolgte durch reversed-phase HPLC fingerprint und von einigen Hydrolysatfraktionen wurden massenspektrometrische Sequenzierungen der enthaltenen Peptide angefertigt.

Eine Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Hydrolysate gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die im Rahmen der Arbeit verwendeten Hydrolysate

Sojahydrolysate		Caseinhydrolysate	
Mittlere Molmassen (D)			
S // P+T	4545	C // E+T	1000
S // P+T+C	1666	C / E+T+C	935
S // P+T+C+E	1724	C / P+E+T	943
S // P / C	3571	C / P+E+T+C	862
S // P / E	2777	C // P / C	1300
S // P / T	3458	C // P / E	1500
S // P / T+C+E	1000	C // P / T	1300
Mit Membranfraktionierung			
S // P+T	< 1 kD	C // P+T	< 1 kD
S // P+T	1- 3 kD	C // P+T	1- 3 kD
S // P+T,C	< 1 kD	C // P+T,C	< 1 kD
S // P+T,C	1- 3 kD	C // P+T,C	1- 3 kD
S // P+T,C,E	< 1 kD	C // P+T,C,E	< 1 kD
		C // P+T,C,E	1- 3 kD

Die für die Tests verwendeten lyophilisierten Hydrolysate wurden bei -18 °C gelagert. Für die Versuche wurden die Hydrolysate jeweils frisch eingewogen und in der entsprechenden Menge Medium zum Erreichen der jeweils höchsten verwendeten Konzentration gelöst. Aus dieser Lösung wurden dann über die jeweiligen Verdünnungsstufen alle weiteren für die Versuche benötigten Konzentrationen hergestellt.

- Proteinbestimmung nach Bradford

Prinzip: Das Bio-Rad Protein Assay ist ein farbstoffbindendes Assay (Coomassie[®] Brilliant Blue G-250). Der saure Farbstoff bindet primär an basischen und aromatischen Aminosäureresten. Bei Bindung an Peptide verschiebt sich das Absorptionsmaximum für saure Lösungen von 465nm auf 595 nm, was spektralphotometrisch bei 595 nm bestimmt werden kann.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde zunächst der Überstand abgesaugt und die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen. Eine definierte Menge 0,1 M NaOH wurde zur Lysierung der Zellen in die wells der Kulturplatte pipettiert und bei RT über Nacht stehen gelassen. Für die Messung wurde entweder ein definiertes Volumen Zellysat in eine 96-well-Kulturplatte überführt oder die Zellen wurden nach Inkubation in 96-well-Kulturplatten bereits in den wells lysiert. Für die Messung wurde das Bradford-Farbstoffkonzentrat von Biorad laut Angaben des Herstellers 1:5 mit A. bidest. verdünnt (*microassay-procedure*) zu den Proben pipettiert. Nach 5 min folgte die spektralphotometrische Messung mit dem SpectroFluor Plus von TECAN bei 595 nm gegen eine BSA-Eichreihe (Bio-Rad).

- Proliferationstest ELISA (Amersham Biosciences)

Prinzip: Der Proliferationstest beruht auf dem Einbau von 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit den Testsubstanzen. Die Zellen werden nach einer anschließenden DNA-Denaturierung mit einem Peroxidase-gekoppelten BrdU-Antikörper inkubiert. Der entstandene Immunkomplex kann mit Hilfe von TMB in einer Farbstoff-Substrat-Reaktion bei 450nm spektralphotometrisch detektiert werden.

Für den Proliferationstest wurden die Endothelzellen (Passage 3 bis 8) in 96-well-Kulturplatten mit 3000 Zellen je well ausgesät. Nach 48 h und einer Konfluenz von 50 bis 70 % erfolgte die Inkubation mit Hydrolysaten in Konzentrationen von 0,025 bis 5 mg/ml und BrdU (100 µM). Als Positivkontrolle wurde der Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ ebenfalls für 24h inkubiert. Nach 24 h folgte die Durchführung des ELISA (cell proliferation ELISA system, version 2) nach den Vorgaben des Herstellers mit

anschliessender colorimetrischer Messung bei 450 nm mit dem SpectroFluor Plus von TECAN.

- Viabilitätstest

Prinzip: In diesem Assay wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Die Methode (Lindl, 2002) beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid) zu einem blauen unlöslichen Formazan, die nur in lebenden Zellen abläuft. 85 % - 115 % der Kontrolle gilt als unbeeinflusst durch die Behandlung.

HAoEC in 24-well-Kulturplatten wurden bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert, anschliessend folgte eine 24 h - Inkubation entweder stimuliert (TNF α 0,2 ng/ml) oder unstimuliert mit Hydrolysaten (0,05 und 0,5 mg/ml). Der Überstand wurde abgesaugt und MTT (5 mg / ml PBS) zusammen mit frischem Medium (Endkonzentration MTT 1 mg / ml) auf die Zellen gegeben. Nach 45 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit Isopropanol lysiert. Die Proben wurden in definiertem Volumen in eine 96-well-Kulturplatte überführt und die Viabilität bei 595 nm spektralphotometrisch mit dem SpectroFluor Plus von TECAN bestimmt.

- Messung von Eicosanoiden und Endothelin in Zellüberständen

Probenaufbereitung für Eicosanoid- und Endothelinbestimmung:

Für die Konzentrationsmessungen wurden die Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen unter Verwendung der Passagen 3-5 ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % erfolgte die Inkubation mit den Hydrolysaten (0,05 und 0,5mg/ml) für 24 h bei 37 °C. Der Mediumüberstand wurde mittels einer Pipette in Falcon-Tubes überführt. Es folgte eine weitere Inkubation mit HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) für 1h bei 37 °C. Danach wurde das HBSS ebenfalls in Falcon-Tubes überführt und wie der Mediumüberstand bei -18 C gelagert. Die Bestimmung der Freisetzung der Eicosanoide und des Endothelin-1 erfolgte mit den HBSS-Proben, da sich der Serumersatz Ultrosor G im verwendeten Testsystem als Störfaktor herausstellte.

- Eicosanoide

Prinzip (Kompetitives Enzym-Immunoassay):

In die antikörperbeschichteten wells der 96-well-Platte wurden eine fixe Menge Tracer (Eicosanoid-Acetylcholinesterase-Konjugat), Antiserum und die HBSS-Proben pipettiert. Das Antiserum bindet die freien Eicosanoid- Metaboliten oder den Tracer unter Bildung von Immunkomplexen mit dem Antikörper. Nach Zugabe von Ellman's Reagenz (enthält Substrat für Acetylcholinesterase) bildet sich ein gelber Farbstoff, der bei 405 nm spektralphotometrisch detektiert werden kann. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zum Eicosanoidgehalt.

Die Bestimmung von PGI_2 erfolgte über den stabilen Metabolit 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ und von TXA_2 über den stabilen Metabolit TXB_2 entsprechend den Vorgaben des Herstellers (Cayman Chemicals). Die Messung erfolgte spektralphotometrisch mit dem SpectroFluor Plus von TECAN bei 405 nm.

- Endothelin-1

Prinzip (Kompetitives Enzym-Immunoassay):

In die antikörperbeschichteten wells der 96-well-Kulturplatte wurden eine fixe Menge Tracer (Endothelin-Acetylcholinesterase-Konjugat), Antiserum und die HBSS-Proben pipettiert. Das Antiserum bindet die freien Endothelin-Metaboliten oder den Tracer unter Bildung von Immunkomplexen mit dem Antikörper. Nach Zugabe von Ellman's Reagenz (enthält Substrat für Acetylcholinesterase) bildet sich ein gelber Farbstoff, der bei 405 nm spektralphotometrisch detektiert werden kann. Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zum Endothelingehalt. Die Bestimmung von Endothelin erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Die Endothelingehalte wurden spektralphotometrisch mit dem SpectroFluor Plus von TECAN bei 405 nm bestimmt.

- NO-Bestimmung nach Griess

Prinzip: In einem ersten Schritt wird Nitrat enzymatisch durch Nitrat-Reduktase zu Nitrit umgewandelt. Danach folgt nach Zugabe von Griess-Reagenz die Umwandlung des Nitrits in eine tief purpurrote Azo-Komponente, die spektralphotometrisch bei 550 nm bestimmt werden kann.

Die Aussaat der Endothelzellen erfolgte in 96-well-Kulturplatten. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % erfolgte die Inkubation mit Hydrolysaten (unstimuliert) oder zytokinstimuliert ($\text{TNF}\alpha$ 0,2 ng/ml) in phenolrotfreiem Medium für 24h unter

Verwendung der 3. bis 5. Passage. Der Mediumüberstand wurde abgenommen und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Nitratbestimmung gelagert. Für die Bestimmung der NO-Konzentration nach Griess (Schmidt, 1995) wurde der Zellüberstand nach dem Auftauen zentrifugiert, um störenden Zelldebris zu entfernen. Die Messung des Nitrats erfolgte unter Mitführung einer Nitrateichreihe in phenolrotfreiem Medium bei 550 nm mit dem SpectroFluor Plus von TECAN.

- Second messenger cAMP und cGMP

Prinzip: Nach Hydrolyse der Zellmembranen und der damit verbundenen Freisetzung der *second messenger* wird eine definierte Menge Lysat in die antikörperbeschichtete 96-well-Platte überführt. Ein Peroxidase-gelabeltes cGMP (cAMP)-Konjugat (Antiserum) wird zugegeben. Das Assay beruht auf der Competition zwischen freiem *second messenger* und peroxidase-gelabeltem cGMP (cAMP) um eine begrenzte Anzahl von freien Bindungsstellen der Antikörper. Die Messung erfolgt spektralphotometrisch mit TMB-gekoppelter Farbreaktion bei 450 nm.

Die Aussaat der Zellen erfolgte in 24-well-Kulturplatten (Passage 3-5). Die Zellen wurden nicht stimuliert oder 24 h mit $\text{TNF}\alpha$ (0,2 ng/ml) vorinkubiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90% erfolgte zunächst eine 5-minütige Vorinkubation mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-2,6(1H,3H)-purinedione), um die cAMP-Degradation während der Inkubationsphase zu verhindern. Im Anschluss folgte eine 30 minütige Inkubation mit den Testsubstanzen. Dafür wurden die Hydrolysate mit 0,05 und 0,5 mg/ml und als Positivkontrolle das Adenylatcyclase – Stimulans Forskolin für cAMP und BAY-41-2272 [(3-(4-Amino-5-cyclopropylpyrimidine-2-yl)-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine] für cGMP zusätzlich zum IBMX zu den Zellen gegeben. Die Reaktion wurde durch Eintauchen der Kulturplatte in flüssigen Stickstoff abgestoppt und die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Testdurchführung gelagert.

Für die Messung wurden die Platten aufgetaut und die Zellen lysiert. Die weitere Bestimmung erfolgte laut Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences). Die colorimetrische Messung erfolgte bei 450nm mit dem Plattenreader SpectroFluor Plus von TECAN.

- Bestimmung der Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin

Prinzip: Die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle wurde mit einem Zelloberflächen-*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt, das nach Rothlein et al. (1988) und Lemaire et al. (1998) modifiziert wurde. Das Adhäsionsmolekül reagiert als Antigen in einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem entsprechenden monoklonalen Antikörper. Die nichtgebundenen Antikörper werden ausgewaschen und die gebundenen Antikörper mit einem sekundären Peroxidase-konjugierten monoklonalen anti-Maus-IgG markiert. Der so entstandene Immunkomplex reagiert in einer Substratreaktion mit TMB unter Bildung eines blauen Farbstoffes, der nach Zugabe von Stoppreagenz nach gelb umschlägt. Dieser kann spektralphotometrisch bei 450 nm detektiert werden.

Die Aussaat der Endothelzellen (Passagen 3-5) erfolgte in 96-well-Kulturplatten. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen mit den Hydrolysaten (0,05 und 0,5mg/ml) stimuliert ($\text{TNF}\alpha$ 0,2 ng/ml) oder unstimuliert für 24h inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 4%-Formaldehyd für 5 min fixiert. Nach einem Blocking mit 2%-BSA / PBS für 1h bei 37°C im Inkubator wurden je nach Testansatz die primären Antikörper Anti-CD54 (1:500), Anti-CD106 (1: 300) oder Anti-E-Selektin (1:300) zu den Zellen pipettiert und anschliessend 1h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 1% BSA/ PBS gewaschen und es erfolgte die Zugabe von Anti-mouse IgG / POD (1:10.000) für 1h bei RT. Die Zellen wurden erneut gewaschen und nach Zugabe von TMB für 5 min wurde die Reaktion mit Stop-Reagenz abgestoppt. Die colorimetrische Messung erfolgte bei 450nm mit dem Plattenreader SpectroFluor Plus von TECAN.

- Bestimmung der Monozytenadhäsion an Endothelzellen mit der Zelllinie U 937

Prinzip: Die Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen wurde mit einer Methode nach (Liu et al., 2004) ermittelt. BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl) -5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester) markierte Monozyten der Zelllinie U937 adhären an die exprimierten Oberflächenmoleküle der HAoEC. In lebenden Monozyten wird BCECF-AM durch Esterasen in fluoreszierendes BCECF gespalten, die Messung der Emission erfolgt spektralphotometrisch bei 535 nm.

Die Zellen der Passagen 3-5 wurden in 24-well-Kulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % wachsen gelassen. Die Inkubation erfolgte für 24h entweder nur mit den Hydrolysaten (0,05 und 0,5 mg/ml) oder TNF α -stimuliert (0,2 ng/ml) zusammen mit den Hydrolysaten. Die Monozyten wurden 30 min im Inkubator mit BCECF-AM (5 μ M) fluoreszenzmarkiert. Nach 3-maligem Waschen mit 1% BSA / PBS wurden die Monozyten in ECG-MV-Medium aufgenommen und nach Ablauf der 24h Inkubation mit den Hydrolysaten in einer Dichte von 250.000 Zellen pro 500 μ l Medium in die wells zu den vom Mediumüberstand befreiten Endothelzellen pipettiert. Zeitgleich wurde eine Monozyteneichreihe ebenfalls durch Zugabe zu den Endothelzellen mitgeführt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit einem Tris-Puffer (50 mM Tris und 0,1 % SDS) lysiert. Die Lysate wurden in definiertem Volumen in schwarze Kulturplatten überführt und die Fluoreszenz bei 535nm mit dem Plattenreader SpectroFluor Plus von TECAN gemessen.

- ACE-Aktivitätsmessung (angiotensin converting enzyme)

Prinzip: Die Methode basiert auf der Konversion (Umwandlung) des Substratanaloges Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin zu Hippurat und L-Histidyl-L-Leucin, welches mit Hilfe von o-Phthaldialdehyd spektralfluorimetrisch quantifiziert werden kann.

Die Kultivierung der Zellen (Passagen 3-5) erfolgte in 24-well-Kulturplatten bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70%. Danach wurden sie 24h unstimuliert bzw. stimuliert (TNF α 0,2 ng/ml) mit den Hydrolysaten inkubiert (0,05 und 0,5 mg/ml). Für die Aktivitätsmessung nach Friedland & Silberstein (1976) wurden die Mediumüberstände abgesaugt und die Zellen erneut nach Zugabe einer 4 mM Hippuryl-His-Leu-Lösung in NaCl-KH₂PO₄-Puffer 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,28 N NaOH abgestoppt und die Zellen dadurch lysiert. Ein definiertes Volumen der Proben wurde in eine schwarze Kulturplatte überführt. Zusätzlich wurde eine His-Leu-Eichreihe mitgeführt. Nach Zugabe des Fluoreszenzmarkers o-Phthaldialdehyd für 30 min wurde die ACE-Aktivität bei den Wellenlängen Ex. 360 nm und Em. 465 nm im SpectroFluor Plus von TECAN bestimmt.

- PCR

Prinzip: Die Grundlage der Expressionsuntersuchungen bildet das Prinzip der reversen Transkription mit der anschliessenden Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Zuerst wird die Gesamt-RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Während der PCR wird unter Verwendung eines gegenläufig orientierten Primerpaares ein zwischen den Primern liegender Sequenzabschnitt vervielfältigt, was eine Visualisierung und Quantifizierung des entstandenen Produktes ermöglicht (Schrimpf, 2002).

Die COX-2 wurde semiquantitativ mittels RT-PCR und anschliessender Gelelektrophorese erfasst. Bei allen anderen untersuchten Genen wurde die mRNA-Konzentration über die Anzahl ihrer Kopien pro Reaktionszyklus durch realtime detection (RTD-PCR) quantifiziert.

Die Ergebnisse wurden gegen die jeweils parallel bestimmte mRNA-Expression des Haushaltsgenes GAPDH normalisiert, welches nach Apostolakos *et. al.*, (1993) und Zhao *et. al.*, (1995) relativ konstant exprimiert wird.

- RNA-Isolierung

Die Endothelzellen (Passagen 3-5) in 25 cm²-Flaschen wurden nach 24h Inkubation (unstimuliert oder stimuliert (TNF α 0,2 ng/ml) mit Hydrolysaten (0,05 und 0,5mg/ml)) nach Absaugen des Zellüberstandes in Trizol aufgenommen. Nach 2-3 min wurden die Proben in sterile Eppendorf-Tubes überführt, für die RNA-Extraktion mit Chloroform versetzt und gut gemischt für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 U und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, im Verhältnis 1:2 mit Isopropanol versetzt, wiederum vorsichtig gemischt und 10 min bei RT stehen gelassen. Die sedimentierte, gefällte RNA wurde zentrifugiert (4°C; 13.000 U), die Überstände abgesaugt, das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen, kurz gevortext und 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Anschliessend wurden die Proben in 20 μ l sterilem 0,1 %-DEPC-Wasser aufgenommen und im Thermomixer bei 60 °C 10 min gelöst. Bis zu ihrer Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

- Konzentrationsbestimmung messenger RNA

Mit dem Spektralphotometer wurde die optische Dichte der 1:100 mit sterilem 0,1 %-DEPC-Wasser verdünnten Gesamt-RNA bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration der Gesamt-RNA ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} * 40 * V$$

A_{260} Extinktion bei 260 nm

40 Multiplikationsfaktor ($A_{260} = 1,0$ bei RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$)

V Verdünnungsfaktor ($V = 100$).

Die Reinheit der RNA wurde bestimmt aus dem Quotienten der Messwerte von 260 und 280 nm. Dieser Quotient erreichte bei allen Proben Werte zwischen 1,5 und 2.

- cDNA-Synthese

Die aus den Zellen isolierte mRNA wird als Matrize für die cDNA-Synthese eingesetzt, die im Anschluss als Matrize für die PCR eingesetzt werden kann (Schrimpf, 2002).

Reagenzien für 25 μl Gesamtansatz:

1 μl Oligo dT Primer (100 μM)

5 μl 5xPuffer (250 mM Tris-HCl; 250 mM KCl; 20 mM MgCl_2 ; 50 mM DTT)

1,25 μl dNTP (10 mM pro dNTP)

0,3 μl reverse Transkriptase (200u/ μl)

10 μl in DEPC-Wasser verdünnte RNA (1,2 μg Gesamt-RNA)

7,45 μl DEPC-Wasser

Der Gesamtansatz wurde gemischt und die cDNA im Thermocycler (42°C, 1 h) synthetisiert. Die reverse Transkriptase wurde durch Erhöhung der Temperatur auf 72°C für 10 min inaktiviert. Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

- semiquantitative PCR (COX-2)

Die COX-2 und das Referenzgen GAPDH wurden semiquantitativ mittels RT-PCR und anschließender Gelelektrophorese erfasst.

Reagenzien für 20 µl Gesamtansatz:

4 µl Primermix, for und rev (10 pmol/l)

2 µl 10 x MgCl₂-Puffer (1 x Puffer mit 1,5 mM MgCl₂)

0,4 µl dNTPs (100 mM)

0,2 µl Taq Polymerase (5 U/µl)

2 µl cDNA

11,4 µl DEPC-Wasser

Die PCR erfolgte im Mastercycler® personal von Eppendorf mit folgendem Temperaturverlauf:

Initial-Denaturierung	95°C	120 s		
Denaturierung	95°C	30 s	}	Zyklen
Annealing	Tabelle 2	30 s		
Elongation	72°C	60 s		
Extension	72°C	7 min		

- quantitative RT-PCR

Die Real-time RT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und wurde für die Bestimmung der relativen mRNA-Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle, der eNOS, der COX-1 und des *housekeeping gene* GAPDH verwendet. Der Vorteil gegenüber der semiquantitativen PCR besteht in der Messbarkeit der Quantität der amplifizierten Matrizen. Spezifische fluoreszierende DNA-Farbstoffe (SYBR®Green 1) koppeln an die neu gebildete DNA an. Die Fluoreszenz dieser Farbstoffe wird in jedem Zyklus erfasst und ermöglicht so die Quantifizierung.

Die zur Real-time RT-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Reagenzien für 20 µl Reaktionsansatz (gemäß Anleitung Taq Polymerase von Promega):

2,67 µl Primermix for und rev (10 pmol/l)

1 µl dNTP-Mix (10 mM)

2 µl 10*Puffer (1 x)

2,8 µl MgCl₂ (25mM)

0,5 µl SYBR[®] Green I (1:1000)

0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)

0,78 µl DEPC-Wasser

10 µl cDNA (1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt)

Die PCR erfolgte im RotorGene 2000 mit folgendem Temperaturverlauf:

Initial-Denaturierung	95°C	120 s	
Denaturierung	95°C	20 s	} Zyklen
Annealing	Tabelle 2	35 s	
Elongation	72°C	55 s	

- Gelelektrophorese

Die Trennung der entstandenen PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dafür wurde ein 1,5%iges Gel (Agarose und 0,5*TBE-Puffer) aufgekocht, auf 65 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid versetzt in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Käbme für die Geltaschen gezogen und das Gel in 0,5*TBE-Puffer in der Gelkammer equilibriert. Jeweils 10 µl der im Verhältnis 1:10 mit Ladepuffer versetzten Proben und 2 µl DNA-Leiter wurden auf das Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese konnte das DNA-Fragment anhand der Basenpaare (bp) erkannt werden.

Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentrationen wurden die von der Gerätesoftware (RotorGene 2000, Version 4.2) ermittelten *cycle threshold* (Ct)-Werte (Zyklenzahl bis zum Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignals) herangezogen und in die nach Pfaffl (2001) modifizierten Formeln eingesetzt:

$$\Delta Ct = Ct_{GAPDH} - Ct_{Zielgen}$$

$$\text{Ratio} = [E_{GAPDH} + E_{Zielgen} / 2]^{\Delta Ct}$$

E Effizienz des bestimmten Gens der real-time RT-PCR (optimal = 2)

Die Ratio der behandelten HAOEC wurde zu der Ratio der unbehandelten Kontrollzellen ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 2: Für die semiquantitative RT-PCR bzw. realtime RT-PCR verwendete Primer

Primer (10 pmol / μ l)	Sequenz	Annealing-temperatur	BP
GAPDH, human	for: 5'-GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC-3'	60°C	453
	rev: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG -3'		
eNOS, human	for: 5'-CCA GCT AGC CAA AGT CAC CAT -3'	55°C	354
	rev: 5'-GTC TCG GAG CCA TAC AGG ATT-3'		
COX-1, human	for: 5'-CAG CTC CTG GCC CGC CGC TT-3'	65°C	299
	rev: 5'-GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC-3'		
COX-2, human	for: 5'-ATG AGA TTG TGG GAA AAT TGC T-3'	55°C	300
	rev: 5'-GAT CAT CTC TGC CTG AGT ATC-3'		
E-Selektin, human	for: 5'-GTC TGG CCT GCT ACC TAC CTG T-3'	56 °C	391
	rev: 5'-CCT TGC CTG CTG GAC TTT GA-3'		
ICAM-1, human	for: 5'-AGC CAC GCC TCC CTG AAC CTA TCC-3'	61 °C	319
	rev: 5'-CTC CCC CAC CAC TTC CCC TCT CAT-3'		
VCAM-1, human	for: 5'-GAG CGG GAA GGT GAG GAG TGA-3'	57 °C	471
	rev: 5'-CTG GGG GCA ACA TTG ACA TAA AGT-3'		

- Bestimmung der NF κ B-Untereinheiten p 50 und p 65 (Rel A) im Nuklearextrakt

Prinzip: Die vorbereiteten Proben werden in eine oligonukleotid-beschichtete 96-well-Kulturplatte gegeben, die Konsensussequenzen von NF κ B enthält. Die entsprechenden Untereinheiten aus dem Nuklearextrakt binden daran und können mit primärem und peroxidasekonjugiertem sekundären Antikörper in einer Farbreaktion bestimmt werden.

Die Aussaat der Zellen erfolgte in 25 cm²-Flaschen, worin sie bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80-90% kultiviert wurden. Die anschließende Inkubation wurde über einen Zeitraum von 4 h oder 24 h mit Hydrolysaten (0,5 mg/ml) und TNF α (0,2 ng/ml) durchgeführt. Die Nuklearextrakte wurden mit dem *nuclear extract kit* von ACTIVE MOTIF gewonnen. Danach wurde der erzielte Proteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt (Bio-Rad) und die Proben bis zur Versuchsdurchführung bei -80 °C gelagert. Jeweils 2,5 μ g Nuklearextrakt wurden für das *transcription factor assay* (ACTIVE MOTIF) eingesetzt. Die weitere Durchführung des Assays verlief nach Vorgaben des Herstellers mit anschließender Bestimmung der Konzentration der NF κ B-Untereinheiten bei 450 nm mit dem SpectroFluor Plus von TECAN.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem student's t-test gegen die unbehandelte oder TNF α - behandelte Kontrolle. Unterschiede von $p < 0,05$ gelten als signifikant.

3 Ergebnisse

Alle Untersuchungen erfolgten an nicht konfluenten HAoEC, die zum Schutz der Hydrolysate vor einem vorzeitigen Abbau durch fetales Kälberserum (FKS) in Ultroser G-supplementiertem Endothelzellmedium (ECG-MV) kultiviert wurden. Wegen des herstellungsbedingt relativ hohen Gehaltes an NaCl in den Hydrolysaten (bis 63 %) wurde bei einigen Untersuchungen eine Salzkontrolle mit 0,25 mg/ml NaCl (entsprechend einem 50%-igen NaCl-Gehalt bei einer Hydrolysatkonzentration von 0,5 mg/ml) mitgeführt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die mit den Hydrolysaten erzielten Ergebnisse allein durch das NaCl verursacht wurden. Für Untersuchungen an TNF α -stimulierten Zellen wurden TNF α und die Hydrolysate zusammen für 24h auf die Zellen gegeben (Ausnahme cAMP). Voraussetzung für die Durchführung aller Versuche war die mikroskopisch überprüfte den Endothelzellen eigene „Pflasterstein“- Morphologie.

3.1 Screening nach biologisch aktiven Hydrolysaten

Grundlage der vorliegenden Arbeit war das Auffinden biologisch aktiver Hydrolysate aus Casein- und Sojaprotein. So wurde in einem ersten Schritt der Einfluss der verwendeten Hydrolysate auf die Proliferation von Endothelzellen untersucht. Anschliessend wurde in einem zweiten Schritt die Bildung und Freisetzung von vasoaktiven Substanzen nach Inkubation mit Hydrolysaten bestimmt.

3.1.1 Einfluss von Hydrolysaten auf Proliferation und Viabilität der HAoEC

Im ersten Teil des Screenings nach biologisch aktiven Hydrolysaten wurde der Einfluss der Hydrolysate auf die Proliferation und die Viabilität von HAoEC nach 24h Inkubation bestimmt. Die Behandlung der Endothelzellen mit dem Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅ in der Konzentration 10 ng/ml führte zu einer gesteigerten Proliferation ($110 \pm 5\%$; $p < 0,05$). Nach einer 24h Inkubation mit TNF α (0,1 ng/ml) war die Proliferation der HAoEC gehemmt ($79 \pm 6\%$; $p < 0,05$). Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse für die getesteten Caseinhydrolysate, die in Konzentrationen von 0,05 mg/ml bis 2,5 mg/ml zu eingesetzt wurden.

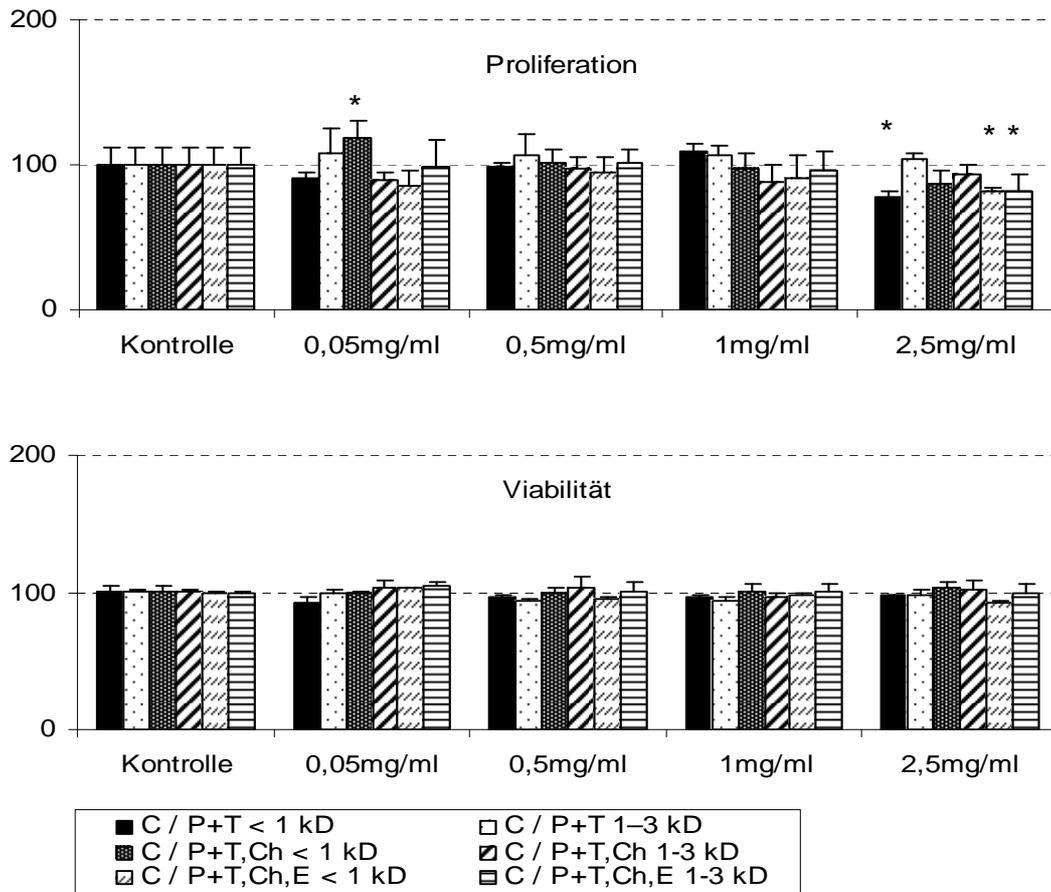


Abbildung 1: relative Proliferation und Viabilität von unstimulierten HAOEC nach 24h Behandlung mit Caseinhydrolysaten (% der Kontrolle); n=3; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; C...Casein, P...Pepsin, T...Trypsin, Ch...Chymotrypsin, E...Elastase, kD...kiloDalton

Wie die Abbildung zeigt, konnte nur C / P+T, Ch < 1 kD in einer Konzentration von 0,05 mg/ml die Proliferation signifikant steigern. Eine signifikante Hemmung (-19 % bis -23 %) der Endothelzellproliferation zeigten drei Caseinhydrolysate bei der höchsten verwendeten Konzentration von 2,5 mg/ml. Im MTT-Viabilitätsassay konnte für keines der getesteten Hydrolysate im untersuchten Konzentrationsbereich ein toxischer Einfluss auf die HAOEC nachgewiesen werden. Die Proliferationsergebnisse der getesteten Sojahydrolysate zeigt Abbildung 2.

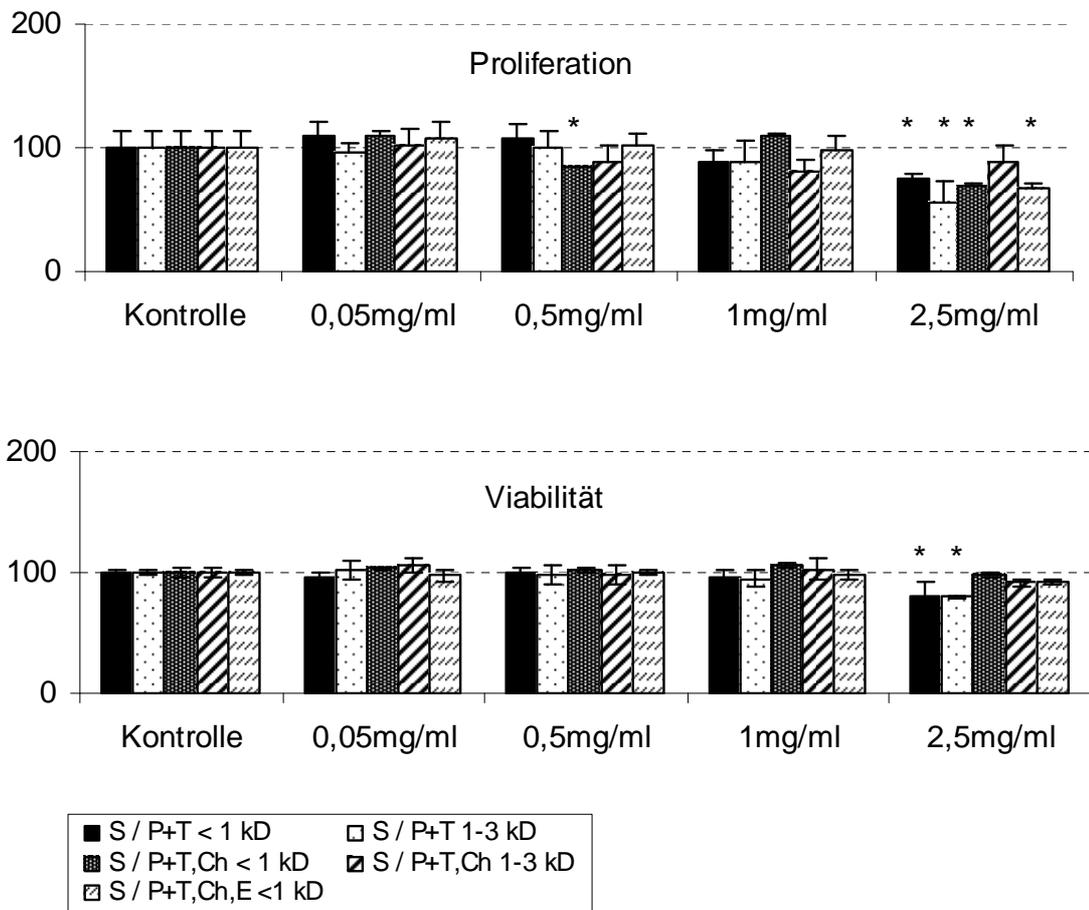


Abbildung 2: relative Proliferation und Viabilität von unstimulierten HAOEC nach 24h Behandlung mit Sojahydrolysaten (% der Kontrolle); n=3; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; C...Casein, P...Pepsin, T...Trypsin, Ch...Chymotrypsin, E...Elastase, kD...kiloDalton

Aus Abbildung 2 geht hervor, dass keines der 5 getesteten Sojahydrolysate in der Lage war, die Proliferation der HAOEC zu steigern. S / P+T,Ch < 1 kD zeigte bei 0,5 mg/ml (-16 %) und 4 der Hydrolysate bei 2,5 mg/ml eine signifikante Hemmung der Endothelzellproliferation (-27 % bis -36 %). Im Viabilitätsassay konnte dabei für die zwei Hydrolysate S / P+T < 1 kD und S / P+T 1-3 kD bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml ein toxischer Einfluss auf die Endothelzellen nachgewiesen werden.

3.1.2 Einfluss von Hydrolysaten auf die Freisetzung vasoaktiver Substanzen

Im zweiten Teil des Screenings nach biologisch aktiven Hydrolysaten wurde der Einfluss der unter 4.1.1. verwendeten Hydrolysate auf die Bildung und Freisetzung des vasodilatatorischen NO, des vasokonstriktorischen Endothelin-1 und der Eicosanoide Prostazyklin (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) untersucht. Die Konzentration von NO und Endothelin-1 im Zellkulturüberstand von unstimulierten Endothelzellen zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Relative Konzentration vasoaktiver Substanzen je mg Zellprotein im Zellmedium der HAoEC nach Behandlung mit Hydrolysaten an unstimulierten Zellen

relative Konzentration vasoaktiver Substanzen (% der Kontrolle)		
Hydrolysat	0,05 mg /ml	0,5 mg /ml
NO (Kontrolle =100 ± 19)		
C / P+T < 1 kD	118 ± 39	135 ± 32 *
C / P+T 1–3 kD	99 ± 30	110 ± 38
C / P+T,Ch < 1 kD	124 ± 31	122 ± 30 *
C / P+T,Ch 1-3 kD	126 ± 32	126 ± 14
C / P+T,Ch,E < 1 kD	128 ± 61	152 ± 52
C / P+T,Ch,E 1-3 kD	162 ± 52	187 ± 22
S / P+T < 1 kD	140 ± 33	154 ± 19 *
S / P+T 1-3 kD	125 ± 20	139 ± 54
S / P+T,Ch < 1 kD	136 ± 32	171 ± 44 *
S / P+T,Ch 1-3 kD	134 ± 62	123 ± 52
Endothelin-1 (Kontrolle =100 ± 16)		
C / P+T < 1 kD	131 ± 22	100 ± 15
C / P+T 1–3 kD	107 ± 18	134 ± 46
C / P+T,Ch < 1 kD	129 ± 37	111 ± 14
C / P+T,Ch 1-3 kD	114 ± 12	112 ± 2
C / P+T,Ch,E < 1 kD	99 ± 8	94 ± 23
C / P+T,Ch,E 1-3 kD	125 ± 6	121 ± 14
S / P+T < 1 kD	112 ± 5	93 ± 7
S / P+T 1-3 kD	104 ± 21	114 ± 15
S / P+T,Ch < 1 kD	97 ± 10	92 ± 23
S / P+T,Ch 1-3 kD	92 ± 21	98 ± 15

n=3; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; NO...Stickstoffmonoxid (nitric oxide), C...Casein, P...Pepsin, T...Trypsin, Ch...Chymotrypsin, E...Elastase, kD...kiloDalton

In der niedrigeren getesteten Konzentration von 0,05 mg/ml zeigte keines der untersuchten Hydrolysate einen Einfluss auf die Freisetzung von NO. Bei 0,5 mg/ml konnten zwei Casein- und zwei Sojahydrolysate die NO-Freisetzung der Endothelzellen signifikant steigern. Auf die Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin-1 hatte keines der untersuchten Hydrolysate in den getesteten Konzentrationen einen Einfluss. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Bildung und Freisetzung von Prostazyklin (gemessen als stabiler Metabolit 6-keto-PGF_{1α}) und

Thromboxan A₂ (gemessen als stabiler Metabolit TXB₂) durch unstimulierte Endothelzellen.

Tabelle 4: Relative Konzentration von Eicosanoiden je mg Zellprotein im Zellmedium der HAoEC nach Behandlung mit Hydrolysaten an unstimulierten Zellen

relative Konzentration vasoaktiver Substanzen (% der Kontrolle)		
Hydrolysat	0,05 mg /ml	0,5 mg /ml
TXB ₂ (Kontrolle =100 ± 5)		
C / P+T < 1 kD	110 ± 9	100 ± 8
C / P+T 1–3 kD	102 ± 3	97 ± 5
C / P+T,Ch < 1 kD	100 ± 11	109 ± 10
C / P+T,Ch 1-3 kD	114 ± 8	97 ± 9
C / P+T,Ch,E < 1 kD	111 ± 45	90 ± 12
C / P+T,Ch,E 1-3 kD	91 ± 9	90 ± 20
S / P+T < 1 kD	99 ± 22	91 ± 15
S / P+T 1-3 kD	113 ± 33	196 ± 144
S / P+T,Ch < 1 kD	115 ± 19	110 ± 25
S / P+T,Ch 1-3 kD	104 ± 10	124 ± 26
6-keto-PGF _{1α} (Kontrolle = 100 ± 9)		
C / P+T < 1 kD	59 ± 11 *	56 ± 9 *
C / P+T 1–3 kD	67 ± 29	209 ± 60
C / P+T,Ch < 1 kD	43 ± 7 *	66 ± 11
C / P+T,Ch 1-3 kD	59 ± 29	147 ± 61
C / P+T,Ch,E < 1 kD	53 ± 16 *	48 ± 27 *
C / P+T,Ch,E 1-3 kD	78 ± 19	76 ± 23
S / P+T < 1 kD	113 ± 13	89 ± 33
S / P+T 1-3 kD	98 ± 51	167 ± 45
S / P+T,Ch < 1 kD	61 ± 22	118 ± 97
S / P+T,Ch 1-3 kD	96 ± 61	182 ± 126

n=3; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; TXB₂...Thromboxan B₂, C...Casein, P...Pepsin, T...Trypsin, Ch...Chymotrypsin, E...Elastase, kD...kiloDalton

Wie die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, hatte keines der 10 getesteten Hydrolysate in den verwendeten Konzentrationen einen Einfluss auf die Freisetzung von Thromboxan B₂. NaCl in der Konzentration von 0,25 mg/ml hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung von TXB₂ (118 ± 25 %). Drei Caseinhydrolysate senkten die Freisetzung von 6-keto-PGF_{1α} in der Konzentration 0,05 mg/ml und zwei Caseinhydrolysate in der Konzentration 0,5 mg/ml. Die untersuchten Sojahydrolysate hatten keinen Einfluss auf die Freisetzung von 6-keto-PGF_{1α}. NaCl in der Konzentration von 0,25 mg/ml hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Freisetzung von 6-keto-PGF_{1α} (135 ± 89 %).

Auf Grundlage der Screeningergebnisse und durch die Gleichartigkeit ihrer enzymatischen Hydrolyse wurden die Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD als biologisch aktive Substanzen für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt.

3.2 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf funktionelle Parameter der HAoEC

3.2.1 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die ACE-Aktivität

Um eine ACE-inhibitorische Wirkung der Hydrolysate als Ursache für die erhöhte NO-Freisetzung auszuschliessen, wurden unstimulierte Endothelzellen 24h mit den beiden Hydrolysaten inkubiert und anschliessend die ACE-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 3.

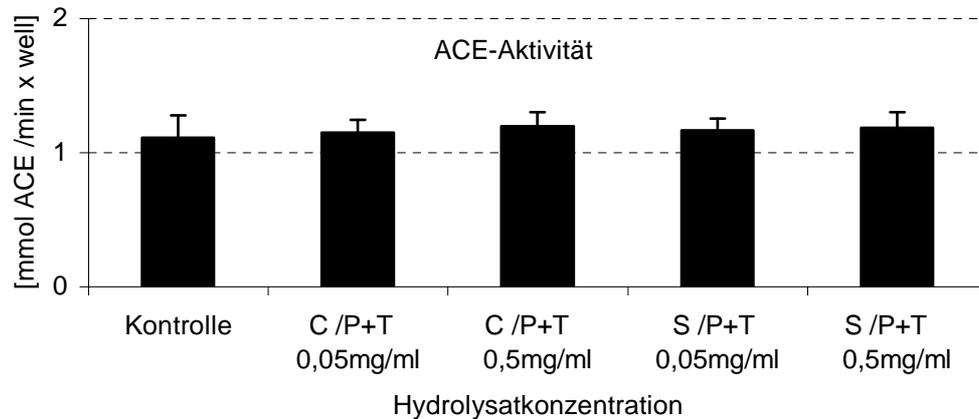


Abbildung 3: Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die ACE-Aktivität von unstimulierten HAoEC; n=8; ACE...angiotensin converting enzyme, C...Casein, S...Soja, P...Pepsin, T...Trypsin

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass keines der beiden Hydrolysate in den getesteten Konzentrationen in der Lage war, die ACE-Aktivität der unstimulierten HAoEC zu beeinflussen. Auch NaCl in der Konzentration 0,25 mg/ml hatte keinen Einfluss auf die ACE-Aktivität ($1,16 \pm 0,01$) gegenüber der zugehörigen Kontrolle ($1,11 \pm 0,02$).

3.2.2 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Bildung von *second messengern*

Ein weiterer Untersuchungsparameter war die Bestimmung der intrazellulären Konzentration der *second messenger* cAMP und cGMP nach 30 min Inkubation mit den Hydrolysaten C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD. Als Positivkontrolle wurden für cAMP der Aktivator der Adenylatcyclase Forskolin (10µM) und für cGMP der Aktivator der Guanylatcyclase BAY 41-2272 (10µM) eingesetzt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die intrazelluläre Konzentration von *second messengern* unstimulierter HAoEC

<i>cyclo AMP</i>	Kontrolle	Forskolin	C/P+T < 1 kD			S/P+T		
[fmol / well]		10µM	0,05 mg /ml	0,5 mg /ml	0,05 mg /ml	0,05 mg /ml	0,5 mg /ml	
unstimuliert	194 ± 35	1981 ± 500 *	206 ± 35	239 ± 78	268 ± 14 *	253 ± 27		
TNFα-stim.	1441 ± 447	2866 ± 189 *	1587 ± 227	1648 ± 496	1567 ± 155	1422 ± 206		

<i>cyclo GMP</i>	Kontrolle	BAY 41-2272	C/P+T < 1 kD			S/P+T		
[fmol / well]		10µM	0,05 mg /ml	0,5 mg /ml	0,05 mg /ml	0,05 mg /ml	0,5 mg /ml	
unstimuliert	5,5 ± 0,5	6,6 ± 0,9	6,3 ± 0,6	6,9 ± 0,9	6,6 ± 0,5 *	5,5 ± 0,2		
TNFα-stim.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	

n=5; * p<0,05 signifikant gegen die Kontrolle, TNFα...tumour necrosis factor α, C...Casein, S...Soja, P...Pepsin, T...Trypsin

Bei unstimulierten HAoEC konnte Forskolin (10 μ M) die Konzentration an cAMP gegenüber der unstimulierten Kontrolle verzehnfachen. Die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cAMP wurde von C / P+T < 1 kD nicht beeinflusst. Nach Inkubation mit S / P+T < 1 kD konnte bei 0,05 mg/ml eine um 39% höhere Konzentration gegenüber der unstimulierten Kontrolle gemessen werden. Bei 0,5 mg/ml zeigte sich tendenziell ($p=0,065$) eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration um 31%. Bei stimulierten Endothelzellen bewirkte die 24h Inkubation mit TNF α (0,2 ng/ml) gegenüber der unstimulierten Kontrolle einen Konzentrationsanstieg von cAMP auf 744%. Forskolin konnte die Konzentration von cAMP gegenüber der stimulierten Kontrolle verdoppeln. Die Hydrolysate hatten keinen Einfluss auf die Konzentration von cAMP an TNF α -stimulierten HAoEC. Die Konzentration des *second messenger* cGMP in unstimulierten Endothelzellen konnte durch den Guanylatzyklase-Aktivator BAY 41-2272 (10 μ M) nicht signifikant erhöht werden. C / P+T < 1 kD hatte in beiden getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Bildung von cGMP. S / P+T < 1 kD konnte wiederum in der Konzentration von 0,05 mg/ml die Konzentration von cGMP um 25 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle erhöhen. In der Konzentration von 0,5 mg/ml hatte das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD keinen Einfluss auf die Bildung von cGMP.

3.2.3 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die NO-Freisetzung von TNF α -stimulierten HAoEC

Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch TNF α -stimulierte (0,2 ng/ml) Endothelzellen nach 24h Inkubation mit C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD zeigt Abbildung 4.

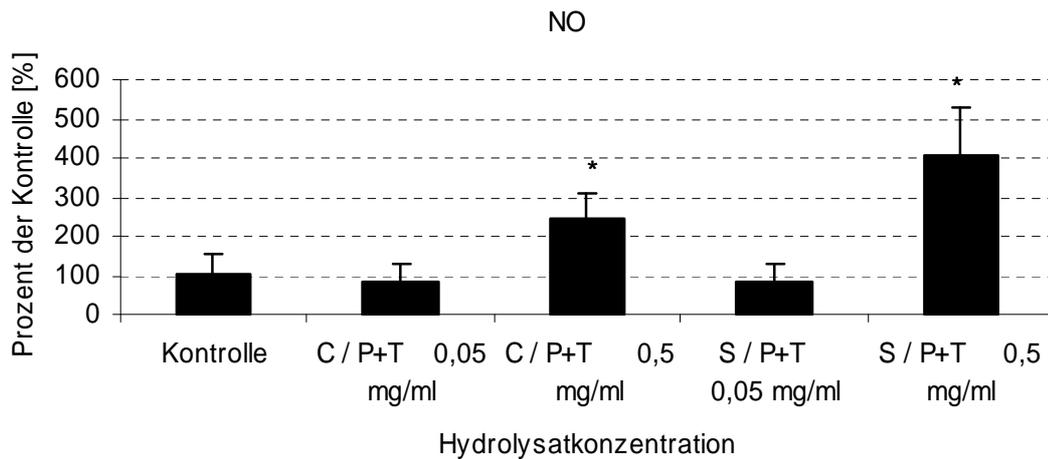


Abbildung 4: relative NO-Freisetzung (% der Kontrolle) von TNF α -stimulierten HAoEC nach 24h Inkubation mit C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD; n=4; * p< 0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; NO...Stickstoffmonoxid (nitric oxide), C...Casein, S...Soja, P...Pepsin, T...Trypsin

In der Konzentration 0,05 mg/ml konnte keines der beiden Hydrolysate die Freisetzung von NO beeinflussen. In der Konzentration 0,5 mg/ml konnte das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD die NO-Freisetzung von TNF α -stimulierten HAoEC deutlich erhöhen (+145 %). Ebenso deutlich erhöhte S / P+T < 1 kD die Freisetzung von NO in der Konzentration von 0,5 mg/ml um 309 %. NaCl in der Konzentration 0,25 mg/ml zeigte tendenziell (p=0,058) eine verminderte NO-Freisetzung (61 \pm 14 %).

3.2.4 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die mRNA-Expression von Endothelzellen

3.2.4.1 eNOS, COX-1 und COX-2

Untersucht wurde die mRNA-Expression der an der Bildung von vasoaktiven Substanzen beteiligten Enzyme eNOS, COX-1 und COX-2 an unstimulierten und an TNF α -stimulierten HAoEC. Die Ergebnisse der Untersuchung an unstimulierten Endothelzellen zeigt die Abbildung 5.

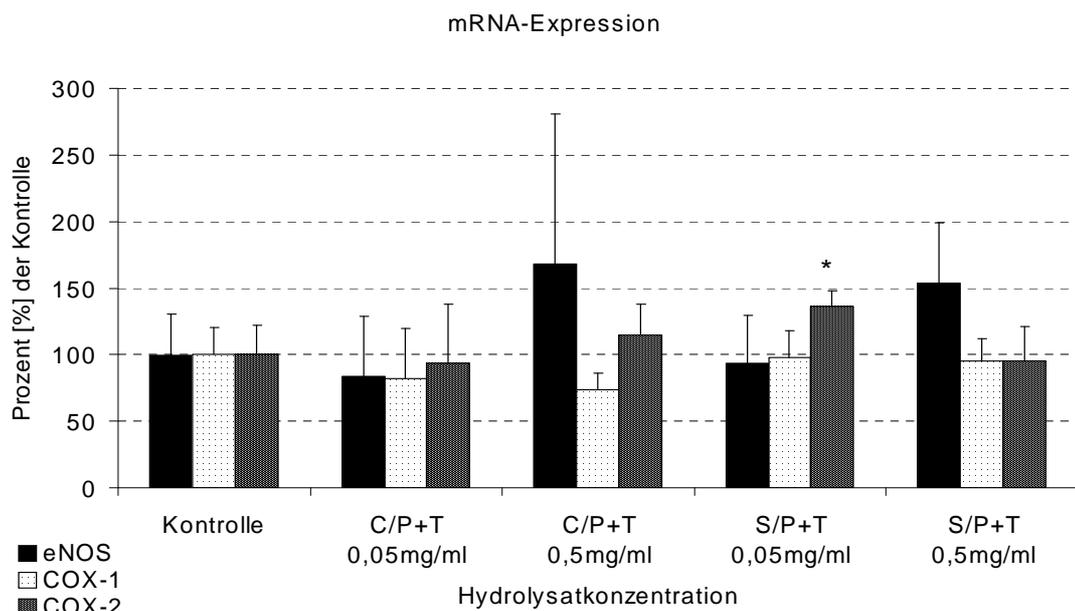


Abbildung 5: relative mRNA-Expression (% der Kontrolle) von eNOS, COX-1 und COX-2 an unstimulierten HAoEC; n=5; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, zeigte keines der beiden Hydrolysate in den verwendeten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression der endothelialen NO-Synthase. Es konnte nur ein tendenzieller Anstieg der mRNA-Expression durch S / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg/ml ($p=0,089$) gezeigt werden. Die mRNA-Expression der COX-1 war bei unstimulierten HAoEC nach Inkubation mit C / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg/ml tendenziell ($p=0,073$) um 27 % niedriger gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD hatte in beiden getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der COX-1. Eine signifikante Erhöhung der mRNA der COX-2 (+ 36%)

zeigte die Inkubation mit S / P+T < 1 kD, jedoch nur in der niedrigeren Konzentration von 0,05 mg/ml.

Abbildung 6 zeigt den Einfluss der beiden Hydrolysate auf die mRNA-Expression von TNF α -stimulierten Endothelzellen.

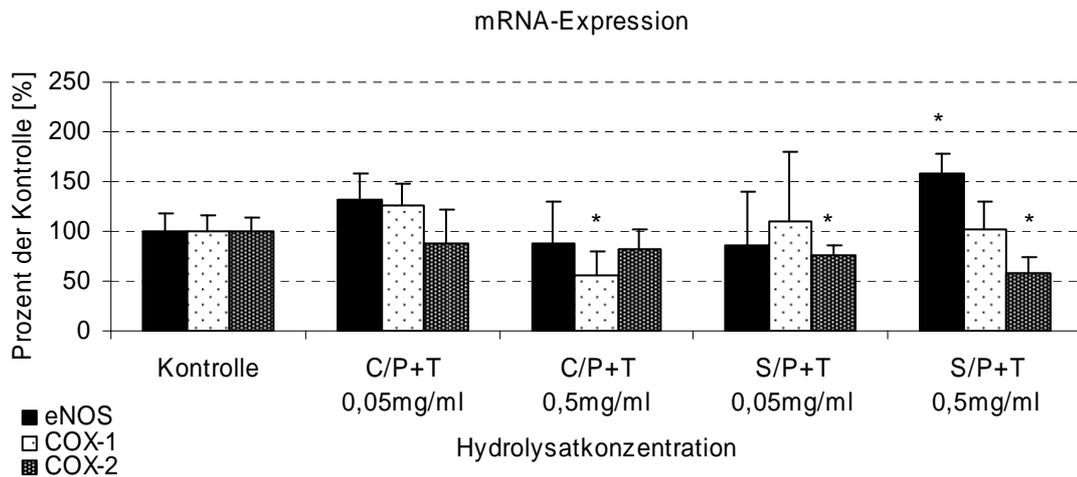


Abbildung 6: relative mRNA-Expression (% der Kontrolle) von eNOS, COX-1 und COX-2 an TNF α -stimulierten HAoEC (TNF α 0,2 ng/ml); n=5; * p< 0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle

Das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der endothelialen NO-Synthase an TNF α -stimulierten HAoEC. Dagegen konnte eine signifikante Erhöhung der eNOS-mRNA (+59 %) für das Sojhydrolysat S / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg/ml ermittelt werden. Die mRNA-Expression der COX-1 war durch C / P+T < 1 kD bei der Konzentration 0,5 mg/ml signifikant niedriger (-43 %) als die Kontrolle. S / P+T < 1 kD hatte dagegen keinen Einfluss auf die COX-1 mRNA. Ebenso hatte C / P+T < 1 kD keinen Einfluss auf die Expression der COX-2-mRNA. Für das Sojhydrolysat S / P+T < 1 kD konnte konzentrationsabhängig gegenüber der Kontrolle eine verminderte mRNA-Expression (-25 % bzw. -42 %) der COX-2 gezeigt werden.

3.2.4.2 E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1

Die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 unter dem Einfluss einer 24h Inkubation mit den Hydrolysaten C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD an unstimulierten Zellen zeigt Abbildung 7.

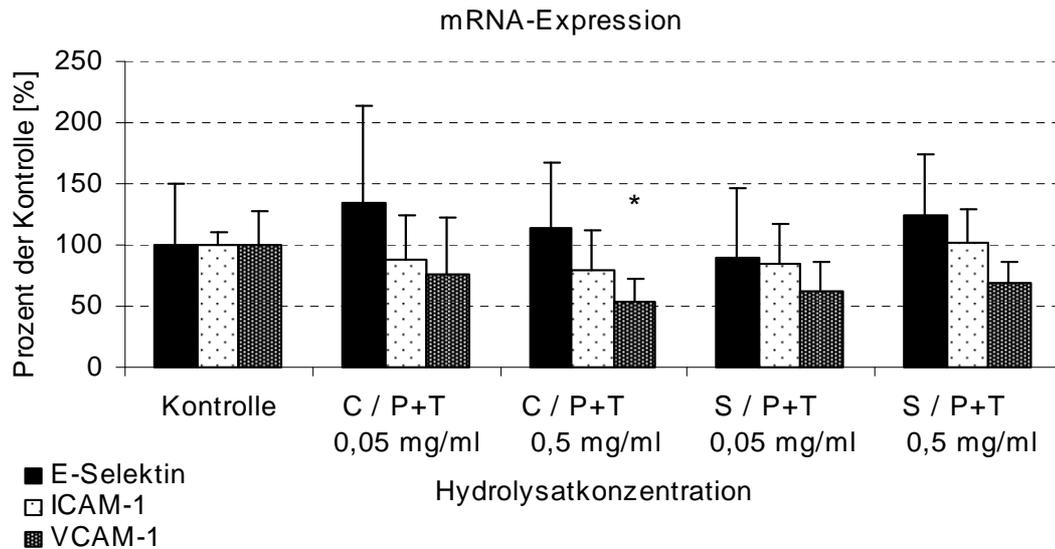


Abbildung 7: relative mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle an unstimulierten HAoEC (% der Kontrolle); n=5; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; ICAM-1...intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1...vascular cellular adhesion molecule-1

Die mRNA-Expression von E-Selektin und ICAM-1 wurde durch die Hydrolysate nicht beeinflusst. Die mRNA-Expression von VCAM-1 war nach Inkubation mit C / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg/ml signifikant um 46 % niedriger als die der Kontrolle. Das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD zeigte in beiden Konzentrationen nur eine tendenziell niedrigere mRNA-Expression des VCAM-1 (-38 % p=0,080 und -31 % p=0,106). Den Einfluss der Hydrolysate auf die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle in TNF α -stimulierten HAoEC zeigt Abbildung 8.

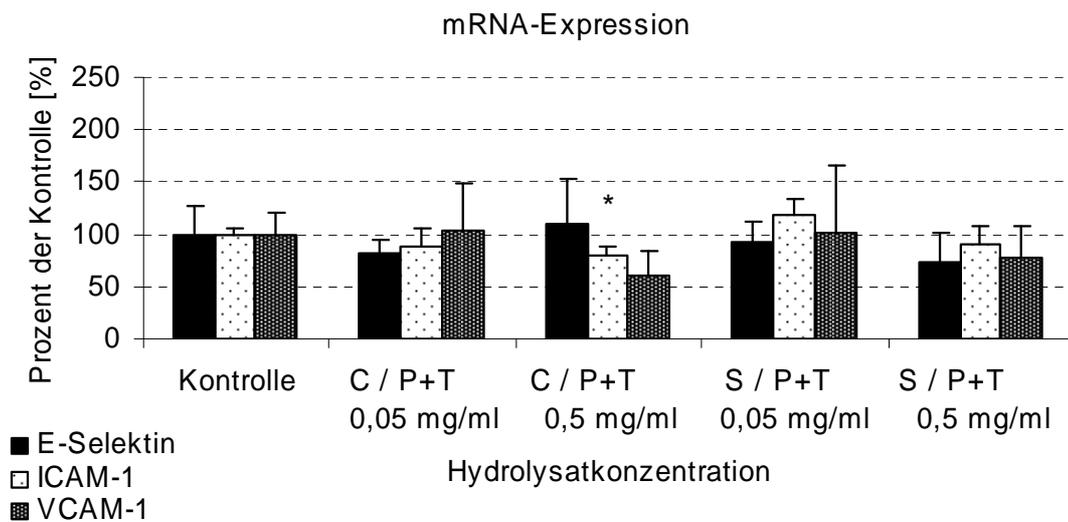


Abbildung 8: relative mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle (% der Kontrolle) an TNF α -stimulierten HAoEC (TNF α 0,2 ng/ml); n=5; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; ICAM-1...intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1...vascular cellular adhesion molecule-1

Nach 24h Inkubation zeigte sich wie bei den unstimulierten Zellen kein Einfluss der Hydrolysate auf die mRNA-Expression des E-Selektin. Bei dem ICAM-1 lag die mRNA-Expression nach Behandlung mit dem Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg/ml signifikant um 19 % niedriger als die der zugehörigen Kontrolle. Die Expression der VCAM-1 mRNA war durch das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD nur tendenziell niedriger als die der Kontrolle (p=0,132). Das Sojhydrolysat S / P+T < 1 kD hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in TNF α -stimulierten Zellen.

3.2.5 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle

Abbildung 9 zeigt die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von unstimulierten Endothelzellen.

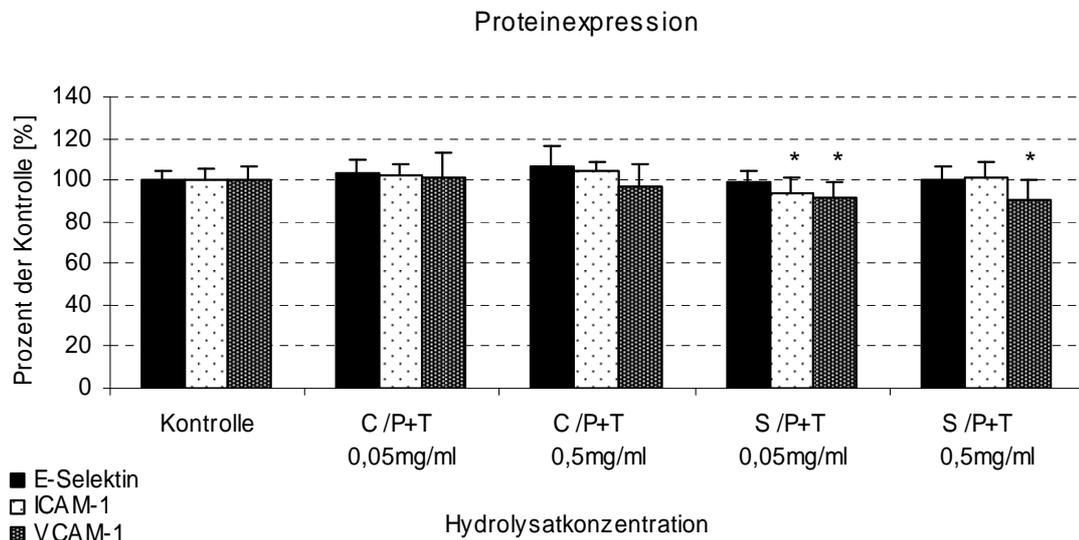


Abbildung 9: relative Protein-Expression der Adhäsionsmoleküle an unstimulierten HAoEC (% der Kontrolle); n=8; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; ICAM-1...intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1...vascular cellular adhesion molecule-1

Vergleichbar der mRNA-Expression zeigte keines der Hydrolysate einen Einfluss auf die Proteinexpression des E-Selektin. Das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD hatte in beiden Konzentrationen auch keinen Einfluss auf die Expression des ICAM-1 und VCAM-1. S / P+T < 1 kD verringerte signifikant in der Konzentration 0,05 mg/ml die Oberflächenexpression des ICAM-1 (-6 %) und des VCAM-1 (-8 %) und in der Konzentration 0,5 mg/ml signifikant die des VCAM-1 (-9 %). NaCl in der Konzentration 0,25 mg/ml senkte die Proteinexpression des ICAM-1 signifikant um 6 % (94 ± 1 %), hatte aber keinen Einfluss auf das VCAM-1 (103 ± 6%). Die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle an TNF α -stimulierten Endothelzellen zeigt Abbildung 10.

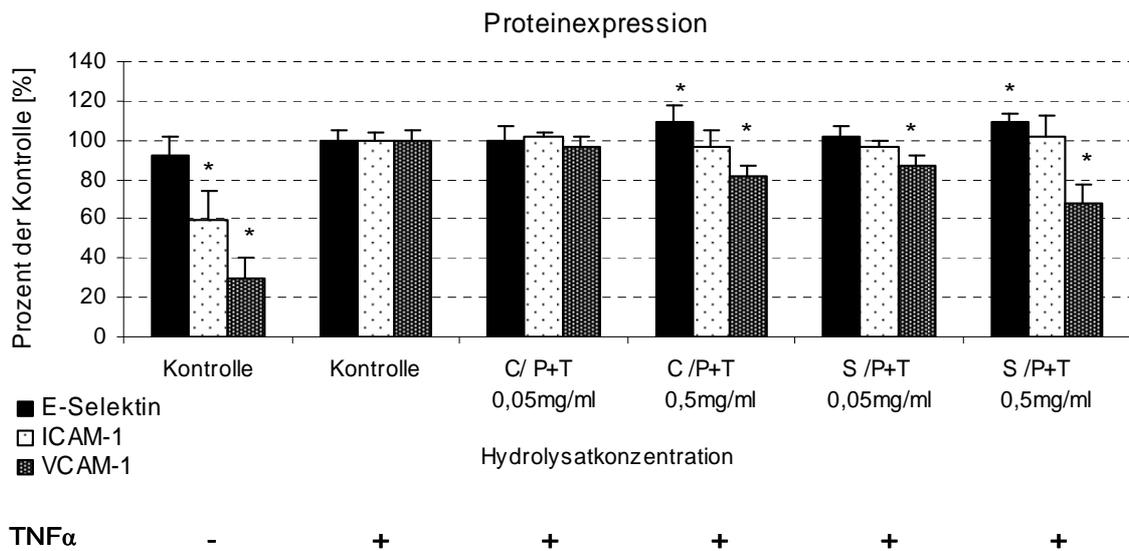


Abbildung 10: relative Protein-Expression der Adhäsionsmoleküle (% der Kontrolle) an TNF α -stimulierten HAoEC (TNF α 0,2 ng/ml); n=8; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle; ICAM-1...intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1...vascular cellular adhesion molecule-1

Die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche von TNF α -stimulierten HAoEC konnte durch TNF α im Falle von ICAM-1 und VCAM-1 gegenüber der unstimulierten Kontrolle deutlich gesteigert werden. Die Proteinexpression von E-Selektin konnte in der Konzentration von 0,5 mg/ml von beiden Hydrolysaten um 9 % (C / P+T < 1 kD) bzw. 10 % (S / P+T < 1 kD) gesteigert werden. Die Proteinexpression von ICAM-1 wurde durch die Hydrolysate in beiden verwendeten Konzentrationen nicht beeinflusst. Die VCAM-1-Proteinexpression war nach Inkubation mit C / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg/ml signifikant um 18 % niedriger als die der TNF α -stimulierten Kontrolle. S / P+T < 1 kD konnte konzentrationsabhängig die Proteinexpression des VCAM-1 um 13 % bzw. 32 % senken (p<0,05). NaCl in der Konzentration 0,25 mg/ml hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression des ICAM-1 (101 \pm 2,5 %) bzw. VCAM-1 (100 \pm 10 %).

3.2.6 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Monozytenadhäsion an HAoEC

Für den funktionellen Adhäsionstest wurden die Endothelzellen nach 24h Inkubation mit den Hydrolysaten mit Monozyten der Zelllinie U 937 inkubiert. Nach 30-minütiger Anheftungszeit zeigte sich für die unstimulierten Endothelzellen das in der Abbildung 11 dargestellte Ergebnis.

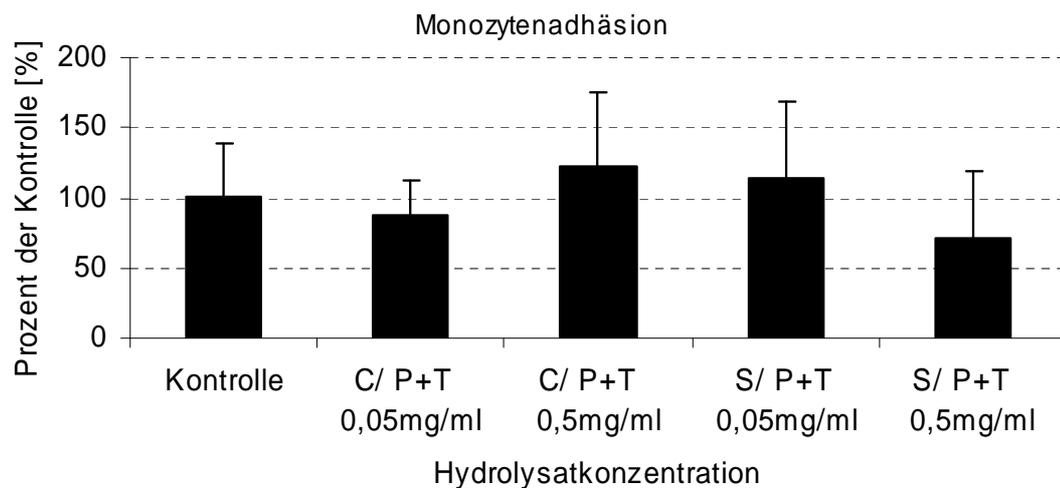


Abbildung 11: relative Monozytenadhäsion der Zelllinie U 937 an unstimulierten HAoEC (% der Kontrolle); n=8

Die Hydrolysate hatten beide in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Monozytenadhäsion von unstimulierten Endothelzellen. Auch NaCl in der Konzentration 0,25 mg/ml hatte keinen Einfluss (98 ± 29 %). Das Ergebnis für die TNF α -stimulierten HAoEC zeigt Abbildung 12.

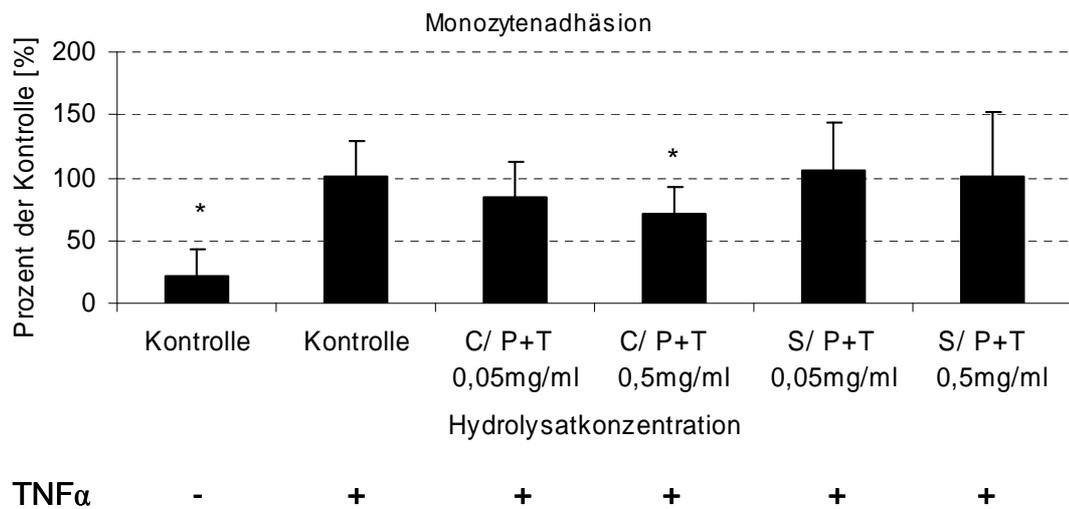


Abbildung 12: relative Monozytenadhäsion der Zelllinie U 937 (% der Kontrolle) an TNF α -stimulierten HAoEC (TNF α 0,2 ng/ml); n=8; * p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle

Nach Stimulation mit TNF α zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Monozytenadhäsion gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Durch das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD wurde die Monozytenadhäsion in der Konzentration 0,5 mg/ml signifikant um 29 % gesenkt. S / P+T < 1 kD hatte keinen Einfluss auf die Monozytenadhäsion von TNF α -stimulierten HAoEC. NaCl in der Konzentration von 0,25 mg/ml hatte ebenfalls keinen Einfluss (122 \pm 45 %).

3.2.7 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Translokation von p 50 und p 65 in den Zellkern

Da die Adhäsionsmoleküle Zielgene des Transkriptionsfaktors NFκB sind, wurden die NFκB-Untereinheiten p 50 und p 65 im Nuklearextrakt von TNFα-stimulierten HAOEC bestimmt. Das Ergebnis nach 4h bzw. 24h Inkubation mit den beiden Hydrolysaten zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: relative Translokation der NFκB-Untereinheiten p 50 und p 65 in den Zellkern von TNFα-stimulierten HAOEC [% der TNFα-stimulierten Kontrolle (Kontrolle+)]

NFκB-UE / Zeit	Kontrolle		Kontrolle+		C / P+T 0,5 mg/ml			S / P+T 0,5 mg/ml		
<i>p 50</i>										
4 h	36	± 2 *	100	± 16	114	± 4	110	± 4		
24 h	44	± 17 *	100	± 21	115	± 6	119	± 12		
<i>p 65</i>										
4 h	31	± 2 *	100	± 10	107	± 3	112	± 3		
24 h	48	± 1 *	100	± 15	107	± 9	131	± 6		

n=3; * p<0,05 signifikant gegenüber der TNFα-stimulierten (TNFα 0,2 ng/ml) Kontrolle (Kontrolle+); NFκB-UE... NFκB-Untereinheit

Die Inkubation mit TNFα verursachte gegenüber der unstimulierten Kontrolle eine deutliche Steigerung der Translokation der NFκB-Untereinheiten p 50 und p 65 in den Zellkern. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, hatte keines der beiden getesteten Hydrolysate in den untersuchten Inkubationszeiten einen Einfluss auf die Translokation der NFκB-Untereinheiten p 50 und p 65.

4 Diskussion

4.1.1 Einfluss von Hydrolysaten auf Proliferation und Viabilität der HAoEC

Die Untersuchung der Endothelzellproliferation wurde als Screeningparameter für das Auffinden biologisch aktiver Hydrolysate gewählt. Die angiogene Aktivierung des Endothels erfolgt hauptsächlich über sekretierte parakrine Faktoren, die als Liganden von Oberflächen-Transmembranrezeptoren ihre Wirkung entfalten. Die wichtigsten angiogenen Transmembranrezeptoren sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosinkinase-assoziierte Rezeptoren und Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Die angiogenen Signaltransduktionskaskaden sind jedoch nur fragmenthaft bekannt. (Abubakar *et. al.*, 1998).

Wie erstmalig gezeigt werden konnte, verursachten einige der untersuchten Hydrolysate in höheren Konzentrationen eine signifikante Inhibierung der Proliferation der HAoEC, eine Steigerung der Proliferation konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Für zwei Sojahydrolysate konnte als Ursache der Hemmung eine konzentrationsbedingte toxische Wirkung der Hydrolysate auf die HAoEC mit Hilfe eines Viabilitätstestes nachgewiesen werden. Proliferationshemmende Eigenschaften konnten bereits für Soja-Isolflavonoide wie Genistein, Daidzein und Orobol an Endothelzellen gezeigt werden (Guo *et. al.*, 2007; Kiriakidis *et. al.*, 2005). In wenigen Studien wurde auch der Einfluß einzelner Peptidsequenzen auf die Proliferation von Endothelzellen untersucht. Peptide, welche die Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) enthalten, können an Tumorzellen und an Tumorendothelzellen binden und deren Proliferation konzentrationsabhängig über die Blockade der alpha (V)-Integrin-Aktivität inhibieren (Yang *et. al.*, 2006). Auch synthetische Tripeptide aus Casein und Sojaprotein zeigten im Gegensatz zu getesteten Dipeptiden eine Beeinflussbarkeit der Proliferation von humanen Endothelzellen der Aorta (Ringseis *et. al.*, 2005). In den Hydrolysaten enthaltene Peptidsequenzen könnten demnach die beobachtete verminderte Zellteilung der HAoEC verursacht haben. Auch strukturelle Ähnlichkeiten von Hydrolysatesequenzen mit dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) können nicht ausgeschlossen werden. ANPs inhibieren cGMP-gekoppelt sowohl die Bildung von VEGF in glatten Muskelzellen (Pedram *et. al.*, 1997), als auch die Aktivierung verschiedener Schlüsselsignalmoleküle (ERK, JNK, p 38) in bovinen

Aortenendothelzellen, die für die VEGF-induzierte Angiogenese von Bedeutung sind (Pedram *et. al.*, 2001).

Die Inkubation der HAoEC mit VEGF und TNF α in der vorliegenden Arbeit führte in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Djurovic *et. al.*, 2004; Nakagami *et. al.*, 2002) zu einer signifikanten Steigerung bzw. Inhibierung der Endothelzellproliferation. Mitogene Substanzen wie VEGF und PDGF wirken über spezifische flt-1 und KDR- Rezeptoren mit anschließenden Autophosphorylierungen und Phosphorylierungen der Signaltransduktionsproteine ERK und MAPK (Ferrara & Davis-Smith, 1997; Guo *et. al.*, 1995). Ebenfalls bekannt ist die Wirkung über den PI3K-abhängigen mTOR-Signalweg (Humar *et. al.*, 2002). Eine konstitutive Aktivierung von PI3-Kinase-Isoformen und downstream-Elementen wie Akt und mTOR potenzieren Proliferation und Zellüberleben und werden in Verbindung mit der Tumorbildung kritisch betrachtet (Brader & Eccles, 2004). mTOR, der eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Zellproliferation durch Phosphorylierung von p70S6K (Aktivierung) und PHAS-I (Inhibierung) (Patti *et. al.*, 1998) einnimmt, zeigt eine Regulierbarkeit über das Leucin-selektive Aminosäuretransportsystem B_{0,+}. Die Aufnahme von Leucin in die Zelle führt zu einer Aktivierung der mTOR-Signalkaskade (Van Winkle *et. al.*, 2006). In den Hydrolysaten enthaltene freie Aminosäuren könnten demnach die Aktivität des mTOR beeinflusst haben. Auch hohe Konzentrationen an Glutamat können über den Cystin-Glutamat-Antiporter in Nervenzellen Apoptose induzieren (Narang *et. al.*, 2003). Die gehemmte Cystin-Aufnahme induziert einen Glutathionmangel, infolge dessen es zu einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle und damit zum programmierten Zelltod kommt. Diese Glutathionmangel-induzierte Apoptose kann durch Aktivierung von stimulatorischen heterotrimeren G-Proteinen, z.B. mit Hilfe von Cholera-Toxin und Phorbolestern (Lewerenz *et. al.*, 2003) oder eine vorübergehende Inhibierung der PI3-Kinase (Levinthal & DeFranco, 2004) beeinflusst werden. In einer *in vivo*-Studie mit Mäusen konnte nach Verabreichung der Aminosäure Glyzin eine verminderte Lebertumorbildung beobachtet werden. Die dabei zugrundeliegende Inhibierung der Endothelzellproliferation wurde vermutlich über eine Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration verursacht (Rose *et. al.*, 1999). Ob die beobachtete Inhibierung der EC-Proliferation in dieser Arbeit durch in den Fraktionen enthaltene freie Aminosäuren ausgelöst wurde, kann ohne weiterführende Untersuchungen, insbesondere einer Analyse der strukturellen Zusammensetzung der Hydrolysate, nicht beurteilt werden.

Die Wirkung von zellulären Mediatoren wie NO und cAMP auf die Endothelzellproliferation muss ebenfalls diskutiert werden. Morbidelli *et. al.* (1996)

konnten nach Inkubation mit NO-Hemmern eine deutliche Verringerung der mitogenen Wirkung von VEGF auf koronare Endothelzellen zeigen. In Endothelzellen verursachte die Hemmung der eNOS einen Anstieg der Apoptose (Munoz-Chapuli *et. al.*, 2004). Eine erhöhte Aufnahme von Arginin als Substrat der endothelialen NO-Synthase kann durch eine vermehrte NO-Bildung zu einer konzentrationsabhängigen Beeinflussung der Proliferation führen (Wu & Morris, 1998). Bei einer humanen *in-vivo*-Studie konnte 1 bis 5 h nach Aufnahme von Sojaprotein mit einer fettreichen Mahlzeit ein erhöhtes Arginin / ADMA-Verhältnis im Blut gemessen werden (Westphal *et. al.*, 2006). Auch *in-vivo*-Studien mit eNOS-knockout-Mäusen zeigten eine gesteigerte Proliferation bei perivasculären Verletzungen (Moroi *et. al.*, 1998). Es ist weiterhin bekannt, dass eine stark erhöhte NO-Freisetzung, beruhend auf dem Aktionspotential als freies Radikal (*NO), zu toxischen Effekten (Kroncke *et. al.*, 2000) z.B. durch Bildung von zytotoxischen Peroxynitriten (ONOO-) und Peroxynitrosäure (ONOOH) (Jude *et. al.*, 1999; Lee *et. al.*, 2000) mit Superoxidanionen führen kann. In der vorliegenden Arbeit könnte die bei dem Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD konzentrationsabhängige, signifikant erhöhte NO-Freisetzung in Zusammenhang mit der beobachteten Inhibierung der HAoEC stehen. Das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD bewirkte zwar auch eine erhöhte NO-Freisetzung, hier konnte aber bereits ein direkter toxischer Effekt des Hydrolysates in der Konzentration 2,5 mg / ml als ursächlich für die Inhibierung der Proliferation der HAoEC nachgewiesen werden.

Der cAMP / PKA-Signalweg ist in Endothelzellen (Leitman *et. al.*, 1986) ein bedeutender Inhibitor der mitogen-aktivierten MAPK-Kaskade und damit der Zellproliferation. Für cAMP-steigernde Substanzen sind in der Literatur viele die Atherogenese beeinflussende Wirkungen beschrieben. Proliferationshemmende Eigenschaften wurden für Aorten-Endothelzellen bereits mehrfach nachgewiesen (Kim *et. al.*, 2002; Yin *et. al.*, 2000), während bei anderen Zelllinien ein stimulierender Effekt auf die Proliferation gezeigt werden konnte (D'Angelo *et. al.*, 1997; Vossler *et. al.*, 1997; MacNicol & MacNicol, 1999). Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in bovinen Hirnkapillar-Endothelzellen inhibiert die VEGF- und bFGF-induzierte Zellproliferation (D'Angelo *et. al.*, 1997). Bereits die basale PKA-Aktivität der Zellen ist ausreichend, die Aktivierung über die RAF-1 / MAPK-Kaskade konstitutiv zu unterdrücken. Nach Inkubation mit dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD (0,05 mg / ml) konnte in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in den HAoEC beobachtet werden. Da nur bei zwei Hydrolysaten der Einfluß auf die cAMP-Konzentration gemessen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch

andere getestete Hydrolysate in der Lage sind, die cAMP-Konzentration in den HAOEC zu steigern und dadurch die beobachtete Inhibierung der Proliferation zu verursachen.

Starke antiproliferative und antiangiogene Eigenschaften werden auch für ACE-Inhibitoren beschrieben (Tschudi *et. al.*, 1997; Ambrosioni *et. al.*, 2001). Peptide mit ACE-inhibitorischer Wirkung konnten bereits aus Kasein und Molke (FitzGerald & Meisel, 2000; Pihlanto-Leppälä, 2001) aber auch aus verschiedenen anderen pflanzlichen und tierischen Proteinen isoliert werden (Yamamoto *et. al.*, 2003; Yamamoto, 1997). Eine eventuelle unspezifische Inhibierung der Zelloberflächen-Peptidase ACE durch Peptidsequenzen aus den getesteten Hydrolysaten könnte ursächlich für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hemmung der Endothelzellproliferation sein.

Die wissenschaftliche Bewertung der erhaltenen Ergebnisse ist schwierig, da die Bedeutung der Proliferation von Endothelzellen für die Atherogenese in der Literatur sehr umstritten ist. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich beim gesunden Erwachsenen nur jeweils 0,01 % der Zellen in einer Zellteilung (Hobson & Denekamp, 1984). Eine gesteigerte vaskuläre Proliferation wird daher in Zusammenhang mit der Pathobiologie der Atherosklerose und anderen zellulären Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Apoptose und Matrixveränderungen diskutiert. Antiproliferative Therapien werden bei akuten und lokalisierten Gefässerkrankungen wie Thrombosen und Gefäßverletzungen als sinnvoll erachtet, bei der langsam und diffus verlaufenden Atherosklerose scheint eine Indikation dagegen nicht gegeben. Eine Langzeittherapie mit antiproliferativen Substanzen bei glatten Muskelzellen könnte bei atherosklerotischen Läsionen durch Schwächung der fibrösen Kappe zu einem Anstieg von akuten Gefäßrupturen führen (Dzau *et. al.*, 2002).

Bei der Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse muss auch berücksichtigt werden, dass die Inhibierung der Proliferation der HAOEC *in vitro* außer bei C / P+T, Ch < 1 kD nur in der jeweils höchsten getesteten Konzentration von 2,5 mg / ml beobachtet wurde. Es ist daher unwahrscheinlich, dass *in vivo* im Blut so hohe Konzentrationen an bioaktiven Peptidsequenzen aus Nahrungsproteinen erreicht werden, da viele potentielle Barrieren zwischen gastrointestinalem Verdau, Absorption und Erreichen des kardiovaskulären Systems überwunden werden müssen (Vermeirssen *et. al.*, 2004). Auch wird die mittlere Halbwertszeit verschiedener Peptide im Blut mit nur durchschnittlich 1 Minute angegeben, da sie von im Blut zirkulierenden Peptidasen sehr schnell abgebaut werden (Gardner, 1984). Es sind bis heute noch keine *in-vivo*-Studien veröffentlicht worden, in denen eine Beeinflussung der

Endothelzellproliferation von Aortenzellen nach Zufuhr von Nahrungsprotein-Hydrolysaten untersucht wurde.

4.1.2 Einfluss von Hydrolysaten auf die Freisetzung vasoaktiver Substanzen

Die Freisetzung vasoaktiver Substanzen durch die Endothelschicht der Blutgefäße ist ein wichtiger Bestandteil der Regulierung von Permeabilität und Blutdruck. Die wichtigsten bekannten Mediatoren sind Stickstoffmonoxid, Endotheline und Eicosanoide wie Prostazyklin und sein Gegenspieler Thromboxan A₂.

4.1.2.1 Freisetzung von NO und ET-1

Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 (ET-1) gelten als die wichtigsten von Endothelzellen gebildeten Vasodilatoren bzw. Vasokonstriktoren. NO hat neben seiner Wirkung als Vasorelaxans auch einen inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation der glatten Muskelzellen, die Monozytenadhäsion, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Endothelin-Synthese.

4 der getesteten 10 Hydrolysate verursachten in der vorliegenden Arbeit an unstimulierten HAoEC nach 24 h Inkubation eine signifikant erhöhte NO-Freisetzung. Während NO cGMP-gekoppelt in geringen Konzentrationen in TNF α -induzierten HUVEC die Apoptose inhibiert, verstärkt es in hohen Konzentrationen, z.B. nach Induzierung der iNOS, den TNF α -induzierten programmierten Zelltod (Shen *et. al.*, 1998; Moncada & Higgs, 1995). Sowohl für NO (Nguyen *et. al.*, 1992) als auch für Peroxynitrite (Epe *et. al.*, 1996) wurden bereits direkte DNA-zerstörende Wirkungen beschrieben. In Regionen mit atherosklerotischen Läsionen wird häufig ein veränderter Endothelzellen-Turnover beobachtet, der auf eine erhöhte Apoptose von Endothelzellen zurückzuführen sein könnte (Caplan & Schwartz, 1973). Da die nach Inkubation mit dem Hydrolysat S / P+T, Ch < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg / ml gemessene erhöhte NO-Freisetzung in der gleichen Größenordnung wie bei den 3 anderen Hydrolysaten liegt, bei denen sich in dieser Konzentration kein Einfluß auf die Proliferation der EC zeigte, ist ein Zusammenhang mit der signifikanten Verringerung der Proliferation unwahrscheinlich, kann aber ohne weiterführende Untersuchungen auch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die Induzierung der iNOS kann als Ursache für die erhöhte NO-Freisetzung ausgeschlossen werden. In Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Autoren (Buttery *et. al.*, 1996) konnte die mRNA der induzierbaren NO-Synthase auch nach

Stimulierung mit TNF α in dieser Arbeit, ebenso wie bei HUVEC in Binion *et. al.* (1998) und BAEC in Cho *et. al.* (2004), nicht nachgewiesen werden.

Für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) sind zahlreiche Möglichkeiten ihrer zellulären Regulierung beschrieben, auf transkriptioneller Ebene z.B. über Scherstress, Östrogene, Hypoxie, auf translationeller Ebene z.B. über LPS, VEGF und TNF α . TNF α inhibiert NF κ B-gekoppelt die eNOS-Promotoraktivität in BAEC (Anderson & Moore, 2004). In physiologischen Konzentrationen (0,1 ng / ml) wirkt es transkriptionell und posttranskriptionell auf die eNOS-Genexpression und kann die Halbwertszeit der eNOS von 48 auf bis zu 3 Stunden verringern (Michel *et. al.*, 1993). Nach Applikation von TNF α wurden durch Johnson *et. al.* (1994) eine verminderte NO-Konzentration in bovinen pulmonalen Endothelzellen und in vivo durch Wang *et. al.* (1994) eine endothelvermittelte verringerte Relaxation in Ratten beobachtet. Untersuchungen der eNOS-mRNA-Expression oder der Stabilität der mRNA nach Stimulierung mit TNF α im Vergleich mit unstimulierten HAoEC wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD bewirkten aber in der Konzentration 0,5 mg / ml bei TNF α -stimulierten HAoEC eine höhere relative NO-Freisetzung gegenüber der Kontrolle als bei unstimulierten Zellen.

In klinischen Studien wird bei Atherosklerose oft eine verschlechterte NO-Freisetzung (Husain *et. al.*, 1998), aber eine unveränderte Konzentration von 2,3-dinor PGF-1 α im Urin (FitzGerald *et. al.*, 1984) beobachtet. Studien an scherstressinduzierten HUVEC (Osanai *et. al.*, 2000) lassen auf einen Crosstalk zwischen NO und PGI $_2$ schließen. So verursachte die verminderte Freisetzung von NO durch Inhibitoren der NO-Synthasen bzw. Guanylatzyklen eine cGMP-gekoppelte vermehrte Bildung von PGI $_2$. Das PGI $_2$ -Analog Beraprost ist in der Lage, cAMP-gekoppelt transkriptionell und posttranskriptionell die Expression der eNOS zu steigern (Niwano *et. al.*, 2003). Sehr hohe Konzentrationen von NO, wie sie nach Expression der iNOS freigesetzt werden können, verursachten an PAEC (Takeuchi *et. al.*, 2004) eine cGMP-unabhängige, verminderte intrazelluläre Kalziumkonzentration, infolge dessen eine reduzierte PGI $_2$ -Synthese und eine verringerte eNOS-Expression und -aktivität beobachtet wurden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der für das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD an unstimulierten HAoEC gemessenen erhöhten NO-Freisetzung und der verminderten Prostazyklinsynthese kann deshalb ohne weiterführende Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

Die posttranslationale Aktivierung der eNOS, z.B. über Protein-Protein-Bindungen mit Calmodulin und Hsp 90, oder über die Verfügbarkeit ihres Substrates Arginin

(Ogonowski *et. al.*, 2000), bzw. des benötigten Co-Faktors BH4 (Tetrahydrobiopterin) (Govers & Rabelink, 2001) kann ebenfalls zu einer veränderten NO-Freisetzung führen. In großen Arteriolen lässt sich die Aktivierung der eNOS anhand ihrer Translokation in die zytosolische Fraktion erkennen. Bei in vivo-Studien an Hamstern ist die eNOS in Arteriolen und Venen zu 67 % membrangebunden (Venema *et. al.*, 1997). In vitro, in kultivierten Endothelzellen, waren 85 – 90 % des Enzymes in mikrosomalen Fraktionen durch Bindung an Caveolin inaktiviert (Figueroa *et. al.*, 2001). Ob die getesteten Hydrolysate in der Lage sind, die Aktivität der eNOS als Ursache für die erhöhte NO-Freisetzung über eine Beeinflussung der intrazellulären Kalzium-Konzentration oder eine Freisetzung der membrangebundenen eNOS aus Caveolen zu bewirken, müsste in weiterführenden Studien getestet werden.

Die Aktivierung der eNOS erfolgt u.a. auch nach Stimulierung mit ET-1 und Bradykinin über Aktivierung der Phospholipase C, gekoppelt mit einer erhöhten Freisetzung von Inositol-1,4,5-Triphosphat und einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Der dadurch vermehrt gebildete Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex interagiert mit der eNOS-Bindungsstelle, was zu einer gesteigerten Aktivität des Enzymes führt (Marrero *et. al.*, 1999). Ringseis konnte bereits zeigen, dass synthetische Di- und Tripeptide aus Soja und Casein die NO- und die Endothelinfreisetzung von HAoEC beeinflussen (Ringseis *et. al.*, 2005). Endothelin-1 als starker Vasokonstriktor bewirkt einerseits über den ET_A -Rezeptor der glatten Muskelzellen eine Kontraktion der glatten Muskelzellen. Andererseits bewirkt es über den ET_B -Rezeptor der Endothelzellen als Feedback-Mechanismus eine gesteigerte PKB / Akt – Phosphorylierung mit anschließender Phosphorylierung der eNOS und daraus resultierender Bildung von NO durch die Endothelzellen. Diese wird über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des ET_B -Rezeptors vermittelt (Liu *et. al.*, 2003). In neueren Studien (Eva *et. al.*, 2006; Scheiner-Bobis *et. al.*, 2006) wird dieser Feedback-Mechanismus auch durch Stimulierung der Natrium-Pumpe (Na^+ / K^+ - ATPase) durch das Herzsteroid Ouabain (Inhibitor der Natrium-Pumpe) in niedrigen Konzentrationen ausgelöst, dieser ist aber ET_B -Rezeptor-unabhängig. Nach Inkubation mit den 10 Hydrolysaten konnte jedoch keine Veränderung der ET-1 – Bildung gemessen werden. Somit kann in der vorliegenden Arbeit bei unstimulierten Zellen eine Beeinflussung der NO-Synthese durch ET-1 als Ursache für die erhöhte NO-Freisetzung ausgeschlossen werden.

Eine weitere mögliche Ursache für die erhöhte Freisetzung von NO könnten Peptidsequenzen mit ACE-inhibitorischer Wirkung sein, die über Bradykinin eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase bewirken (Govers & Rabelink, 2001; Takeuchi *et. al.*, 2004). Peptide mit ACE-inhibitorischer Wirkung konnten aus Casein

und Molke (FitzGerald & Meisel, 2000; Pihlanto-Leppälä, 2001) aber auch aus verschiedenen anderen pflanzlichen und tierischen Proteinen isoliert werden (Yamamoto *et. al.*, 2003; Yamamoto, 1997). Da die verwendeten Hydrolysatkonzentrationen (einzelne Peptidsequenzen) in den ACE IC_{50} -Wert (Konzentrationsbereiche von 2 μ M für potente ACE-Inhibitoren wie Ile-Pro-Pro und Val-Ala-Pro bis zu 1mM für weniger potente ACE-Inhibitoren) (FitzGerald *et. al.*, 2004) fallen, wurden die Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf eine Beeinflussung der Oberflächenpeptidase ACE hin untersucht. Eine Veränderung der ACE-Aktivität der HAoEC durch Inkubation mit Hydrolysaten konnte nicht nachgewiesen werden, so dass ein Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf die in den Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden kann.

Die durch Inkubation mit den Hydrolysaten beobachtete erhöhte Freisetzung des vasodilatatorischen NO kann als eher antiatherogen eingestuft werden. Ein wichtiger Faktor dafür ist, dass die Bildung von NO nicht über eine Induzierung der iNOS erfolgt, deren Expression überwiegend auf Bereiche mit atherosklerotischen Veränderungen beschränkt ist (Buttery *et. al.*, 1996). Dagegen konnte durch Inkubation mit dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD die Expression der eNOS-mRNA bei unstimulierten HAoEC tendenziell und bei TNF α -stimulierten HAoEC signifikant gesteigert werden. Auf die Expression des Vasokonstriktors ET-1 hatten die Hydrolysate bei unstimulierten Endothelzellen keinen Einfluss. Das bedeutet, dass es zu einer Verschiebung des Verhältnisses NO : ET-1 zugunsten des Vasodilators NO kommt. Ebenfalls positiv zu werten ist, dass die NO-Freisetzung auch bei TNF α -induzierten HAoEC erhöht werden konnte, da bei atherosklerotischen Prozessen die NO-Freisetzung durch die eNOS meist verschlechtert ist (Husain *et. al.*, 1998). Eine Bestimmung der ET-1 Freisetzung bei TNF α -stimulierten HAoEC wäre nötig, um das erhaltene Ergebnis besser beurteilen zu können.

4.1.2.2 Freisetzung von PGI₂ und TXA₂

Die wichtigsten Eicosanoide für die Kontrolle der Hämostase und des Blutflusses durch Beeinflussung von Blutplättchen und der Funktion der glatten Muskelzellen sind Prostazyklin (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) (Wise *et. al.*, 2002). PGI₂ bewirkt über G_s-proteingekoppelte Prostazyklinrezeptoren der Blutplättchen eine cAMP / PKA-gekoppelte Inaktivierung und dadurch verminderte Anheftung der Blutplättchen. Dies zeigen auch Studien an PGI₂-Rezeptor-Knockout-Mäusen, die eine höhere Anfälligkeit für die Entwicklung von Thrombosen aufweisen (Moncada, 1982; Kobayashi *et. al.*, 2004). In-vitro und in-vivo-Studien lassen darauf schliessen, dass die COX-1 in

gesundem Aortengewebe im Gegensatz zur COX-2 die größere funktionelle Beteiligung an der Synthese von PGI₂ und TXA₂ hat (Byrne *et. al.*, 2003; Kawka *et. al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit inhibierten 3 Caseinhydrolysate an unstimulierten HAoEC die Freisetzung von 6-keto-PGF1 α um durchschnittlich ca. 50 %. Nach Inkubation mit dem Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD wurde neben der verminderten Freisetzung von PGI₂ bei weiterführenden Untersuchungen eine zumindest tendenziell verringerte Konzentration der COX-1-mRNA gemessen. Die getesteten Sojahydrolysate hatten dagegen keinen Effekt. Auch das akute-Phase-Protein CRP, ein unspezifischer Entzündungsmarker, vermindert in HAECs die Freisetzung von PGI₂, bei unstimulierten Zellen um 48 % und bei stimulierten Zellen um 26 % (Venugopal *et. al.*, 2003). CRP wird durch eine Vielzahl von Studien heute als proatherogene Substanz angesehen (Yeh & Willerson, 2003; Tomai *et. al.*, 2001; Cleland *et. al.*, 2000). Es induziert zusätzlich die iNOS und trägt so zur Bildung von zellschädigenden Peroxynitriten bei (Zou *et. al.*, 1999; Schmidt *et. al.*, 2003).

In humanen Endothelzellen wird TXA₂ auch über die COX-1 gebildet. Die Freisetzung von TXA₂ wurde an unstimulierten EC durch keines der Hydrolysate beeinflusst. Da die Relation von PGI₂ zu TXA₂ ein kritischer Faktor bei der Regulierung des Blutdrucks und der Inhibierung von Thrombosen ist, muss die verminderte Freisetzung von PGI₂ nach Inkubation mit den Casein-Hydrolysaten als proatherogen eingestuft werden.

Die COX-2 konnte von Caughey *et. al.*, (2001) in gesundem Arterien- und Venen-Gewebe ebenso wie in Dual-Immunofluoreszenzstudien von Kawka *et. al.* (2007) an unstimulierten humanen Aortenzellen nicht nachgewiesen werden. PGI₂-Synthase und COX-1 wurden hingegen in Endothelschicht und Intima coexprimiert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit die COX-2-mRNA auch an unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. Grössere Mengen PGI₂ und PGE₂ werden vornehmlich nach Induzierung der COX-2 gebildet, während die TXA₂-Konzentration nur wenig erhöht wird (Caughey *et. al.*, 2001). Die COX-2 mRNA war nach 24h Inkubation mit dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,05 mg / ml signifikant erhöht, die Freisetzung von PGI₂ blieb aber unverändert. Xie *et. al.* (1994) konnten in Serumstudien von Mäusen zeigen, dass das cAMP-response-element in der Promotorregion der COX-2 kritisch ist für dessen Regulierung. Auch wurde eine Beteiligung des cAMP-response-elements nach Aktivierung des MAPK-Weges durch Herschman *et. al.* (1997) nachgewiesen. Die durch das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,05 mg / ml ebenfalls signifikant erhöhte cAMP-

Konzentration könnte demnach eventuell in Zusammenhang mit der erhöhten COX-2 mRNA stehen.

Bei TNF α -stimulierten HAoEC wurden die Konzentrationen der mRNA der COX-1 und der COX-2, nicht jedoch die Bildung und Freisetzung von Eicosanoiden untersucht. Die mRNA-Konzentration der COX-1 bei TNF α -stimulierten Zellen war nach Inkubation mit dem Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,5 mg / ml signifikant erniedrigt. Das Sojhydrolysat S / P+T < 1 kD bewirkte dagegen konzentrationsabhängig eine signifikant verminderte mRNA-Konzentration der COX-2.

Erhöhte Konzentrationen von TXA₂ können bei verschiedenen Thrombosen und Gefässkrankheiten nachgewiesen werden (Ogletree, 1987). Ashton *et. al.* (2003) konnten zeigen, dass TXA₂ die Bildung von Adhäsionsmolekülen und damit die Umwandlung der endothelialen Oberfläche in ein vor-thrombotisches Stadium induziert. Eine Inhibierung der TXA₂-Rezeptoren mit dem Antagonisten S 18886 reduziert diese agonisten-induzierte Expression der ICAM-1 und die Adhäsion von mononuklearen Zellen. Vergleichbare Ergebnisse fanden wir bei TNF α -stimulierten HAoEC nach Inkubation mit C / P+T < 1 kD. Neben der Inhibierung der COX-1-mRNA konnten wir eine signifikant verminderte ICAM-1-mRNA-Konzentration, eine signifikant verminderte Monozytenadhäsion und zusätzlich eine signifikant verringerte Expression der VCAM-1 nachweisen. Die Inhibierung der COX-1-Aktivität mit ASA führt bei IL-1beta-stimulierten Zellen zu einer verminderten TXA₂-Synthese (Caughey *et. al.*, 2001). Ob die verminderte mRNA-Expression der COX-1 in Zusammenhang mit den erhaltenen Ergebnissen steht oder die TXA₂ - Freisetzung beeinflusst hat, müsste in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden. In vivo ist aber davon auszugehen, dass bei entzündlichen Prozessen TXA₂ überwiegend über aktivierte Blutplättchen oder geschädigte Gefässwände freigesetzt wird (Cayatte *et. al.*, 2000). In Blutplättchen wird TXA₂ ausschließlich durch die COX-1 gebildet (Needleman *et. al.*, 1976), eine Inhibierung der COX-1 führt daher zu einer längerfristigen Inhibierung der TXA₂-Synthese, da keine de novo-Synthese stattfindet (Jaffe & Weksler, 1979). Weiterführende Untersuchungen könnten zeigen, ob das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD auch die COX-1 mRNA-Synthese in Blutplättchen beeinflussen kann.

Die COX-2 wird in atherosklerotischen Läsionen stark exprimiert (Bishop-Bailey *et. al.*, 1997; Belton *et. al.*, 2000; Schonbeck *et. al.*, 1999). Es sind auf dem COX-2-Promotor verschiedene transkriptionelle Regulationselemente bekannt, u.a. NF- κ B. Dieser vermittelt die Induktion der COX-2 als Antwort auf Zytokine und freie Radikale

(Adderley & FitzGerald, 1999; Schmedtje *et. al.*, 1997). Das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD verursachte konzentrationsabhängig eine signifikante Verringerung der COX-2-mRNA an TNF α -stimulierten HAoEC. Ein inhibitorischer Einfluß auf die Translokation von NF- κ B kann aber als Ursache für die verringerte COX-2-mRNA-Expression ausgeschlossen werden. Nach Inhibierung der COX-2 an IL-1beta-stimulierten HUVEC analysierten Caughey *et. al.* (2001) einen 90 %igen Rückgang der Eicosanoide PGI₂ und PGE₂. Während geringe PGI₂-Konzentrationen eine Inaktivierung von Blutplättchen über Stimulierung der IP-Rezeptoren bewirken, verursachen hohe PGI₂-Konzentrationen über die EP3-Rezeptoren der Blutplättchen eine Inhibierung der Adenylatzyklase, was zu einer Wiederherstellung der Plättchenaktivität führt (Wise *et. al.*, 2002). Nach Inkubation mit dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD konnte aber im Gegensatz zu dem Caseinhydrolysat kein Einfluss auf die Monozytenadhäsion von TNF α -inkubierten HAoEC festgestellt werden. Das könnte bedeuten, dass weder die erhöhte NO-Freisetzung cGMP-gekoppelt noch eine eventuell veränderte PGI₂-Freisetzung cAMP-gekoppelt die Aktivität von Blutplättchen beeinflussen. Weiterführende Studien, z.B. die Bestimmung der Freisetzung von Eicosanoiden an TNF α -stimulierten HAoEC und die Proteinexpression von COX-1 und COX-2 könnten Hinweise über die zugrundeliegenden Zusammenhänge und Wirkmechanismen geben und helfen, das erhaltene Ergebnis zu werten. Es ist bekannt, dass klinisch bei Arthritis und anderen Schmerzsymptomen eingesetzte selektive Inhibitoren der COX-2 (COXIBs) laut neueren Studien zunehmend unter Verdacht stehen, ein erhöhtes Thromboserisiko auszulösen (Steffel *et. al.*, 2005). Einen ungünstigen Einfluss auf das vermehrte Auftreten von Herzinfarkten zeigt in diesem Zusammenhang eine Studie an Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit COX-2-Hemmern behandelt wurden (Bombardier *et. al.*, 2000). Da nach Inkubation mit dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD neben der verringerten COX-2 mRNA-Konzentration auch eine verringerte Expression des VCAM-1, eine erhöhte NO-Freisetzung und eine signifikant erhöhte mRNA-Expression der eNOS verursacht wurden, kann man trotzdem schlussfolgern, dass bei kultivierten HAoEC ein antiatherogener Status erreicht wird. Zudem werden nichtsteroidale Cyclooxygenase-Inhibitoren (NSAIDs), die die Expression der COX-2 vermindern, in Zusammenhang mit der verminderten Entwicklung von Darmpolypen als anticancerogen betrachtet, da die COX-2 bei vielen humanen Krebsarten wie Darm- und Brustkrebs überexprimiert wird (Ruegg *et. al.*, 2004). Ein hemmender Einfluß von Sojaproteinisolaten auf die Bildung von Darmtumoren konnte in einer *in vivo*-Studie an Ratten bereits nachgewiesen werden (Linz *et. al.*, 2004).

Wie erstmals gezeigt werden konnte, kann die Freisetzung vasoaktiver Substanzen von humanen Endothelzellen der Aorta durch Inkubation mit Hydrolysaten aus Casein und Sojaprotein beeinflusst werden. Bei unstimulierten HAoEC wurden bei 4 Hydrolysaten (2 Soja und 2 Casein) signifikant erhöhte NO-Konzentrationen und bei 3 Caseinhydrolysaten eine um ca. 50 % verminderte Freisetzung von PGI_2 nachgewiesen. Die Konzentrationen der Vasokonstriktoren ET-1 und TXA_2 blieben unverändert. Für die beiden getesteten Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD konnte durch molekularbiologische Untersuchungen auch ein Einfluß auf die mRNA-Expressionen der theoretisch beteiligten Enzyme gezeigt werden. Bei unstimulierten HAoEC konnte nur eine signifikant erhöhte mRNA-Konzentration der COX-2 nach Inkubation mit dem Sojahydrolysat nachgewiesen werden. Bei $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten HAoEC wurde von den vasoaktiven Substanzen nur die Freisetzung von NO untersucht. Die beiden getesteten Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD verursachten beide eine konzentrationsabhängig signifikant erhöhte NO-Freisetzung, die bezogen auf die Kontrolle noch höher war als bei unstimulierten HAoEC. Auf mRNA-Ebene verursachte das Caseinhydrolysat eine verminderte mRNA-Konzentration der COX-1 in der Konzentration 0,5 mg / ml und das Sojahydrolysat konzentrationsabhängig eine verminderte mRNA-Expression der COX-2 und eine gesteigerte mRNA-Konzentration der eNOS in der Konzentration 0,5 mg / ml. Die induzierbare NO-Synthase iNOS konnte bei den HAoEC nicht nachgewiesen werden. Die durch die Caseinhydrolysate verursachte ungünstige Verschiebung des PGI_2 : TXA_2 -Verhältnisses muss als proatherogen eingestuft werden. Die aus antiatherosklerotischer Sicht positive Beeinflussung der eNOS- und der COX-2-mRNA-Konzentrationen durch das Sojahydrolysat können als vasodilatatorisch und antiinflammatorisch eingeschätzt werden und favorisieren damit einen eher antiatherogenen Status. Ein Vergleich der in Abhängigkeit von der Proteinquelle teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse bei der Freisetzung vasoaktiver Substanzen und ihrer zugrundeliegenden Mechanismen deutet deshalb darauf hin, dass das Sojahydrolysat ein geringeres atherogenes Potential hat, als das Caseinhydrolysat.

4.1.3 Einfluss von C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf die Bildung von *second messenger*

Für die Untersuchung des Einflusses von Hydrolysaten auf funktionelle Parameter der Endothelfunktion wurde als weiteres Kriterium die intrazelluläre Bildung der ubiquitären *second messenger* cGMP und cAMP gewählt. cGMP moduliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen, u.a. die Relaxation glatter Muskelzellen, die Aggregation von Blutplättchen und die Freisetzung von Neurotransmittern ins Gehirn (Moncada *et al.*, 1991; Garthwaite & Boulton, 1995).

Bei unstimulierten HAoEC war nur das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD in der niedrigeren Konzentration in der Lage, die intrazelluläre Bildung von cGMP signifikant zu erhöhen. Dieser Anstieg könnte sowohl durch eine unspezifische Bindung von Peptidstrukturen mit Aktivierung der membranständigen Guanylatzyklase verursacht worden, als auch mit der gemessenen erhöhten Freisetzung von NO assoziiert sein. Das atriale natriuretische Peptid (ANP) nutzt den Signalübertragungsweg über die Aktivierung der membranständigen Guanylatzyklase unter Freisetzung von cGMP und Aktivierung der cGMP-abhängigen Protein-Kinase (Yamahara *et al.*, 2003). ANPs inhibieren in unphysiologisch hohen Konzentrationen die Proliferation und Migration von Endothelzellen, in physiologischen Konzentrationen unterdrücken sie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in entzündeten Zellen und Blutgefäßen und hemmen das Wachstum von glatten Muskelzellen. Strukturelle Ähnlichkeiten von Peptidsequenzen der getesteten Hydrolysate mit ANPs können nicht ausgeschlossen werden.

Die erhöhte Freisetzung von NO verursacht in Endothelzellen eine Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase mit Bildung von cGMP und anschließender Aktivierung der Proteinkinase C. Bereits nach 10-minütiger Inkubation von HUVEC mit NO-Donoren konnte eine vierfach erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentration durch Shiraishi *et al.* (2003) gemessen werden. Goetz *et al.*, (1999) untersuchten die Translokation der inaktiv membrangebundenen eNOS ins Zytosol nach Inkubation mit β -Estradiol. Nach 5 min waren nur noch 35 % der basalen eNOS membrangebunden. Da die cGMP-Messung in der vorliegenden Arbeit bereits nach 30 min Inkubation mit den Hydrolysaten erfolgte und nur bei dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD in der niedrigeren Konzentration eine geringe Konzentrationserhöhung messbar war, kann man davon ausgehen, dass die gesteigerte NO-Freisetzung nicht durch eine schnelle Aktivierung der eNOS verursacht wird, sondern die NO-Freisetzung zeitlich verzögert

eintritt und damit im Zusammenhang mit der zumindest für das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD tendenziell erhöhten mRNA-Expression der eNOS stehen könnte.

Das als Positivkontrolle eingesetzte BAY 41-2272 ist ein direkter Aktivator der zytosolischen Guanylatzyklase (Wen *et. al.*, 2004; Mullershausen *et. al.*, 2004), es verursachte jedoch in der in Anlehnung an Mullershausen *et. al.* (2004) gewählten Konzentration (10 µM) keinen signifikanten Anstieg der cGMP-Konzentration in den HAOEC. Mögliche Ursachen für die vergleichsweise niedrigen in den Endothelzellen gemessenen cGMP-Konzentrationen könnten ein geringer Guanylatzyklase-Gehalt in der Zelllinie oder das Vorliegen des Enzyms in einer nicht aktivierbaren Form (Bennett *et. al.*, 1989) sein. Sie konnten in BAEC und BASMC, ebenso wie Großer (2002) bei den Endothelzelllinien CPAE und EA.hy 926, keine signifikante Akkumulation von cGMP nachweisen. Auch eine zellkulturbedingte Funktionseinschränkung bzw. verminderte Expression der Guanylatzyklasen könnte die geringen cGMP-Konzentrationen verursachen (Papapetropoulos *et. al.*, 1996).

cAMP wird durch Adenylatcyclasen nach Aktivierung z.B. über beta-adrenerge Rezeptoren oder G-Protein-Untereinheiten ($G_s\alpha$) gebildet (Tesmer *et. al.*, 1997). Das Diterpen Forskolin bindet direkt an die katalytische Untereinheit der Adenylatzyklase und aktiviert diese. In der vorliegenden Arbeit wurde in Übereinstimmung mit der Literatur nach Inkubation mit Forskolin (Birukova *et. al.*, 2004; Kim *et. al.*, 2000) und dem Phosphodiesterasehemmer IBMX eine Verzehnfachung der intrazellulären cAMP-Konzentration in den Endothelzellen gemessen. Nach Inkubation mit dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD war in der niedrigeren Konzentration die Bildung von intrazellulärem cAMP signifikant und in der höheren Konzentration zumindest tendenziell erhöht.

Mehrere Arbeiten zeigen den Einfluss von cAMP-steigernden Substanzen auf die zytokinstimulierte Bildung von Adhäsionsmolekülen. So hemmt Forskolin in humanen Nabelschnur-Endothelzellen PKA-abhängig die IL-1beta-induzierte Expression von E-Selektin und VCAM-1, verstärkt aber die ICAM-1-Expression (Ghera *et. al.*, 1994). Rahman *et. al.* (2004) konnten zeigen, dass eine erhöhte Konzentration von cAMP zu einer Inhibierung der ICAM-1-Expression über Hemmung der p38-MAPK bei Thrombin-stimulierten HUVEC führt. Auch die NF- κ B-vermittelte Expression von TNF α , Tissue-Faktor und E-Selektin wird durch cAMP-steigernde Substanzen in HUVEC gehemmt (Ollivier *et. al.*, 1996). Eine signifikant verminderte Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 an unstimulierten Endothelzellen wurde auch nach Inkubation mit dem Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,05 mg /

ml nachgewiesen. Hier könnte demnach ein Zusammenhang mit der signifikant erhöhten Konzentration von cAMP bestehen.

Niwano *et. al.* (2003) konnten zeigen, dass nach Aktivierung des PGI₂-Rezeptors durch das Prostazyklinanalog Beraprost ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration mit einer erhöhten Stabilität der eNOS-mRNA *in vivo* und *in vitro* einhergeht. Im Zellkulturmedium von BAECs konnte er eine erhöhte Nitratfreisetzung messen. Ob die Stabilität der eNOS-mRNA bei unstimulierten HAoEC durch Inkubation mit den Hydrolysaten beeinflusst wird, sollte in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden. Auch Genistein erhöht cAMP-gekoppelt über das CRE-Bindungselement der eNOS deren Expression (Liu *et. al.*, 2005).

Forskolin, aber auch cAMP-Donoren und Agonisten von β -adrenergen Rezeptoren verursachen vermutlich eine höhere cAMP-Bildung als das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD (38 %). Eine ebenfalls nur leichte Erhöhung von endothelalem cAMP über 5 bis 50 min durch TNF α wurde in HUVEC gemessen (Pober *et. al.*, 1993). TNF α induzierte dabei die Bildung von PGE und PGI₂, was in den Zielzellen eine Erhöhung von cAMP bewirkte. Diese erhöhte Konzentration war aber nicht ausreichend, um die gleichen durch Forskolin und IBMX ausgelösten inhibierenden Effekte auf die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und VCAM-1 zu verursachen. In pulmonalen Aortenendothelzellen bewirkte die thrombininduzierte Aktivierung der Kalziumdepots eine um 30-50 % verminderte cAMP / PKA-Aktivität durch die kalziumsensitive AC6 (Stevens *et. al.*, 1999), es blieb aber ungeklärt, ob diese Reduzierung des intrazellulären cAMP ausreicht, die Kalzium-regulierte Permeabilität der Zellen zu erhöhen.

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die Wirkung des ubiquitären *second messengers* cAMP davon abhängig ist, ob ein flüchtiger, starker oder ein niedrigerer, aber andauernder Konzentrationsanstieg vorliegt (Ruegg *et. al.*, 2004). Dafür wären Verlaufsmessungen ohne Vorinkubation mit PDE-Hemmern geeignet. Von Bedeutung scheint auch die Passagezahl der HAoEC zu sein, da über die im Versuch verwendeten Passagen 3-5 ein Rückgang der cAMP-Konzentration beobachtet wurde. Es wurde bereits nachgewiesen, dass sowohl die Expression der Adenylatzyklase (Niwano *et. al.*, 2003), als auch der Guanylatzyklase (Papapetropoulos *et. al.*, 1996) bei kultivierten Zellen mit zunehmender Passagezahl nachlässt. Es ist aber wahrscheinlich, dass Primärzellen *in vivo* eine höhere AC- und GC-Expression zeigen als kultivierte Endothelzellen. Ob die in der vorliegenden Arbeit gemessene Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Inkubation mit dem Sojahydrolysat S /

P+T < 1 kD ausreichend ist, in der Literatur beschriebene Effekte auszulösen, müsste in weiterführenden Untersuchungen getestet werden. Von Interesse wären insbesondere Untersuchungen zur Beeinflussung der Permeabilität von HAOEC, da viele Studien einen positiven Einfluss von cAMP-steigernden Substanzen auf die Stabilität der Barrierefunktion von Endothelzellen zeigen (Bindewald *et. al.*, 2004; Birukova *et. al.*, 2007; Cioffi *et. al.*, 2002; Klingenberg *et. al.*, 2004; Kooistra *et. al.*, 2005; Stelzner *et. al.*, 1989 und Moore *et. al.*, 1998).

Bei TNF α -stimulierten HAOEC wurde in der vorliegenden Arbeit eine etwa 7fach höhere cAMP-Konzentration als in unstimulierten Zellen gemessen. Shiiki *et. al.* (1990) beobachtete an Krebszellen ebenfalls nach Inkubation mit TNF α eine signifikante Erhöhung des cAMP-Spiegels. Es ist bekannt, dass sowohl TNF α - (Yuan, 1997) als auch cAMP / PKA-vermittelt (Kim *et. al.*, 2002) in Endothelzellen Apoptose induziert werden kann, jedoch gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keinen Hinweis in der Literatur, dass die TNF α -induzierte Apoptose durch cAMP vermittelt wird. Eine wichtige Rolle für cAMP bei der NO-induzierten Bewahrung der endothelialen Schutzfunktion gegenüber TNF α konnte von Polte & Schroder (1998) in Endothelzellen nachgewiesen werden. Die dabei beobachtete erhöhte cAMP-Konzentration könnte zu einer vermehrten Bildung von antioxidativen Proteinen oder einer Reduzierung von zytotoxischen Prozessen führen, was die Wiederherstellung der endothelialen Schutzfunktion bewirken könnte. Auch bei mit Wasserstoffperoxid inkubierten PAEC konnte die endotheliale Schutzfunktion durch Inkubation mit NO-Donoren cAMP-vermittelt wieder hergestellt werden (Gupta *et. al.*, 2001). Ein Zusammenhang mit der erhöhten Freisetzung von NO nach Inkubation mit den Hydrolysaten in der vorliegenden Arbeit wäre zwar theoretisch möglich, es würde aber nicht die erhöhte cAMP-Bildung der nur mit TNF α stimulierten Kontrolle erklären. Wang *et. al.* (2001) konnten zeigen, dass die Inkubation von HUVEC mit TNF α zu einem rapiden Konzentrationsanstieg von Ca²⁺ führt. Eine gemeinsame Regulierung von Prozessen durch die second messenger cAMP und Ca²⁺ ist bereits mehrfach beschrieben worden (Cioffi *et. al.*, 2002; Rogue *et. al.*, 1998; Sharma & Kalra, 1994). So ist für eine Zellaktivierung ein vorübergehender Anstieg von Ca²⁺ als auch von cAMP erforderlich (Kakkar *et. al.*, 1999). Denkbar wäre auch eine Art feedback-Mechanismus nach Inkubation mit TNF α , um die Erhaltung der endothelialen Funktionen zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen verursachte die Inkubation mit TNF α bei HUVEC keinen (Bernot *et. al.*, 2005) bzw. nur einen leichten Anstieg (Pober *et. al.*, 1993) des basalen intrazellulären cAMP. Das lässt darauf schließen, dass zellinzenspezifisch Unterschiede in der Regulierung von intrazellulärem cAMP

bestehen. Die getesteten Hydrolysate S / P+T < 1 kD und C / P+T < 1 kD hatten in TNF α -aktivierten HAoEC keinen Einfluss auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Sojaprotein-Hydrolysat die Bildung von *second messengern* in humanen Endothelzellen der Aorta beeinflussen kann. So verursachte das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD in der niedrigeren getesteten Konzentration von 0,05 mg / ml einen signifikanten Anstieg der cGMP- und der cAMP-Konzentration. Das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD hatte keinen Einfluß auf die Bildung der untersuchten *second messenger*. Prozesse, die in vaskularen Endothelzellen zumeist G-Protein-gekoppelt mit einer Erhöhung von cGMP und cAMP einhergehen, lösen in Blutgefäßen überwiegend antiinflammatorische, antithrombotische und vasorelaxante Effekte aus. Deshalb kann auch diese Wirkung des Sojahydrolysates als antiatherogen gewertet werden.

4.1.4 Adhäsionsmoleküle, Monozytenadhäsion und NF- κ B

Im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen wird in den Blutgefäßen auch eine vermehrte Bildung von Adhäsionsmolekülen beobachtet. Entzündungsmediatoren wie TNF α (Mukherjee *et. al.*, 2003), aber auch IL-1 und IL-4 (Raines & Ross, 1996) stimulieren die Bildung von endothelialen Adhäsionsmolekülen über verschiedene Transkriptionsfaktoren, insbesondere NF- κ B (Collins *et. al.*, 1995; Read *et. al.*, 1997). Nach Stimulation mit TNF α wird an Endothelzellen eine erhöhte Monozyten-Adhäsion und nach 6-stündiger Inkubation eine vermehrte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 beobachtet (Dwivedi *et. al.*, 2001). Innerhalb von 15 min kommt es zu einer kompletten TNF α -induzierten Degradierung des NF- κ B-Inhibitors I κ -B α . Dieser Effekt von TNF α konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, die Monozytenadhäsion und die Translokation der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 im Vergleich mit unstimulierten Zellen bestätigt werden.

Bei unstimulierten HAoEC wurde durch das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD die Konzentration der VCAM-1-mRNA vermindert. Es hatte aber keinen Einfluss auf die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle. Das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD zeigte keine Beeinflussung der mRNA-Konzentrationen, konnte aber die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 vermindern. Die Monozytenadhäsion konnte durch beide Hydrolysate nicht verändert werden. Die Regulierung von zellulären Adhäsionsmolekülen durch NO ist bereits mehrfach beschrieben worden (Kubes *et. al.*, 1991; Lefer & Lefer, 1996). Mukherjee *et. al.* (2003) beobachteten, dass in HUVEC die Inkubation mit Genistein und 17-Epiestriol, einem Estrogen-Metaboliten,

eine gesteigerte Expression der eNOS und dadurch eine verminderte Bildung der VCAM-1-mRNA verursacht. Buras *et. al.* (2000) konnten eine NO / eNOS gekoppelte Inhibierung des ICAM-1 in BAECs und HUVECs nachweisen. Da beide Hydrolysate die NO-Freisetzung der HAoEC steigern konnten, könnte ein Zusammenhang mit der verminderten Expression der Adhäsionsmoleküle bestehen.

Auch an TNF α -stimulierten HAoEC konnten nach Inkubation mit dem Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD eine verminderte ICAM-1-mRNA-Expression, eine verminderte Proteinexpression des VCAM-1 und eine verminderte Monozytenadhäsion nachgewiesen werden. Das Sojahydrolysat S / P+T < 1 kD verursachte eine konzentrationsabhängig signifikant verminderte VCAM-1-Proteinexpression, hatte dabei aber keinen Einfluss auf die Monozytenadhäsion. IL-1 α -stimulierte (Zampolli *et. al.*, 2000) und TNF α -stimulierte (De Caterina *et. al.*, 1995) HSVEC zeigten nach Inkubation mit NO-Donoren eine cGMP-unabhängige Inhibierung des NF- κ B, verbunden mit einer verminderten U937-Monozytenadhäsion und einer verminderten Expression des VCAM-1. E-Selektin wurde nur wenig, ICAM-1 gar nicht beeinflusst. Auch bei den TNF α -stimulierten HAoEC könnte demnach ein Zusammenhang mit den erhöhten NO-Konzentrationen bestehen. Es gibt aber auch Studien, in denen kein Zusammenhang zwischen der NO-Freisetzung und der Expression von Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden konnte. Bei in-vivo-Studien mit eNOS-Knockout-Mäusen (Kuhlencordt *et. al.*, 2004) und nach Inhibierung der NOS in HUVEC (Binion *et. al.*, 1998) zeigte sich keine Veränderung der Expression von Adhäsionsmolekülen.

Die Aktivierung von NF- κ B durch TNF α erfolgt teilweise über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Marui *et. al.*, 1993; Schreck *et. al.*, 1991). Die Bindung der Superoxidanionen bewirkt eine Reduzierung des antioxidativen Status der Zelle und dadurch eine verminderte Aktivierung von NF- κ B. Gleiches fanden Faruqi *et. al.* (1997) an HUVEC und HAEC. Die Regulierbarkeit der Expression von Adhäsionsmolekülen über den Redoxstatus der Zelle zeigen auch Studien, in denen die Superoxiddismutase überexprimiert wird. Die dadurch verursachte Inaktivierung des NF- κ B führt bei HAEC zu einer verminderten mRNA-Akkumulierung und Protein-Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (Chen *et. al.*, 2003). Auch die Adhäsion von Neutrophilen an humane Zellen wird inhibiert (Lin *et. al.*, 2005). Zahlreiche andere antioxidativ wirksame Substanzen, wie Probucol (Zapolska-Downar *et. al.*, 2000), Verapamil (Yamaguchi *et. al.*, 1997), Genistein (May *et. al.*, 1996), das Flavonoid PD 098063 (Wolle *et. al.*, 1996) und p-Cresol (Dou *et. al.*, 2002) verändern ebenfalls die Expression des VCAM-1 und die Monozytenadhäsion durch

Inhibierung des NF- κ B. Immunopräzipitationsstudien von Tsao *et. al.* (1996) zeigen, dass exogenes NO den NF- κ B / I κ B α -Komplex stabilisiert, die Expression der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 aber nicht verändert. Die Translokation der NF- κ B - Untereinheiten p50 und p65 in den Zellkern wurde im Rahmen dieser Arbeit nur an TNF α -stimulierten HAoEC untersucht. Sie wurde aber durch Inkubation mit beiden Hydrolysaten nicht beeinflusst und muss als möglicher Regulator ausgeschlossen werden. Da die antioxidativ wirksame Substanz P609, ein Inhibitor der Phospholipase C, auch NF- κ B-unabhängig die zytokinstimulierte Expression von VCAM-1 beeinflusst (Cobb *et. al.*, 1996), müssen weitere Regulationsmechanismen die Expression der Adhäsionsmoleküle beeinflussen können.

Einige Studien zeigen, dass auch andere Transkriptionsfaktoren an der Regulierung des VCAM-1 beteiligt sind. Die TNF α -induzierte Expression des VCAM-1 wird auch über den Transkriptionsfaktor IRF-1 gesteuert, dessen Bindungsstelle sich u.a. neben NF- κ B und AP-1 auf dem VCAM-1-Promotor befindet. In TNF α -stimulierten HUVEC wird nukleares IRF-1 mit einem Peak nach 4 h exprimiert. (Dagia *et. al.*, 2004; Neish *et. al.*, 1995). Während IRF-1 alleine nur eine geringfügige Verstärkung der Promotoraktivität des VCAM-1 verursacht, bewirkt die Kopplung von IRF-1 und NF- κ B nahezu eine Verdreifachung der Promotoraktivität im Vergleich zu NF- κ B allein. Weitere Interaktionen von NF- κ B /Rel mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1, ATF-2 und SP-1 sind beschrieben (Perkins *et. al.*, 1993; Stein *et. al.*, 1993; Du *et. al.*, 1993; De Caterina *et. al.*, 1995). Auch die synthetische, niedermolekulare Komponente K-7174 inhibiert an HUVEC die Transkription des VCAM-1 und die Monozytenbindung der Zelllinie U937 (Umetani *et. al.*, 2000). K-7174 zeigt dabei Wirkung auf die funktionelle Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors GATA des VCAM-1-Promotors. Der Promotor des ICAM-1 hat Bindungsstellen für AP-1, NF- κ B und SP-1, aber nicht für IRF-1 und GATA. Weitere Untersuchungen wären nötig, eine mögliche Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren wie IRF-1 oder GATA als Ursache für die beobachteten Effekte zu analysieren.

In einigen Arbeiten kann ein Einfluss von E-Selektin (Melrose *et. al.*, 1998) und ICAM-1 (Lin *et. al.*, 2005; De Caterina *et. al.*, 1995) auf die Monozytenadhäsion gezeigt werden. Zahlreiche Ergebnisse aus in-vitro-Studien und Tierversuchen lassen aber vermuten, dass P-Selektin und VCAM-1 die für die Rekrutierung von Monozyten an atherosklerotischen Läsionen wichtigsten Adhäsionsmoleküle sind. Dies wird auch unterstützt durch Ergebnisse aus epidemiologischen Studien, in denen die im Serum enthaltenen löslichen Adhäsionsmoleküle mit dem Auftreten von atherosklerotischen Erkrankungen korrelieren (Huo & Ley, 2001). Bei in vivo Versuchen mit VCAM-1-

reduzierten Mäusen wurde nach Fütterung einer cholesterin-angereicherten Diät eine signifikante Reduzierung der Fläche von frühzeitigen atherosklerotischen Läsionen in der Aorta beobachtet (Cybulsky *et. al.*, 2001; Dansky *et. al.*, 2001). ICAM-1 defizitäre Mäuse und Mäuse mit kombiniertem Defizit an ICAM-1 und VCAM-1 zeigten diese Veränderung nicht. In der vorliegenden Arbeit konnten beide Hydrolysate an TNF α -stimulierten HAoEC die Proteinexpression des VCAM-1 senken bei gleichzeitig erhöhter Proteinexpression von E-Selektin, aber nur das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD bewirkte auch eine Inhibierung der Monozytenadhäsion der U 937. Das bedeutet, dass weitere Parameter die Bindung von Monozyten beeinflusst haben müssen. Eine direkte Wirkung von freigesetztem NO auf die Monozyten könnte auch eine Ursache für die verminderte Monozytenadhäsion sein, da die Inkubation mit dem NO-Donor SNAP bereits nach 10 Minuten eine 2,5 Stunden anhaltende Inaktivierung und Immobilisierung von Monozyten verursacht (Magazine *et. al.*, 2000). Dann hätten aber wiederum beide Hydrolysate eine Wirkung auf die Monozytenadhäsion haben müssen.

Von besonderem Interesse wären daher Untersuchungen zur Bildung bzw. Freisetzung von Chemokinen, insbesondere MCP-1, das verstärkt in makrophagenreichen Regionen von atherosklerotischen Läsionen bei Menschen und Kaninchen exprimiert wird (Yla-Herttuala *et. al.*, 1991). Auch eine unspezifische Bindung von Proteinsequenzen aus dem Caseinhydrolysat an G-Protein-gekoppelte Chemokin-Rezeptoren auf der Oberfläche von kultivierten Endothelzellen (Weber, *et. al.* 1999; Salcedo *et. al.*, 2000; Feil & Augustin, 1998) könnten eine mögliche Ursache für die durch das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD verminderte Monozytenadhäsion sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Hydrolysate aus Nahrungsproteinen *in vitro* die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Adhäsion von Monozyten beeinflussen können. Das Caseinhydrolysat reduzierte im Gegensatz zu dem Sojahydrolysat die mRNA-Konzentration von Adhäsionsmolekülen an unstimulierten und TNF α -stimulierten HAoEC. Beide Hydrolysate inhibierten die Proteinexpression von Adhäsionsmolekülen, das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD aber nur an TNF α -stimulierten HAoEC. Die Monozytenadhäsion wurde ebenfalls nur durch das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD und nur an TNF α -stimulierten EC reduziert. Die beobachteten Effekte sind unabhängig von der Translokation der NF- κ B-Untereinheiten p 50 und p 65. Eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen unter inflammatorischen Bedingungen und eine verminderte Adhäsion von Monozyten könnte die klinische Manifestation von frühzeitigen atherosklerotischen Veränderungen verzögern und kann deshalb für beide Hydrolysate als antiatherogen bewertet werden.

5 Schlussfolgerungen

Über die Bildung und Freisetzung von vasoaktiven Substanzen durch die Endothelzellen der Blutgefäße wird das vaskuläre Gleichgewicht reguliert. Veränderungen in der Freisetzung gehören ebenso wie eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen und eine verstärkte Monozytenadhäsion zu den ersten atherogenen Veränderungen in den Blutgefäßen.

Ziel der Arbeit war, den Einfluß von bioaktiven Hydrolysaten aus Nahrungsproteinen—Casein und Soja - die mit Hilfe eines Proliferationstestes gescreent wurden, auf atheroskleroserelevante Parameter der HAoEC zu untersuchen.

Basierend auf dem Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Befunden der Literatur wurden die nachfolgenden Schlussfolgerungen gezogen.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass in Anlehnung an den natürlichen Verdau *in vivo* hergestellte Hydrolysate aus Soja und Casein die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen in HAoEC beeinflussen können. An unstimulierten HAoEC verursachten einige Sojahydrolysate eine erhöhte Freisetzung von vasodilatatorischem NO, hatten aber keinen Einfluss auf die Freisetzung von ET-1 und Eicosanoiden. Ebenso bewirkten die Caseinhydrolysate eine erhöhte NO-Freisetzung, verminderten aber gleichzeitig die Synthese von PGI₂, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes der Eicosanoide zugunsten des atherogenen TXA₂ führte. Unter inflammatorischen Bedingungen, nach 24 h Stimulation mit TNF α , war die NO-Freisetzung durch die Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD noch stärker erhöht und kann bei dem Sojahydrolysat mit einer erhöhten eNOS-Genexpression erklärt werden. Die Genexpressionen der an der Eicosanoidsynthese beteiligten Enzyme COX-1 und COX-2 wurden durch die Hydrolysate ebenfalls beeinflusst. So verursachte C / P+T < 1 kD an TNF α -stimulierten HAoEC eine verminderte Genexpression der COX-1 und S / P+T < 1 kD eine konzentrationsabhängig verminderte Genexpression der COX-2. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Freisetzung vasoaktiver Substanzen und die Genexpression der beteiligten Enzyme durch die Hydrolysate beeinflusst werden konnte. In Übereinstimmung mit der Literatur hatte das Caseinhydrolysat im Gegensatz zu dem Sojahydrolysat bei der Beeinflussung vasoaktiver Substanzen einen eher proatherogenen Einfluß auf das vaskuläre Gleichgewicht.

Die Bildung der *second messenger* cGMP und cAMP konnte durch das Caseinhydrolysat gar nicht und durch das Sojahydrolysat nur geringfügig und auch nur in der Konzentration 0,05 mg / ml erhöht werden. Ob die gemessene Erhöhung von cAMP ausreicht, die in der Literatur für cAMP-steigernde Substanzen beschriebenen positiven Effekte auszulösen, wie eine Verstärkung der Barrierefunktion des Endothels,

kann nur in weiterführenden Studien getestet werden. Es ist aber im Gegensatz zu dem Caseinhydrolysat ein weiteres Indiz für die eher antiatherogene Wirkung von Soja. Es wurde erstmalig in einer umfassenden Studie die Wirkung von Hydrolysaten aus Nahrungsproteinen auf proinflammatorische Parameter der frühen Atherogenese – die Expression der Adhäsionsmoleküle, die Bindung von Monozyten an das Endothel sowie die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an den beobachteten Effekten - an HAOEC untersucht. An unstimulierten HAOEC verursachte C / P+T < 1 kD eine verminderte Genexpression des VCAM-1 und S / P+T < 1 kD nur geringfügige Veränderungen in der Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. Die Monozytenadhäsion blieb unbeeinflusst. Stärkere Effekte konnten an TNF α -stimulierten HAOEC gezeigt werden. Beide Hydrolysate verminderten die Proteinexpression des VCAM-1, aber nur bei dem Caseinhydrolysat konnte auch eine verminderte Monozytenadhäsion beobachtet werden. Das würde bedeuten, dass das Caseinhydrolysat bezüglich der getesteten proinflammatorischen Parameter eine stärkere antiatherogene Wirkung auf die Endothelzellen hat als das Sojahydrolysat. Die Aktivität des an den inflammatorischen Prozessen verstärkt beteiligten Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde durch beide Hydrolysate nicht beeinflusst. Zusammenfassend lässt sich einschätzen, dass die getesteten Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD die untersuchten Parameter der frühen Atherogenese verändern können. Es konnte dabei erstmals gezeigt werden, dass Casein nicht nur eine in der Literatur beschriebene, im Verhältnis zu Soja, proatherogene Wirkung hat, sondern dem Soja vergleichbare, als antiatherogen einzustufende Effekte in HAOEC auslösen kann, die sich auch nicht über die bekannte Wirkung eventuell enthaltener ACE-inhibitorischer Peptide erklären lassen. Anhand der erhaltenen Ergebnisse lässt sich einschätzen, dass die Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD atheroskleroserelevante Parameter der HAOEC beeinflussen konnten und die gezeigten Effekte verstärkt unter inflammatorischen Bedingungen beobachtet werden konnten.

Die für die Untersuchung der Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD gewählten Konzentrationen liegen für enthaltene Peptidsequenzen, die durchschnittlich aus 2 bis ca. 10 AS bestehen sollten oder auch enthaltenen freien AS in physiologischen Bereichen für im Serum vorkommende Peptide. Die Ergebnisse können deshalb theoretisch auf den Menschen übertragen werden. Es handelt sich aber trotzdem nur um eine Primärstudie, die nur richtungsweisend für weitere Untersuchungen sein kann.

6 Zusammenfassung

In vivo und *in vitro*-Studien zeigen einen Einfluss von Nahrungsproteinen auf atherosklerotische Prozesse. Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, die von genetischer Disposition und einer Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren abhängig ist. Übergewicht, Diabetes mellitus und Fettstoffwechselstörungen gehören zu den ernährungsbedingten Risikofaktoren, die entscheidend zur Atherogenese beitragen können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß von vasoaktiven Hydrolysaten aus Nahrungsproteinen auf atheroskleroserelevante Parameter – vasoaktive Substanzen und proinflammatorische Parameter – in humanen arteriellen Endothelzellen zu untersuchen.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden die HAoEC mit den zu testenden Hydrolysaten in den Konzentrationen 0,05 und 0,5 mg / ml (bzw. 0,05 bis 2,5 mg / ml im Proliferationstest) unstimuliert oder stimuliert zusammen mit dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) in der Konzentration 0,2 ng / ml für 24 h bei 37 °C inkubiert. Bei 10 Hydrolysaten wurde an unstimulierten HAoEC die Freisetzung der vasoaktiven Substanzen Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1 (ET-1), Prostazyklin (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) gemessen. 2 Casein- und 2 Sojahydrolysate erhöhten die Freisetzung von NO, aber nur die Caseinhydrolysate reduzierten die Bildung von PGI₂, was zu einer Verschiebung des Verhältnisses von PGI₂ zu TXA₂ führte. In weiterführenden Untersuchungen mit den Hydrolysaten C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD wurden die NO-Freisetzung an TNF α -stimulierten HAoEC, die mRNA-Expressionen der beteiligten Enzyme endotheliale NO-Synthase (eNOS), und der Cyclooxygenasen (COX) COX-1 und COX-2, die Aktivität des Angiotensin konvertierenden Enzymes (ACE) und die Bildung der *second messenger* cGMP und cAMP bestimmt. Beide Hydrolysate erhöhten die NO-Freisetzung an TNF α -stimulierten HAoEC, bei gleichzeitig erhöhter Konzentration der mRNA-Expression der eNOS durch S / P+T < 1 kD. Die induzierbare NOS (iNOS) war nicht nachweisbar. Die ACE-Aktivität als mögliche Ursache für die veränderte NO-Freisetzung blieb ebenfalls unverändert. Beide Hydrolysate beeinflussten die mRNA-Expression der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2. So verminderte C / P+T < 1 kD die Genexpression der COX-1 bei unstimulierten HAoEC tendenziell und bei TNF α -stimulierten HAoEC signifikant.

S / P+T < 1 kD erhöhte die COX-2 Genexpression an unstimulierten HAoEC bei 0,05 mg / ml und verminderte sie konzentrationsabhängig bei TNF α -stimulierten HAoEC. Die Bildung der second messenger cGMP und cAMP wurde nur durch S / P+T < 1 kD in der Konzentration 0,05 mg / ml geringfügig erhöht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Freisetzung vasoaktiver Substanzen die Sojahydrolysate einen positiven Einfluss auf das Verhältnis von Vasodilatoren zu Vasokonstriktoren hatten. Die Caseinhydrolysate beeinflussten die Bildung der Vasodilatoren NO positiv und PGI₂ negativ und haben deshalb im Vergleich mit den Sojahydrolysaten eine eher proatherogene Wirkung.

Der Einfluß der Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD auf proinflammatorische Parameter wurde an unstimulierten und an TNF α -stimulierten HAoEC nach 24 h Inkubation bei 37 °C bestimmt. Es wurden die mRNA-Expressionen und die Proteinexpressionen der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1), die Adhäsion der U 937 Monozyten und die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht. Die Behandlung mit TNF α (0,2 ng / ml) erhöhte die Expression der Adhäsionsmoleküle, die Monozytenadhäsion und die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Hydrolysate zeigten beide einen inhibierenden Einfluß auf die Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle, insbesondere VCAM-1 an TNF α -stimulierten HAoEC, während E-Selektin von beiden Hydrolysaten geringfügig erhöht wurde. Nur das Caseinhydrolysat C / P+T < 1 kD konnte bei TNF α -stimulierten HAoEC die Monozytenadhäsion vermindern und hatte damit einen größeren Einfluß auf die getesteten proinflammatorischen Parameter als das Sojahydrolysat. Die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde durch keines der beiden Hydrolysate beeinflusst, was bedeutet, dass die in dieser Arbeit beobachteten Wirkungen der Hydrolysate über andere als die in der Literatur beschriebenen Signalwege vermittelt wurden.

Abschliessend kann festgestellt werden, dass die Hydrolysate C / P+T < 1 kD und S / P+T < 1 kD atheroskleroserelevante Parameter von arteriellen Endothelzellen beeinflussen können.

7 Summary

In vivo and in vitro studies provide evidence that dietary proteins have an influence on atherosclerotic processes. Atherosclerosis is a multifactoring disease that depends on genetic disposition and a lot of cardiovascular risk factors. Overweight, diabetes mellitus and disturbances of the fatty acid metabolism belong to the dietary-influenced risk factors that can decisively contribute to atherosclerosis.

The aim of the present study was to test the influence of vasoactive hydrolysates of dietary proteins on atherosclerosis relevant parameters – vasoactive substances and proinflammatory parameters – on human arterial endothelial cells.

For the tests the HAoEC were incubated with the hydrolysates in the concentrations 0.05 and 0.5 mg / ml (0.05 till 2.5 mg / ml for proliferation) without stimulation or stimulated together with tumor necrosis factor α (TNF α) in the concentration 0.2 ng / ml for 24 h at 37 °C. With 10 hydrolysates we measured the release of the vasoactive substances nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1), prostacyclin (PGI₂) and thromboxan A₂ (TXA₂) of unstimulated HAoEC. 2 casein- and 2 soy-hydrolysates increased the release of NO, but only casein-hydrolysates decreased the release of PGI₂, which changed the relation of PGI₂ to TXA₂. In further analysis with the hydrolysates C / P+T < 1 kD and S / P+T < 1 kD we tested the release of NO of TNF α -stimulated HAoEC, the mRNA expressions of the appropriate enzymes endothelial NO-synthase (eNOS) and the cyclooxygenases (COX) COX-1 and COX-2, the activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) and the accumulation of the second messengers cGMP and cAMP. Both hydrolysates increased the release of NO of TNF α -stimulated HAoEC, and we found for S / P+T < 1 kD an increased eNOS mRNA concentration. The inducible NOS (iNOS) was not detectable. The activity of ACE as possible reason for the elevated NO-release was also not modified. The hydrolysates both influenced mRNA-expression of the cyclooxygenases COX-1 and COX-2. C / P+T < 1 kD decreased the mRNA expression of COX-1 of unstimulated HAoEC insignificant and of TNF α -stimulated HAoEC significantly. S / P+T < 1 kD increased the mRNA expression of COX-2 in unstimulated HAoEC but only at the concentration 0.05 mg / ml and decreased the COX-2 mRNA expression in a concentration dependent manner in TNF α -stimulated HAoEC. The creation of the second messengers cGMP and cAMP was slightly increased only by S / P+T < 1 kD and only in the concentration 0.05 mg / ml. In summary the soy-hydrolysates had regarding the release of vasoactive substances a positive influence on the relation of vasodilatory to vasoconstrictory substances. The casein-hydrolysates influenced the release of the vasodilating NO favorable and of PGI₂ negative and had therefore in comparison with the soy-hydrolysates a more proatherogenic effect.

The influence of the hydrolysates C / P+T < 1 kD and S / P+T < 1 kD on proinflammatory parameters in unstimulated and TNF α -stimulated HAoEC was analyzed after 24 h incubation at 37 °C. We examined the mRNA expressions and protein expressions of the adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1), the adhesion of U 937 monocytes and the DNA-binding activity of the transcription factor NF- κ B. Treatment with TNF α (0,2 ng / ml) increased the expression of adhesion molecules, adhesion of monocytes and the DNA-binding activity of the transcription factor NF- κ B. Both hydrolysates showed an inhibiting influence on the protein expression of the adhesion molecules, especially on VCAM-1 in TNF α -stimulated HAoEC, while E-selectin was slightly elevated by the hydrolysates. Only C / P+T < 1 kD decreased the adhesion of monocytes at TNF α -stimulated HAoEC and had therefore a greater influence on the tested proinflammatory parameters than the soy-hydrolysate. The DNA binding activity of the transcription factor NF- κ B was not influenced by both hydrolysates, that means, that the obtained effects in the present study were mediated by other signalling pathways than that described in the literature.

In conclusion we can state, that the hydrolysates C / P+T < 1 kD and S / P+T < 1 kD influence atherosclerosis relevant parameters of arterial endothelial cells.

8 Literaturverzeichnis

Abubakar, A., T. Saito, et al. (1998). "Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion." *J Dairy Sci* 81(12): 3131-8.

Adderley, S. R. and D. J. Fitzgerald (1999). "Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2." *J Biol Chem* 274(8): 5038-46.

Ambrosioni, E., S. Bacchelli, et al. (2001). "Anti-ischemic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors: a future therapeutic perspective." *J Cardiovasc Pharmacol* 37 Suppl 1: S3-9.

Anderson, G. H. and S. E. Moore (2004). "Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans." *J Nutr* 134(4): 974S-9S.

Anthony, M. S., T. B. Clarkson, et al. (1998). "Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms." *Am J Clin Nutr* 68(6 Suppl): 1390S-1393S.

Apostolakos, M. J., W. H. Schuermann, et al. (1993). "Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction." *Anal Biochem* 213(2): 277-84.

Asakura, T. and T. Karino (1990). "Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries." *Circ Res* 66(4): 1045-66.

Ashton, A. W., G. M. Ware, et al. (2003). "Inhibition of tumor necrosis factor alpha-mediated NFkappaB activation and leukocyte adhesion, with enhanced endothelial apoptosis, by G protein-linked receptor (TP) ligands." *J Biol Chem* 278(14): 11858-66.

Belton, O., D. Byrne, et al. (2000). "Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis." *Circulation* 102(8): 840-5.

Bennett, B. M., D. C. Leitman, et al. (1989). "Relationship between biotransformation of glyceryl trinitrate and cyclic GMP accumulation in various cultured cell lines." *J Pharmacol Exp Ther* 250(1): 316-23.

Bernot, D., F. Peiretti, et al. (2005). "Upregulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 surface expression by adenylate cyclase-dependent pathway in human endothelial cells." *J Cell Physiol* 202(2): 434-41.

Bindewald, K., D. Gunduz, et al. (2004). "Opposite effect of cAMP signaling in endothelial barriers of different origin." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(5): C1246-55.

Binion, D. G., S. Fu, et al. (1998). "iNOS expression in human intestinal microvascular endothelial cells inhibits leukocyte adhesion." *Am J Physiol* 275(3 Pt 1): G592-603.

Birukova, A. A., F. Liu, et al. (2004). "Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(1): L86-93.

Birukova, A. A., T. Zagranichnaya, et al. (2007). "Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation." *Exp Cell Res* 313(11): 2504-20.

Bishop-Bailey, D., J. R. Pepper, et al. (1997). "Induction of cyclooxygenase-2 in human saphenous vein and internal mammary artery." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(9): 1644-8.

Bombardier, C., L. Laine, et al. (2000). "Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group." *N Engl J Med* 343(21): 1520-8, 2 p following 1528.

Brader, S. and S. A. Eccles (2004). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis." *Tumori* 90(1): 2-8.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.

Brandsch, M., C. Brandsch, et al. (1997). "Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H⁺/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2)." *Biochim Biophys Acta* 1324(2): 251-62.

Buras, J. A., G. L. Stahl, et al. (2000). "Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2): C292-302.

Buttery, L. D., D. R. Springall, et al. (1996). "Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite." *Lab Invest* 75(1): 77-85.

Byrne, M. F., J. F. Murphy, et al. (2003). "Helicobacter pylori induces cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in vascular endothelial cells." *Scand J Gastroenterol* 38(10): 1023-30.

Caplan, B. A. and C. J. Schwartz (1973). "Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta." *Atherosclerosis* 17(3): 401-17.

Cascieri, M. A. (2002). "The potential for novel anti-inflammatory therapies for coronary artery disease." *Nat Rev Drug Discov* 1(2): 122-30.

Caughey, G. E., L. G. Cleland, et al. (2001). "Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2." *J Immunol* 167(5): 2831-8.

Cayatte, A. J., Y. Du, et al. (2000). "The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(7): 1724-8.

Chen, X. L., Q. Zhang, et al. (2003). "Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells." *J Pharmacol Exp Ther* 305(2): 573-80.

Cho, D. H., Y. J. Choi, et al. (2004). "Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPARgamma-independent signaling pathways." *J Biol Chem* 279(4): 2499-506.

Cioffi, D. L., T. M. Moore, et al. (2002). "Dominant regulation of interendothelial cell gap formation by calcium-inhibited type 6 adenylyl cyclase." *J Cell Biol* 157(7): 1267-78.

Cleland, S. J., N. Sattar, et al. (2000). "Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease." *Clin Sci (Lond)* 98(5): 531-5.

Cobb, R. R., K. A. Felts, et al. (1996). "D609, a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor, blocks interleukin-1 beta-induced vascular cell adhesion molecule 1 gene expression in human endothelial cells." *Mol Pharmacol* 49(6): 998-1004.

Collins, T., M. A. Read, et al. (1995). "Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers." *FASEB J* 9(10): 899-909.

Cotran, R. S. and J. S. Pober (1990). "Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury." *J Am Soc Nephrol* 1(3): 225-35.

Cushman, D. W. and M. A. Ondetti (1999). "Design of angiotensin converting enzyme inhibitors." *Nat Med* 5(10): 1110-3.

Cybulsky, M. I., K. Iiyama, et al. (2001). "A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis." *J Clin Invest* 107(10): 1255-62.

Dagia, N. M., N. Harii, et al. (2004). "Phenyl methimazole inhibits TNF-alpha-induced VCAM-1 expression in an IFN regulatory factor-1-dependent manner and reduces monocytic cell adhesion to endothelial cells." *J Immunol* 173(3): 2041-9.

D'Angelo, G., H. Lee, et al. (1997). "cAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogenic action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation." *J Cell Biochem* 67(3): 353-66.

Dansky, H. M., C. B. Barlow, et al. (2001). "Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(10): 1662-7.

De Caterina, R., P. Libby, et al. (1995). "Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines." *J Clin Invest* 96(1): 60-8.

Diet, F., R. E. Pratt, et al. (1996). "Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease." *Circulation* 94(11): 2756-67.

Djurovic, S., H. Kristansen, et al. (2004). "Variations in transfection efficiency of VEGF165 and VEGF121-cDNA: its effects on proliferation and migration of human endothelial cells." *Mol Biotechnol* 26(1): 7-16.

Dou, L., C. Cerini, et al. (2002). "P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines." *Kidney Int* 62(6): 1999-2009.

Du, W., D. Thanos, et al. (1993). "Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements." *Cell* 74(5): 887-98.

Dwivedi, A., E. E. Anggard, et al. (2001). "Oxidized LDL-mediated monocyte adhesion to endothelial cells does not involve NFkappaB." *Biochem Biophys Res Commun* 284(1): 239-44.

- Dzau, V. J. (2001). "Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis." *Hypertension* 37(4): 1047-52.
- Dzau, V. J., R. C. Braun-Dullaeus, et al. (2002). "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies." *Nat Med* 8(11): 1249-56.
- Epe, B., D. Ballmaier, et al. (1996). "DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes." *Nucleic Acids Res* 24(21): 4105-10.
- Eva, A., U. Kirch, et al. (2006). "Signaling pathways involving the sodium pump stimulate NO production in endothelial cells." *Biochim Biophys Acta* 1758(11): 1809-14.
- Faruqi, T. R., S. C. Erzurum, et al. (1997). "Role of nitric oxide in poly(I-C)-induced endothelial cell expression of leukocyte adhesion molecules." *Am J Physiol* 273(5 Pt 2): H2490-7.
- Feil, C. and H. G. Augustin (1998). "Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines." *Biochem Biophys Res Commun* 247(1): 38-45.
- Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." *Endocr Rev* 18(1): 4-25.
- Figuroa, X. F., A. D. Martinez, et al. (2001). "In vivo assessment of microvascular nitric oxide production and its relation with blood flow." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(3): H1222-31.
- FitzGerald, G. A., B. Smith, et al. (1984). "Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation." *N Engl J Med* 310(17): 1065-8.
- FitzGerald, R. J. and H. Meisel (2000). "Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme." *Br J Nutr* 84 Suppl 1: S33-7.
- FitzGerald, R. J., B. A. Murray, et al. (2004). "Hypotensive peptides from milk proteins." *J Nutr* 134(4): 980S-8S.
- Friedland, J. and E. Silverstein (1976). "A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme." *Am J Clin Pathol* 66(2): 416-24.
- Gardner, M. L. (1984). "Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet--a neglected field?" *Biol Rev Camb Philos Soc* 59(3): 289-331.

Garthwaite, J. and C. L. Boulton (1995). "Nitric oxide signaling in the central nervous system." *Annu Rev Physiol* 57: 683-706.

Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H. *Die Innere Medizin*. 10. Auflage. Schattauer 2000

Ghersa, P., R. Hooft van Huijsduijnen, et al. (1994). "Inhibition of E-selectin gene transcription through a cAMP-dependent protein kinase pathway." *J Biol Chem* 269(46): 29129-37.

Goetz, R. M., H. S. Thatte, et al. (1999). "Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 2788-93.

Govers, R. and T. J. Rabelink (2001). "Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase." *Am J Physiol Renal Physiol* 280(2): F193-206.

Großer, Nina (2002). "Endothelprotektion durch Acetylsalicylsäure: Stickstoffmonoxid und cGMP als antioxidative Mediatoren." Dissertation, ULB Sachsen-Anhalt

Guo, D., Q. Jia, et al. (1995). "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation." *J Biol Chem* 270(12): 6729-33.

Guo, Y., S. Wang, et al. (2007). "Suppression of VEGF-mediated autocrine and paracrine interactions between prostate cancer cells and vascular endothelial cells by soy isoflavones." *J Nutr Biochem* 18(6): 408-17.

Gupta, M. P., M. D. Ober, et al. (2001). "Nitric oxide attenuates H₂O₂-induced endothelial barrier dysfunction: mechanisms of protection." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(1): L116-26.

Hajra, L., A. I. Evans, et al. (2000). "The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 9052-7.

Hernandez-Presa, M., C. Bustos, et al. (1997). "Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis." *Circulation* 95(6): 1532-41.

- Herschman, H. R., S. T. Reddy, et al. (1997). "Function and regulation of prostaglandin synthase-2." *Adv Exp Med Biol* 407: 61-6.
- Hobson, B. and J. Denekamp (1984). "Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies." *Br J Cancer* 49(4): 405-13.
- Honore, E. K., J. K. Williams, et al. (1997). "Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques." *Fertil Steril* 67(1): 148-54.
- Howard, A. N., Gresham, G. A., Jones, D. & Jennings, I. W. (1965). "The prevention of rabbit atherosclerosis by soya bean meal." *J. Atheroscler. Res.* 5: 330-337
- Huff, M. W. and K. K. Carroll (1980). "Effects of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits." *J Lipid Res* 21(5): 546-48.
- Humar, R., F. N. Kiefer, et al. (2002). "Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling." *FASEB J* 16(8): 771-80.
- Huo, Y. and K. Ley (2001). "Adhesion molecules and atherogenesis." *Acta Physiol Scand* 173(1): 35-43.
- Husain, S., N. P. Andrews, et al. (1998). "Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis." *Circulation* 97(8): 716-20.
- Ignarro, L. J. (1999). "Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology." *Biosci Rep* 19(2): 51-71.
- Ihling, C., T. Szombathy, et al. (2001). "Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis." *Circulation* 104(8): 864-9.
- Ishizuka, T., K. Suzuki, et al. (1996). "Thromboxane A2 receptor blockade suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells." *Eur J Pharmacol* 312(3): 367-77.
- Jaffe, E. A. and B. B. Weksler (1979). "Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin." *J Clin Invest* 63(3): 532-5.
- Johnson, A., D. T. Phelps, et al. (1994). "Tumor necrosis factor-alpha decreases pulmonary artery endothelial nitrovasodilator via protein kinase C." *Am J Physiol* 267(3 Pt 1): L318-25.

- Jude, E. B., A. J. Boulton, et al. (1999). "The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: possible modulatory effects by transforming growth factor beta 1." *Diabetologia* 42(6): 748-57.
- Kakkar, R., R. V. Raju, et al. (1999). "Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1)." *Cell Mol Life Sci* 55(8-9): 1164-86.
- Kawka, D. W., M. Ouellet, et al. (2007). "Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium." *Biochim Biophys Acta* 1771(1): 45-54.
- Kim, S., M. Bakre, et al. (2002). "Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A." *J Clin Invest* 110(7): 933-41.
- Kim, S., M. Harris, et al. (2000). "Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A." *J Biol Chem* 275(43): 33920-8.
- Kinlay, S., D. Behrendt, et al. (2001). "Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries." *Circulation* 104(10): 1114-8.
- Kiriakidis, S., O. Hogemeier, et al. (2005). "Novel tempeh (fermented soyabean) isoflavones inhibit in vivo angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane assay." *Br J Nutr* 93(3): 317-23.
- Klingenberg, D., D. Gunduz, et al. (2004). "MEK/MAPK as a signaling element in ATP control of endothelial myosin light chain." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(4): C807-12.
- Kobayashi, T., Y. Tahara, et al. (2004). "Roles of thromboxane A₂ and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." *J Clin Invest* 114(6): 784-94.
- Kooistra, M. R., M. Corada, et al. (2005). "Epc1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin." *FEBS Lett* 579(22): 4966-72.
- Kritchevsky, D. (1995). "Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history." *J Nutr* 125(3 Suppl): 589S-593S.
- Kroncke, K. D., C. V. Suschek, et al. (2000). "Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity." *Antioxid Redox Signal* 2(3): 585-605.

Ku, D. N., D. P. Giddens, et al. (1985). "Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress." *Arteriosclerosis* 5(3): 293-302.

Kubes, P., M. Suzuki, et al. (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4651-5.

Kuhlencordt, P. J., E. Rosel, et al. (2004). "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(5): C1195-202.

Lawrence, T., D. A. Willoughby, et al. (2002). "Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation." *Nat Rev Immunol* 2(10): 787-95.

Lee, S. C., J. W. Lee, et al. (2000). "Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin." *Br J Dermatol* 142(4): 653-9.

Lefer, A. M. and D. J. Lefer (1996). "The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion." *Cardiovasc Res* 32(4): 743-51.

Leibach, F. H. and V. Ganapathy (1996). "Peptide transporters in the intestine and the kidney." *Annu Rev Nutr* 16: 99-119.

Leitman, D. C., R. R. Fiscus, et al. (1986). "Forskolin, phosphodiesterase inhibitors, and cyclic AMP analogs inhibit proliferation of cultured bovine aortic endothelial cells." *J Cell Physiol* 127(2): 237-43.

Lemaire, S., G. Lizard, et al. (1998). "Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol." *FEBS Lett* 440(3): 434-9.

Levinthal, D. J. and D. B. DeFranco (2004). "Transient phosphatidylinositol 3-kinase inhibition protects immature primary cortical neurons from oxidative toxicity via suppression of extracellular signal-regulated kinase activation." *J Biol Chem* 279(12): 11206-13.

Lewerenz, J., J. Letz, et al. (2003). "Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress." *J Neurochem* 87(2): 522-31.

Lin, S. J., S. K. Shyue, et al. (2005). "Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced

by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(2): 334-40.

Lindl, T. (2002): *Zell- und Gewebekultur*, Spektrum Akademischer Verlag

Linz, A. L., R. Xiao, et al. (2004). "Feeding of soy protein isolate to rats during pregnancy and lactation suppresses formation of aberrant crypt foci in their progeny's colons: interaction of diet with fetal alcohol exposure." *J Carcinog* 3(1): 14.

Liu, D., H. Jiang, et al. (2005). "Genistein activates the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in vascular endothelial cells and protects endothelial barrier function." *Endocrinology* 146(3): 1312-20.

Liu, L., L. Zubik, et al. (2004). "The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds." *Atherosclerosis* 175(1): 39-49.

Liu, S., R. T. Premont, et al. (2003). "Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt." *J Biol Chem* 278(50): 49929-35.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-75.

Lucas, A. D. and D. R. Greaves (2001). "Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages." *Expert Rev Mol Med* 2001: 1-18.

Luft, F. C. (2001a). "Angiotensin, inflammation, hypertension, and cardiovascular disease." *Curr Hypertens Rep* 3(1): 61-7.

Luft, F. C. (2001b). "Workshop: mechanisms and cardiovascular damage in hypertension." *Hypertension* 37(2 Part 2): 594-8.

MacNicol, M. C. and A. M. MacNicol (1999). "Nerve growth factor-stimulated B-Raf catalytic activity is refractory to inhibition by cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 274(19): 13193-7.

Magazine, H. I., J. Chang, et al. (2000). "Rebound from nitric oxide inhibition triggers enhanced monocyte activation and chemotaxis." *J Immunol* 165(1): 102-7.

Marrero, M. B., V. J. Venema, et al. (1999). "Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors." *Biochem J* 343 Pt 2: 335-40.

Marsden, P. A., K. T. Schappert, et al. (1992). "Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase." *FEBS Lett* 307(3): 287-93.

Marui, N., M. K. Offermann, et al. (1993). "Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells." *J Clin Invest* 92(4): 1866-74.

May, M. J., C. P. Wheeler-Jones, et al. (1996). "Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecule expression by human umbilical vein endothelial cells." *Br J Pharmacol* 118(7): 1761-71.

Meeker, D. R., Kesten, H. D. (1941). "Experimental atherosclerosis and high protein diets". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 45: 543-545

Melrose, J., N. Tsurushita, et al. (1998). "IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells." *J Immunol* 161(5): 2457-64.

Michel, T., G. K. Li, et al. (1993). "Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13): 6252-6.

Moncada, S. (1982). "Eighth Gaddum Memorial Lecture. University of London Institute of Education, December 1980. Biological importance of prostacyclin." *Br J Pharmacol* 76(1): 3-31.

Moncada, S. and E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." *FASEB J* 9(13): 1319-30.

Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* 43(2): 109-42.

Moore, S. and W. H. Stein (1954). "A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds." *J Biol Chem* 211(2): 907-13.

Moore, T. M., P. M. Chetham, et al. (1998). "Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP." *Am J Physiol* 275(2 Pt 1): L203-22.

Morbidelli, L., C. H. Chang, et al. (1996). "Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium." *Am J Physiol* 270(1 Pt 2): H411-5.

Moroi, M., L. Zhang, et al. (1998). "Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice." *J Clin Invest* 101(6): 1225-32.

Mukherjee, T. K., L. Nathan, et al. (2003). "17-epiestriol, an estrogen metabolite, is more potent than estradiol in inhibiting vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) mRNA expression." *J Biol Chem* 278(14): 11746-52.

Mullershausen, F., M. Russwurm, et al. (2004). "Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272." *Circulation* 109(14): 1711-3.

Munoz-Chapuli, R., A. R. Quesada, et al. (2004). "Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells." *Cell Mol Life Sci* 61(17): 2224-43.

Nakagami, H., T. X. Cui, et al. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits growth factor-mediated cell proliferation through SHP-1 activation in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(2): 238-42.

Narang, V. S., G. M. Pauletti, et al. (2003). "Suppression of cystine uptake by sulfasalazine inhibits proliferation of human mammary carcinoma cells." *Anticancer Res* 23(6C): 4571-9.

Needleman, P., S. Moncada, et al. (1976). "Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides." *Nature* 261(5561): 558-60.

Neish, A. S., M. A. Read, et al. (1995). "Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1." *Mol Cell Biol* 15(5): 2558-69.

Nguyen, T., D. Brunson, et al. (1992). "DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 3030-4.

Niwano, K., M. Arai, et al. (2003). "Transcriptional stimulation of the eNOS gene by the stable prostacyclin analogue beraprost is mediated through cAMP-responsive element in vascular endothelial cells: close link between PGI2 signal and NO pathways." *Circ Res* 93(6): 523-30.

Ogletree, M. L. (1987). "Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2." *Fed Proc* 46(1): 133-8.

Ogonowski, A. A., W. H. Kaesemeyer, et al. (2000). "Effects of NO donors and synthase agonists on endothelial cell uptake of L-Arg and superoxide production." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(1): C136-43.

- Ollivier, V., G. C. Parry, et al. (1996). "Elevated cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells." *J Biol Chem* 271(34): 20828-35.
- Osanai, T., N. Fujita, et al. (2000). "Cross talk of shear-induced production of prostacyclin and nitric oxide in endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(1): H233-8.
- Papapetropoulos, A., A. Cziraki, et al. (1996). "cGMP accumulation and gene expression of soluble guanylate cyclase in human vascular tissue." *J Cell Physiol* 167(2): 213-21.
- Patrono, C. and G. A. FitzGerald (1997). "Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2309-15.
- Patti, M. E., E. Brambilla, et al. (1998). "Bidirectional modulation of insulin action by amino acids." *J Clin Invest* 101(7): 1519-29.
- Pedram, A., M. Razandi, et al. (1997). "Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion." *J Biol Chem* 272(27): 17097-103.
- Pedram, A., M. Razandi, et al. (2001). "Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis." *Endocrinology* 142(4): 1578-86.
- Perkins, N. D., N. L. Edwards, et al. (1993). "A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation." *EMBO J* 12(9): 3551-8.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Pihlanto-Leppälä, A., 2001: Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE inhibitory peptides. *Trends Food Science Technology* 11, 347-356; Meisel, H., 1998: Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy Journal* 8, 363-373
- Pober, J. S., M. R. Slowik, et al. (1993). "Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1." *J Immunol* 150(11): 5114-23.

- Polte, T. and H. Schroder (1998). "Cyclic AMP mediates endothelial protection by nitric oxide." *Biochem Biophys Res Commun* 251(2): 460-5.
- Rahman, A., K. N. Anwar, et al. (2004). "cAMP targeting of p38 MAP kinase inhibits thrombin-induced NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in endothelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(5): L1017-24.
- Raines, E. W. and R. Ross (1996). "Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy?" *Bioessays* 18(4): 271-82.
- Read, M. A., M. Z. Whitley, et al. (1997). "Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways." *J Biol Chem* 272(5): 2753-61.
- Ringseis, R., B. Matthes, et al. (2005). "Peptides and hydrolysates from casein and soy protein modulate the release of vasoactive substances from human aortic endothelial cells." *Biochim Biophys Acta* 1721(1-3): 89-97.
- Rogue, P. J., J. P. Humbert, et al. (1998). "cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca²⁺-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9178-83.
- Rose, M. L., J. Madren, et al. (1999). "Dietary glycine inhibits the growth of B16 melanoma tumors in mice." *Carcinogenesis* 20(5): 793-8.
- Rothlein, R., M. Czajkowski, et al. (1988). "Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies." *J Immunol* 141(5): 1665-9.
- Ruegg, C., O. Dormond, et al. (2004). "Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1654(1): 51-67.
- Salcedo, R., J. H. Resau, et al. (2000). "Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells." *FASEB J* 14(13): 2055-64.
- Satake, M., M. Enjoh, et al. (2002). "Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers." *Biosci Biotechnol Biochem* 66(2): 378-84.
- Scheiner-Bobis, G., A. Eva, et al. (2006). "Signalling pathways involving sodium pump stimulate endothelin-1 secretion and nitric oxide production in endothelial cells." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52(8): 58-63.

Schieffer, B., E. Schieffer, et al. (2000). "Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability." *Circulation* 101(12): 1372-8.

Schmedtje, J. F., Jr., Y. S. Ji, et al. (1997). "Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells." *J Biol Chem* 272(1): 601-8.

Schmidt, H., (1995). "Determination of Nitric Oxide via Measurement of Nitrite and Nitrate in Culture Media." *BIOCHEMICA* 2: 22.

Schmidt, P., N. Youhnovski, et al. (2003). "Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase." *J Biol Chem* 278(15): 12813-9.

Schonbeck, U., G. K. Sukhova, et al. (1999). "Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions." *Am J Pathol* 155(4): 1281-91.

Schreck, R., P. Rieber, et al. (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." *EMBO J* 10(8): 2247-58.

Schrimpf G: *Gentechnische Methoden 3*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.

Sharma, R. K. and J. Kalra (1994). "Molecular interaction between cAMP and calcium in calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase system." *Clin Invest Med* 17(4): 374-82.

Shen, Y. H., X. L. Wang, et al. (1998). "Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways." *FEBS Lett* 433(1-2): 125-31.

Shiiki, S., S. Fuchimoto, et al. (1990). "A comparison of the antitumor effects of natural human tumor necrosis factors alpha and beta: the roles of arachidonic acid metabolism and intracellular cAMP." *Jpn J Clin Oncol* 20(3): 252-8.

Shiraishi, H., T. Kato, et al. (2003). "cGMP inhibits GTP cyclohydrolase I activity and biosynthesis of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells." *J Pharmacol Sci* 93(3): 265-71.

Steffel, J., M. Hermann, et al. (2005). "Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-Jun terminal NH2 kinase phosphorylation." *Circulation* 111(13): 1685-9.

Stein, B., A. S. Baldwin, Jr., et al. (1993). "Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function." *EMBO J* 12(10): 3879-91.

Stelzner, T. J., J. V. Weil, et al. (1989). "Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties." *J Cell Physiol* 139(1): 157-66.

Stepp, D. W., D. Merkus, et al. (2001). "Nitric oxide limits coronary vasoconstriction by a shear stress-dependent mechanism." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(2): H796-803.

Stevens, T., J. Creighton, et al. (1999). "Control of cAMP in lung endothelial cell phenotypes. Implications for control of barrier function." *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): L119-26.

Takeuchi, K., H. Watanabe, et al. (2004). "Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I2 production and nitric oxide synthase expression." *Cardiovasc Res* 62(1): 194-201.

Tesmer, J. J., R. K. Sunahara, et al. (1997). "Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S." *Science* 278(5345): 1907-16.

Toborek, M. and S. Kaiser (1999). "Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis." *Basic Res Cardiol* 94(5): 295-314.

Tomai, F., F. Crea, et al. (2001). "Unstable angina and elevated c-reactive protein levels predict enhanced vasoreactivity of the culprit lesion." *Circulation* 104(13): 1471-6.

Tsao, P. S., R. Buitrago, et al. (1996). "Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1." *Circulation* 94(7): 1682-9.

Tschudi, M. R., G. Noll, et al. (1997). "[Pharmacotherapy of arteriosclerosis and its complications. Effect of ACE inhibitors and HMG-CoA-reductase inhibitors]." *Schweiz Med Wochenschr* 127(15): 636-49.

Umetani, M., H. Nakao, et al. (2000). "A novel cell adhesion inhibitor, K-7174, reduces the endothelial VCAM-1 induction by inflammatory cytokines, acting through the regulation of GATA." *Biochem Biophys Res Commun* 272(2): 370-4.

- Van Winkle, L. J., J. K. Tesch, et al. (2006). "System B₀+ amino acid transport regulates the penetration stage of blastocyst implantation with possible long-term developmental consequences through adulthood." *Hum Reprod Update* 12(2): 145-57.
- Venema, V. J., R. Zou, et al. (1997). "Caveolin-1 detergent solubility and association with endothelial nitric oxide synthase is modulated by tyrosine phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* 236(1): 155-61.
- Venugopal, S. K., S. Devaraj, et al. (2003). "C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells." *Circulation* 108(14): 1676-8.
- Vermeirssen, V., B. Deplancke, et al. (2002). "Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer." *J Pept Sci* 8(3): 95-100.
- Vermeirssen, V., J. Van Camp, et al. (2004). "Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides." *Br J Nutr* 92(3): 357-66.
- Vossler, M. R., H. Yao, et al. (1997). "cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway." *Cell* 89(1): 73-82.
- Wang, L. Z., Q. Z. Zhang, et al. (2001). "Verapamil, cyproheptadine, and anisodamine antagonized [Ca²⁺]_i elevation induced by TNF α in a single endothelial cell." *Acta Pharmacol Sin* 22(10): 918-22.
- Wang, P., Z. F. Ba, et al. (1994). "Administration of tumor necrosis factor- α in vivo depresses endothelium-dependent relaxation." *Am J Physiol* 266(6 Pt 2): H2535-41.
- Weber, K. S., P. J. Nelson, et al. (1999). "Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(9): 2085-93.
- Wen, J. F., X. Cui, et al. (2004). "High and low gain switches for regulation of cAMP efflux concentration: distinct roles for particulate GC- and soluble GC-cGMP-PDE3 signaling in rabbit atria." *Circ Res* 94(7): 936-43.
- Westphal, S., E. Taneva, et al. (2006). "Endothelial dysfunction induced by postprandial lipemia is neutralized by addition of proteins to the fatty meal." *Atherosclerosis* 185(2): 313-9.
- Wilcox, J. N., R. R. Subramanian, et al. (1997). "Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2479-88.

Wise, H., Y. H. Wong, et al. (2002). "Prostanoid signal integration and cross talk." *Neurosignals* 11(1): 20-8.

Wolle, J., R. R. Hill, et al. (1996). "Selective inhibition of tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcription factor NF-kappa B." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16(12): 1501-8.

Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." *Biochem J* 336 (Pt 1): 1-17.

Wu, J. and X. Ding (2001). "Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats." *J Agric Food Chem* 49(1): 501-6.

Xie, W., B. S. Fletcher, et al. (1994). "v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element." *Mol Cell Biol* 14(10): 6531-9.

Yamaguchi, M., H. Suwa, et al. (1997). "Selective inhibition of vascular cell adhesion molecule-1 expression by verapamil in human vascular endothelial cells." *Transplantation* 63(5): 759-64.

Yamahara, K., H. Itoh, et al. (2003). "Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3404-9.

Yamamoto, N. (1997). "Antihypertensive peptides derived from food proteins." *Biopolymers* 43(2): 129-34.

Yamamoto, N., M. Ejiri, et al. (2003). "Biogenic peptides and their potential use." *Curr Pharm Des* 9(16): 1345-55.

Yang, W., L. Meng, et al. (2006). "Inhibition of proliferative and invasive capacities of breast cancer cells by arginine-glycine-aspartic acid peptide in vitro." *Oncol Rep* 15(1): 113-7.

Yeh, E. T. and J. T. Willerson (2003). "Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology." *Circulation* 107(3): 370-1.

Yin, Y., P. D. Allen, et al. (2000). "Constitutive levels of cAMP-dependent protein kinase activity determine sensitivity of human multidrug-resistant leukaemic cell lines to

growth inhibition and apoptosis by forskolin and tumour necrosis factor alpha." *Br J Haematol* 108(3): 565-73.

Yla-Herttuala, S., B. A. Lipton, et al. (1991). "Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12): 5252-6.

Yuan, J. (1997). "Transducing signals of life and death." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 247-51.

Zampolli, A., G. Basta, et al. (2000). "Inhibition of endothelial cell activation by nitric oxide donors." *J Pharmacol Exp Ther* 295(2): 818-23.

Zapolska-Downar, D., A. Zapolski-Downar, et al. (2000). "Selective inhibition by alpha-tocopherol of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 274(3): 609-15.

Zhao, J., N. Araki, et al. (1995). "Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control." *Gene* 155(2): 159-65.

Zou, M. H., M. Leist, et al. (1999). "Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries." *Am J Pathol* 154(5): 1359-65.

A Anhang

Tabelle A1: Grobcharakterisierung der Hydrolysate ohne Membranfraktionierung

Lyophilisierte wasserlösliche Hydrolysate aus Gesamtcasein (α, β, γ, κ) von Kuhmilch mit Verdauungsenzymen bei 37°C, schwerlöslich in Methanol, Ethanol, Acetonitril					
Hydrolysat	Salzgehalt in %	0,1mg/ml/cm ΔA		Mittlere Molmasse (D)	% freie AS
		230	280nm		
C // E+T	-	0,313	0,046	1.000	25,6
C / E+T+C	-	0,432	0,067	935	29,2
C / P+E+T	-	0,418	0,074	943	31,5
C / P+E+T+C	-	0,363	0,067	862	30,2
C // P / C	-	0,423	0,082	1.300	27,8
C // P / E	4,5	0,417	0,080	1.500	22,9
C // P / T	5,0	0,420	0,091	1.300	34,0
Lyophilisierte wasserlösliche Hydrolysate aus Sojaprotein, mit Ethanol gewaschen, mit Verdauungsenzymen bei 37°C					
S // P+T	3,1	0,373	0,086	4.545	32,5
S // P+T+C	2,3	0,381	0,090	1.666	42,2
S // P+T+C+E	2,0	0,415	0,096	1.724	39,9
S // P / C	-	0,458	0,099	3.571	36,2
S // P / E	-	0,432	0,096	2.777	42,1
S // P / T	-	0,530	0,129	3.448	35,2
S // P / T+C+E	-	0,434	0,096	1.000	48,1

C // Protease = wasserlösliches Hydrolysat (lyophilisiert) der Proteolyse von Casein (bzw. Soja (S)), verdaut mit einer Protease

C // Protease / Protease = wasserlösliches Hydrolysat (lyophilisiert) der Proteolyse des Pellets aus C // Protease (angedautes, wasserunlösliches Protein) mit einer weiteren Protease

C // Protease + Protease = C // Protease (als Proteolyse-Überstand), verdaut mit weiterer Protease

C // Protease + Protease* = C // Protease (als Proteolyse-Gesamtsuspension), verdaut mit weiterer Protease

***Proteasen:** P – Pepsin; E – Elastase; T – Trypsin; C – Chymotrypsin

Tabelle A2: Grobcharakterisierung der Hydrolysate mit Membranfraktionierung

Lyophilisierte, wasserlösliche Hydrolysate < 5 kD aus Gesamtcasein (α, β, γ, κ) von Kuhmilch mit Verdauungsenzym-Mix bei 37°C in Rührzelle, Fraktionierung mit 5 kD, 3 kD und 1 kD Membranen					
Hydrolysat	Membranfraktionierung	0,1mg/ml/cm		Hydrolysatgehalt (%)	Trypsingehalt (%)
		ΔA 230	280nm		
C // P+T	< 1 kD	0,389	0,061	61	0,00
C // P+T	1 – 3 kD	0,389	0,061	89	0,90
C // P+T, C	< 1 kD	0,527	0,084	66	0,00
C // P+T, C	1 – 3 kD	0,407	0,067	82	0,00
C // P+T, C, E	< 1 kD	0,361	0,073	54	0,00
C // P+T, C, E	1 – 3 kD	0,367	0,067	82	0,34
Lyophilisierte, wasserlösliche Hydrolysate < 5 kD aus Sojaprotein Isolat mit Verdauungsenzym-Mix bei 37°C in Rührzelle, Fraktionierung mit 5 kD, 3 kD und 1 kD Membranen					
S // P+T	< 1 kD	0,217	0,055	57	0,00
S // P+T	1 – 3 kD	0,375	0,067	100	0,09
S // P+T, C	< 1 kD	0,208	0,068	37	0,00
S // P+T, C	1 – 3 kD	0,286	0,064	85	0,08
S // P+T, C, E	< 1 kD	0,234	0,067	57	0,00

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die eingereichte Dissertation "Die Wirkung von Hydrolysaten aus Nahrungsproteinen auf funktionelle Parameter von humanen Aortenendothelzellen" selbständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich die zur Erstellung der Dissertationsschrift verwendeten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Wölkau, den 17.06.2009

Birgit Matthes

Dank

Ich möchte mich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Professor Dr. K. Eder für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die Gewährung der Forschungsmöglichkeiten und die umfassende Unterstützung.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. K. Becker für ihre Einweisung in die Thematik und die experimentellen Techniken und Herrn PD Dr. R. Ringseis für seine Unterstützung während der experimentellen Arbeit, seine schnelle und kritische Durchsicht meines Manuskriptes und seine stets anregenden Ratschläge, insbesondere auf dem oft gemeinsamen Arbeitsweg.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für Agrar- und Ernährungswissenschaften, insbesondere an Frau A. Schibelius-Aßmann und Herrn W. Böttcher für ihre zuverlässige Hilfe bei den analytischen Untersuchungen.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Doktoranden des Instituts, insbesondere Frau Dr. V. Götze für ihre stete Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit und Fr. Dr. Bettina König für die vielen hilfreichen und interessanten Diskussionen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinem Mann Gabor und bei meiner Mutter, deren Interesse an meiner Arbeit und meinem beruflichen Werdegang mir ein stetiger Ansporn waren.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinem Chef Herrn Bogaers für die zur Verfügung gestellte Zeit und die Arbeitsmittel, sowie seine permanente Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit ganz herzlich danken.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname Birgit Matthes (geb. Matthes)
Geburtsdatum 14.01.1974
Geburtsort Jena
Familienstand verheiratet
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1980 – 1982 POS Werner-Seelenbinder in Jena
1982 – 1990 Adolf-Reichwein-Oberschule mit erweitertem Russischunterricht in Jena
1990 – 1992 1. Ausnahmegymnasium in Jena
Abschluss: Abitur

Studium

1992 – 1998 Friedrich Schiller Universität Jena
Abschluss: Diplom-Trophologin
1998 – 2001 Friedrich Schiller Universität Jena
Abschluss: Diplom-Umweltwissenschaftler

Wissenschaftliche Tätigkeit

10/2002 – 5/2005 Doktorandin am Institut für Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

Berufliche Tätigkeit

01/2006 – 11/2006 QMB Hallesche Essig- und Senffabrik in Tollwitz
11/2006 – 07/2008 QMB Weigl Management AG in Nürnberg
Seit 07/2008 QMB EgeSun GmbH in Oyten
Seit 07/2008 Quality Consultant Fa. Manz Marken Vertriebs GmbH, Filderstadt

Publikation

Ringseis R, Matthes B, Lehmann V, Becker K, Schöps R, Ulbrich-Hofmann R, Eder K (2005). "Peptides and hydrolysates from casein and soy protein modulate the release of vasoactive substances from human aortic endothelial cells." *Biochim Biophys Acta* 1721(1-3): 89-97.