

Aus dem Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K. Eder)

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

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Die Wirkung von Di- und Tripeptiden auf funktionelle Parameter von humanen Endothelzellen der Aorta

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Trophologin
Vera Götze (geb. Lehmann)

geb. am 11.07.1977
in Ueckermünde

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

Verteidigung am: 3.11.2008

Halle/Saale 2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014886

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014886>]

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Chemikalien und Lösungen	7
2.2 Geräte und Hilfsmittel	11
2.3 Zellkultur	12
2.3.1 Kultivierung der humanen Endothelzellen der Aorta	12
2.3.2 Serumfreie Kultivierung der HAoEC	13
2.3.3 Stimulation der HAoEC mit TNF- α	14
2.3.4 Kultivierung der U937 Monozyten	14
2.4 Screening nach bioaktiven Peptiden	14
2.4.1 Ermittlung häufiger Aminosäuresequenzen aus Milch- und Sojaprotein	14
2.4.2 Extinktionsmessungen zur Bestimmung der Dipeptidstabilität in Lösung	15
2.4.3 Zellproliferationsassay	15
2.4.4 MTT-Test zur Viabilitätsbestimmung	16
2.4.5 Proteinbestimmung	16
2.5 Untersuchungen zum Einfluss bioaktiver Peptide auf die Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen in bzw. aus HAoEC	17
2.5.1 Bestimmung der Freisetzung des Stickstoffmonoxid	17
2.5.2 Bestimmung der Freisetzung der Eicosanoide Thromboxan A ₂ (TXA ₂) und Prostazyklin (PGI ₂)	17
2.5.3 Bestimmung der Konzentrationen des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) in HAoEC	19
2.5.4 Aktivitätsbestimmung des ACE	20
2.6 Untersuchungen zum Einfluss bioaktiver Peptide auf die adhäsiven Eigenschaften von HAoEC	20
2.6.1 Bestimmung der Oberflächenexpression von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1	20
2.6.2 Bestimmung der Adhäsion von Monozyten an HAoEC	21
2.7 Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration der Enzyme eNOS, COX-1, COX-2, E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1	22
2.7.1 RNA-Isolierung, Quantifizierung, Qualitätsbestimmung	22
2.7.2 Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	22
2.7.3 cDNA-Erststrangsynthese	23
2.7.4 Real-time RT-PCR	23
2.7.5 Semiquantitative PCR	25
2.8 Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B	26
2.8.1 Nuklearextraktion	26
2.8.2 DNA-Bindungsaktivität der NF- κ B Untereinheiten p50 und p65	27
2.9 Statistische Auswertung	27

3	Ergebnisse	28
3.1	Ermittlung geeigneter Kultivierungsbedingungen für HAoEC	28
3.1.1	Stabilität des Dipeptids H-Ser-Glu-OH in Lösung	28
3.1.2	Einfluss von Serumalternativen auf die Morphologie von HAoEC	29
3.2	Screening nach bioaktiven Peptiden	31
3.2.1	Ermittlung häufiger Aminosäuresequenzen aus Milch- und Sojaprotein	31
3.2.2	Endothelzellproliferation unter Peptid- bzw. Aminosäureeinfluss	32
3.2.3	Einfluss bioaktiver Peptide auf die Zellviabilität	32
3.3	Einfluss bioaktiver Peptide auf die Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen in bzw. aus HAoEC	37
3.3.1	Stickstoffmonoxid	37
3.3.2	Thromboxan A2	37
3.3.3	Prostazyklin	38
3.3.4	Relative mRNA-Konzentrationen von eNOS, COX-1 und COX-2	42
3.3.5	Aktivität des ACE	44
3.3.6	Second Messenger	44
3.4	Einfluss bioaktiver Peptide auf die adhäsiven Eigenschaften von HAoEC	45
3.4.1	Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1	45
3.4.2	Relative mRNA-Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1	48
3.4.3	Adhäsion von U937-Monozyten an HAoEC	49
3.5	Einfluss bioaktiver Peptide auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B	50
4	Diskussion	52
4.1	Serumfreie Zellkultur	52
4.2	Proliferation	54
4.3	Freisetzung vasoaktiver Substanzen	59
4.4	Adhäsive Eigenschaften der HAoEC	66
5	Zusammenfassung	71
6	Summary	74
7	Literaturverzeichnis	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Primer für die real-time RT-PCR im RotorGene 2000.....	24
Tabelle 2:	Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR im Mastercycler® personal von Eppendorf.....	26
Tabelle 3:	Vorkommen von Di- und Tripeptiden in der Primärsequenz von Caseinen und den Sojaproteinen Glycinin G1 und β -Conglycinin	31
Tabelle 4:	Relative Proliferation von HAoEC nach 24h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden verglichen mit unbehandelten Zellen.....	33
Tabelle 5:	Relative Proliferation von HAoEC nach 24h Inkubation mit Aminosäuren verglichen mit unbehandelten Zellen	36
Tabelle 6:	Relative Lebensfähigkeit von HAoEC nach 24h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen	36
Tabelle 7:	Relative NO-Konzentration pro Mikrogramm Zellprotein im Zellüberstand von HAoEC nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen	39
Tabelle 8:	Relative TXB ₂ -Konzentration pro Mikrogramm Zellprotein im Zellüberstand nach 1 h Inkubation in HBSS von HAoEC nach 24 h Vorinkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen.....	40
Tabelle 9:	Relative 6-keto PGF _{1α} -Konzentration pro Mikrogramm Zellprotein im Zellüberstand nach 1 h Inkubation in HBSS von HAoEC nach 24 h Vorinkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen.....	41
Tabelle 10:	Relative mRNA-Konzentration von eNOS in unstimulierten und stimulierten HAoEC nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen.....	43
Tabelle 11:	Relative mRNA-Konzentration von COX-1 und COX-2 in unstimulierten HAoEC ^a nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen.....	43
Tabelle 12:	Relative Aktivität des ACE [μ mol H-His-Leu-OH min ⁻¹ μ g Zellprotein ⁻¹] in HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen.....	44

Tabelle 13:	Relative mRNA-Konzentration von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 in HAoEC nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) verglichen mit unbehandelten Zellen	49
--------------------	--	----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konzentrationsabhängige Absorption des in bidestilliertem Wasser gelösten Dipeptids H-Ser-Glu-OH unter Einfluss von FKS	28
Abbildung 2: Konzentrationsabhängige Absorption des in bidestilliertem Wasser gelösten Dipeptids H-Ser-Glu-OH unter Einfluss von Ultrosor [®] G	29
Abbildung 3: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 5% FKS (10x20 und 10x40 vergrößert).....	29
Abbildung 4: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 4% Ultrosor [®] G (10x20 und 10x40 vergrößert).....	30
Abbildung 5: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 5% BMS (10x20 und 10x40 vergrößert).....	30
Abbildung 6: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 0,1% SES (10x20 und 10x40 vergrößert).....	30
Abbildung 7: Relative intrazelluläre Konzentration von cAMP und cGMP [fmol/well] in HAoEC nach 30 min Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) verglichen mit unbehandelten Zellen:	45
Abbildung 8: Relative Oberflächenexpression von E-Selektin auf HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) verglichen mit unbehandelten Zellen.....	46
Abbildung 9: Relative Oberflächenexpression von VCAM-1 auf HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) verglichen mit unbehandelten Zellen.....	47
Abbildung 10: Relative Oberflächenexpression von ICAM-1 auf HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) verglichen mit unbehandelten Zellen.....	47
Abbildung 11: Einfluss von Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) auf die Adhäsion von U937-Monozyten an HAoEC.....	50
Abbildung 12: Einfluss von Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) auf die Aktivität der Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF-κB.....	51
Abbildung 13: Hauptsignalwege zur Proliferationssteigerung in Endothelzellen.....	55

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzym
AcSDKP	N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolin
AP-1	<i>Activating Protein-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCECF-AM	Bis-(carboxyethyl)-5(6)- carboxyfluoresceinacetoxymethylester
BMS	Basal Medium Supplement
BKR	Bradykininrezeptor
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxiuridin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DNA	<i>Desoxiribo Nucleic Acid</i>
ECGM MV	<i>Endothelial Cell Growth Medium Microvascular</i>
ECGS/H	<i>Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin</i>
EDG	<i>endothelial differentiation sphingolipid G-protein- coupled receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallocatechin-Gallat
EIA	Enzymimmunassay
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide-Synthase</i>
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GluR	Glutamatrezeptor

HAoEC	<i>Human Aortic Endothelial Cell</i>
hbFGF	<i>human basic Fibroblast Growth Factor</i>
HepesBSS	<i>Hepes Buffered Salt Solution</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salts</i>
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
hEGF	<i>human Epidermal Growth Factor</i>
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
HHL	Hippuryl-His-Leu
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IRF-1	<i>Interferon regulatory factor-1</i>
JNK	Jun N-terminale Kinase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
MCP	<i>Monocyte chemoattractant Protein</i>
MEK	Map Erk
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
mGluR	<i>metabotropic Glutamat Receptors</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
mTOR	<i>mamalian Target of Rapamycin</i>
MTP	Multititerplatte
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T Cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NK	Neurokinin
NO	<i>Nitric Oxide</i>
p	<i>probality</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

Abkürzungsverzeichnis

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PePT	Peptidtransporter
PGI ₂	Prostazyklin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
6-keto-PGF _{1α}	6-keto-Prostaglandin _{1α}
PI3K	Phospho Inositol 3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	<i>polymorphonuclear neutrophils</i>
rHu	<i>recombinant Human</i>
Raf	<i>Rapidly growing Fibrosarcoma</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RT	Reverse Transkriptase
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SES	Serumersatz
SMC	<i>Smooth muscle cells</i>
SP-1	<i>specificity protein</i>
TBE-Puffer	<i>Tris Borat EDTA-Puffer</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor – α</i>
TNS	<i>Trypsin Neutralisation Solution</i>
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

1 Einleitung und Fragestellung

Die wichtigste Aufgabe von Nahrungsproteinen ist es, den Körper mit essentiellen Aminosäuren und Stickstoff zu versorgen. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass es Nahrungsproteine gibt, die neben dieser Aufgabe noch andere spezifische Fähigkeiten besitzen. So genannte bioaktive Peptide mit bestimmten Aminosäurestrukturen können verschiedenste biologische Funktionen beeinflussen. Für bioaktive Peptide aus pflanzlichen wie aus tierischen Proteinen wurden unter anderem antimikrobielle und antifungielle Eigenschaften, hypotensive, cholesterolsenkende, antithrombotische und immunmodulatorische Effekte nachgewiesen (Rutherford-Markwick & Moughan, 2005).

Zum Beispiel kann Sojaprotein die Cholesterinhomöostase positiv beeinflussen. Der Gesamtplasmacholesterin- und Triglyceridspiegel von Ratten sinkt, wenn sie mit β -Conglycinin, einer Untereinheit des Sojaproteins, gefüttert werden (Aoyama *et al.*, 2001). Verschiedene Autoren zeigten, dass diese Wirkung auf eine Aktivierung der *Low-Density-Lipoprotein* (LDL)-Rezeptoren der Leber durch die 7S-Untereinheit und das β -Conglycinin zurückzuführen ist (Lovati *et al.*, 1992 und 2000; Sirtori & Lovati, 2001). Das β -Conglycinin des Sojaproteins reduziert in Mäusen zudem die Serumtriglyceride durch Induzierung der β -Oxidation, durch Herabregulierung der Fettsäuresynthese und durch Inhibierung der Triglyceridabsorption (Moriyama *et al.*, 2004). In Mäusen inhibiert es die Atherosklerose (Adams *et al.*, 2004).

Während für Sojaprotein antiatherogene Effekte nachgewiesen wurden, zeigten sich im Vergleich dazu für das Milchprotein Casein proatherogene Effekte. Diese gingen in Kaninchen mit erhöhten *Very Low-Density-Lipoprotein* (VLDL)- und LDL-Spiegeln einher (Damasceno *et al.*, 2001).

Jedoch sind es gerade auch Peptide aus dem Casein, die durch eine *Angiotensin-Converting-Enzym* (ACE) -Inhibierung hypotensive Effekte hervorrufen. Studien mit aus Milchprotein abgeleiteten ACE-inhibitorischen Proteinen zeigten blutdrucksenkende Effekte in spontan hypertensiven Ratten (Karaki *et al.*, 1990; Sipola *et al.*, 2002).

Solche regulatorischen Peptide werden durch enzymatische Proteolyse während der gastrointestinalen Passage freigesetzt (Schlimme & Meisel, 1995). Die Verdauung der Proteine beginnt im sauren Milieu des Magens mit der Einwirkung des Pepsins. Die entstandenen Polypeptide werden im Dünndarm durch die Pankreasproteasen Trypsin, α -Chymotrypsin, Elastase und die Carboxypeptidasen A und B weiter gespalten, so dass ein Gemisch aus Oligopeptiden und freien Aminosäuren entsteht, wobei die Oligopeptide den größeren Anteil ausmachen. Peptidasen der Bürstensaummembran hydrolysieren die Oligopeptide weiter, vorwiegend zu freien Aminosäuren, aber auch zu Di- und Tripeptiden. Von Bedeutung sind hierbei spezielle Aminopeptidasen, wie die Aminopeptidasen N und A, die N-terminal neutrale und anionische Aminosäuren abspalten, aber auch Endo- und Dipeptidasen. Die Dipeptidylcarboxypeptidase spaltet Dipeptide von C-terminaler Seite, die Dipeptidylaminopetidase IV spaltet vom N-Terminus her. Es stellte sich heraus, dass prolin- und hydroxyprolinhaltige Peptide generell resistent gegenüber Verdauungsenzymen sind (Ganong, 1997; Ganapathy & Leibach, 1999).

Di- und Tripeptide können über ein spezifisches Peptidtransportsystem intakt in die Zellen der Bürstensaummembran absorbiert werden. Dabei transportiert der Peptidtransporter PePT1 die Peptide entlang eines Protonengradienten, er hat eine breite Substratspezifität (Yang *et al.*, 1999). Im Enterozyten werden die meisten Peptide gewöhnlich durch intrazelluläre Peptidasen, wie Amino-tripeptidasen und Dipeptidasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten gegenüber verschiedenen Aminosäuren, zu freien Aminosäuren hydrolysiert. Diese verlassen über ein spezifisches Transportsystem in der basolateralen Membran die Enterozyten und gelangen in das Pfortaderblut (Ganapathy & Leibach, 1999). Dass auch intakte Peptide durch die Bürstensaummembran gelangen können, ist ein einzigartiges Phänomen, im Vergleich zu den regulären Verdauungs- und Absorptionsvorgängen – ist aber weitgehend akzeptiert (Gardner, 1988; Grimble, 2000). Neben dem Transport über den PePT1 können Peptide über para- und transzelluläre Wege absorbiert werden. Parazellulär gelangen große wasserlösliche Peptide über *tight junctions* energieunabhängig durch die Darmzellen. Transzellulär diffundieren fettlösliche Peptide passiv durch die Zellen. Peptide können aber auch durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (Ziv &

Bendayan, 2000; Satake *et al.*, 2002) und, wenn sie hydrolyseresistent sind, über basolateral gelegene Peptidtransporter in die Blutzirkulation abgegeben werden (Gardner, 1984).

Ob Peptide in intakter Form durchs Epithel transportiert werden können, ist von ihrer Struktur und ihren Eigenschaften abhängig (Satake *et al.*, 2002). Unempfindlich gegenüber intestinalen Peptidasen scheinen z.B. die prolinhaltigen ACE-hemmenden Peptide H-Ile-Pro-Pro-OH und H-Val-Pro-Pro-OH zu sein. Masuda *et al.* (1996) konnten diese Peptide 6 Stunden nach der Aufnahme von Sauermilch in der Aorta abdominalis von spontan hypertensiven Ratten detektieren. Für H-Val-Pro-Pro-OH wurde von Satake *et al.* (2002) der parazelluläre Weg über *tight junctions* als der vorrangige Transportweg identifiziert. Vermeirssen *et al.* (2002) konnten den Transport des intakten Heptapeptides H-Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg-OH (aus dem beta-Lactoglobulin) durch eine Monolayerschicht Caco-2 Bbe Zellen in einer Ussingkammer nachweisen. Auch das antihypertensive Dipeptid H-Val-Tyr-OH ist dosisabhängig in Humanplasma mit einem Maximum 2 Stunden nach oraler Aufnahme gemessen worden (Matsui *et al.*, 2002).

Speziell die inhibierende Wirkung bestimmter Peptide auf das ACE, eine Metalloprotease an der Oberfläche von vaskulären Endothelzellen, lässt vermuten, dass Nahrungsproteine in den Blutkreislauf gelangen und die Endothelzellfunktion beeinflussen können.

Das Endothel bildet eine durchgehende semipermeable multifunktionelle Grenzschicht zwischen Blut und Gewebe. Normale Endothelzellen tragen als Sensor, Integrator und Signalgeber aktiv zur Aufrechterhaltung des Blutflusses, zur Regulation der Fibrinolyse, zur Regulation der Gefäßwanddurchlässigkeit und der koagulativen und adhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand bei. Dabei spielen die Bildung vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Eicosanoiden und die Expressierung von Adhäsionsmolekülen eine wesentliche Rolle (Toborek & Kaiser, 1999; Rösen, 2002). Eine Störung des Gleichgewichtes zwischen vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen, zwischen Wachstumsinhibitoren und Wachstumsfaktoren, zwischen anti- und proinflammatorischen und zwischen anti- und prothrombotischen Faktoren führt zur endothelialen Dysfunktion, welche einen

kritischen Faktor für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen darstellt (Feletou & Vanhoutte, 2006). Gesunde Endothelzellen bilden eine nichtthrombogene Oberfläche und verhindern die Adhäsion und Aggregation von Blutzellen an der Gefäßoberfläche. Bei veränderter Endothelfunktion wird eine erhöhte Adhäsivität für mononukleäre Leukozyten (Monozyten und spezifische T-Lymphozyten) festgestellt, die unter anderem auf eine verminderte Bildung des antithrombotischen NO und Prostazyklin zurückzuführen ist und auf eine erhöhte Exprimierung von Adhäsionsmolekülen wie dem *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM-1), dem *Intracellular Adhesion Molecule* (ICAM-1), dem P- und E-Selektin auf der Endothelzelloberfläche (Gimbrone, 1999). Als Ursache für die endotheliale Dysfunktion werden unterschiedliche pathophysiologische Faktoren wie oxidierte LDL, Homocystein, *Advanced Glycation Endproducts*, postprandiale Hyperglykämie, Zytokine, bakterielle Stoffwechselprodukte und hämodynamische Stressfaktoren diskutiert. Sie alle gelten als Stimuli für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im Endothel (Sen & Packer, 1996; Rosen *et al.*, 2001). Übersteigt der oxidative Stress die antioxidative Kapazität, die das Endothel mit der Superoxid-Dismutase, der Katalase, der Glutathion-Reduktase, Glutathion und Vitamin C mitbringt, kann das Redoxgleichgewicht der Endothelzelle nicht aufrechterhalten werden. In Folge werden nicht nur zelluläre Membranen zerstört, sondern auch Makromoleküle wie Proteine und Desoxyribonukleinsäure (DNA) in ihrer Struktur und Funktion verändert. Auch die Transkriptionsfaktoren *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) und *Activating Protein-1* (AP-1) sind redoxsensitiv und werden durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert (Tak & Firestein, 2001). Dies führt zur gesteigerten Produktion proatherogener Zytokine wie dem Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), der Interleukine IL-1 und IL-6 sowie zur gesteigerten Bildung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen (Esper *et al.*, 2006). TNF- α wiederum induziert eine Abnahme der endothelialen NO-Synthase (eNOS) -Promotoraktivität (Neumann *et al.*, 2004).

Neben den eben beschriebenen Veränderungen der Endothelfunktion kann auch eine veränderte Proliferationsrate der Endothelzellen kritisch hinsichtlich der Atheroskleroseentwicklung sein. Während unter normalen Bedingungen die Gefäßwandzellen nicht proliferieren, treten sie an kleinen Verletzungen der Gefäßwand in den Zellzyklus ein und fördern die Reendothelialisierung. Allerdings

kann eine übersteigerte Endothelzellproliferation möglicherweise die Plaqueentwicklung begünstigen (Varet *et al.*, 2003).

Bis jetzt fehlen Studien, die die Wirkungen von Peptiden aus Nahrungsproteinen auf die endotheliale Funktion untersuchen. Deshalb ist es Ziel dieser Arbeit, Peptide mit definierten Aminosäuresequenzen zu finden, die an humanen arteriellen Endothelzellen eine Wirkung auf die NO- und Eicosanoidsynthese und die adhäsiven Eigenschaften ausüben und damit der Prävention der Atherosklerose nützlich sein könnten.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

1. Gibt es aus Nahrungsproteinen abgeleitete Peptide, die die Eigenschaften von Endothelzellen der menschlichen Aorta verändern?

Dazu sollten zunächst durch eine Screeningmethode Peptide herausgefunden werden, die die Proliferation der Endothelzellen beeinflussen. Die Proliferation eignet sich als Screeningmethode, weil sie am Ende der Aktivierung von Rezeptoren verschiedener biochemischer Signaltransduktionskaskaden steht. Die Peptide, die in das Screening aufgenommen wurden, sind entsprechend ihres Vorkommens in der Caseinfraktion des Kuhmilchproteins und den Glycinin G1- und β -Conglycinin-Untereinheiten des Sojaproteins ausgewählt worden. Nur Peptide, die eine proliferationsbeeinflussende Wirkung zeigten, sollten in Untersuchungen zur nächsten Fragestellung einbezogen werden.

2. Werden atherosklerosrelevante Parameter der Endothelzellen durch die Peptide beeinflusst?

Dazu sollten die Freisetzungen der vasoaktiven Substanzen NO, Prostazyklin und Thromboxan aus Endothelzellen untersucht werden. Zur Bestimmung möglicher Veränderungen der adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen unter Peptideinfluss sollten Messungen zur Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin und ein Monozytenadhäsionstest durchgeführt werden. Um Aussagen über mögliche Unterschiede zwischen nicht aktivierten oder aktivierten Endothelzellen treffen zu können, werden die Untersuchungen zu

Fragestellung 2 und 3 sowohl an unstimulierten als auch an TNF- α stimulierten Endothelzellen durchgeführt.

3. Welche Wirkmechanismen liegen der veränderten Endothelzellfunktion unter Peptideinfluss zugrunde?

Dabei sollte geklärt werden, ob auftretende Funktionsänderungen bei Endothelzellen auf transkriptionelle Effekte zurückzuführen sind. Dazu sollten die *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) -Expression der eNOS, der Cyclooxygenase-1 (COX-1) und COX-2, des VCAM-1, des ICAM-1 und des E-Selektins untersucht werden. Da Effekte auf transkriptioneller Ebene meist auf eine Veränderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B zurückzuführen sind, wird die DNA-Bindung der beiden Untereinheiten p50 und p65 dieses Faktors unter Peptideinfluss untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Agarose Serva Premium	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Alanin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
BCECF-AM (Bis-(carboxyethyl)-5(6)- carboxyfluoresceinacetoxymethylester), B1170	Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff- Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Basal Medium Supplement (BMS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid) Hybri Max [®]	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
DNA-Leiter (100 bp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
dNTPs	GeneCraft, Münster, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) MV mit Supplement Mix	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethanol 99,9%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 35%	Heidiger Chemikalien-Lehrmittel, Stuttgart, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Fötales Kälber Serum (FKS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Gelladepuffer Roti [®] -Load DNA, DNase- frei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Gibco [®] Gentamicin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2 Material und Methoden

Gibco [®] Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS), phenolrotfrei	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gibco [®] RPMI 1640-Medium mit 25 mM Heses Buffer, L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
HesesBSS	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
H-Ile-Pro-Pro-OH	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Hippuryl-His-Leu	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
H-His-Leu-OH	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin)	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Leucin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ , 25 mM für PCR	Promega GmbH, Mannheim Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid)	VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
N-(1-Naphthyl)-ethylen-diamin-dihydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
0-Phtaldialdehyd	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Prolin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland

2 Material und Methoden

RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U) in 5xReaktionspuffer	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Roti-Mix PCR 3 (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 10 mM)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Serin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
Serumersatz (SES)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Stop Reagenz	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Sulfanilamid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SYBR® Green I	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Taq DNA Polymerase (5U)	Promega GmbH, Mannheim Deutschland
Thermophile DNA Polymerase 10xPuffer	Promega GmbH, Mannheim Deutschland
TMB (Tetramethylbenzidin)	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
TNF- α , <i>human, recombinant</i>	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
TNS (Trypsin-Neutralisierungslösung)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris, >99,9%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
TRIzol® Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung, 0,4%	Sigma-Aldrich Chemicals, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin / EDTA 2	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
UltraPure Water	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
Ultrosor® G	Ciphergen Biosystems, Cergy-Saint-Christophe, Frankreich
Valin	Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
VEGF165, <i>human, recombinant</i>	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland

Di- und Tripeptide

Bachem GmbH, Weil am Rhein,
Deutschland

H-Val-Pro-OH·HCl	H-Ala-Leu-OH	H-Glu-Glu-Glu-OH
H-Ser-Glu-OH	H-Gln-Gln-OH	H-Ala-Pro-Phe-OH
H-Glu-Ser-OH·0.3H ₂ O	H-Val-Ala-OH	H-Ala-Pro-Leu-OH
H-Lys-Glu-OH	H-Glu-Glu-OH	H-Glu-Gln-Gln-OH
H-Pro-Ile-OH	H-Gln-Glu-OH	H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH
H-Pro-Leu-OH·0.2H ₂ O	H-Pro-Gln-OH	H-Gly-Lys-Gly-OH
H-Phe-Leu-OH	H-Leu-Leu-Leu-OH	H-Leu-Gly-Tyr-OH
H-Ser-Ser-OH	H-Val-Pro-Leu-OH	H-Pro-Leu-Gly-NH ₂
H-Leu-Ser-OH	H-Ser-Ser-Ser-OH	

Zellen

HAoEC

PromoCell GmbH, Heidelberg,
Deutschland

U937

Deutsche Sammlung für
Mikroorganismen und Zellkulturen,
Braunschweig, Deutschland

Testkits

cAMP Biotrak Enzymimmunoassay
(EIA) System (RPN225)

Amersham Biosciences Europe GmbH,
Freiburg, Deutschland

Cell proliferation ELISA Biotrak™
System, version 2 (RPN250)

Amersham Biosciences Europe GmbH,
Freiburg, Deutschland

cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak™
(EIA) System (dual range) (RPN226)

Amersham Biosciences Europe GmbH,
Freiburg, Deutschland

6-keto Prostaglandin F_{1α} ELISA
(515211)

Cayman Chemical Company, Ann
Arbor, USA

Thromboxane B₂ ELISA (519031)

Cayman Chemical Company, Ann
Arbor, USA

Nuclear Extract Kit (40010)

Active Motif, Rixensart, Belgien

TransAM™ NF-κB Family Kit (43296)

Active Motif, Rixensart, Belgien

Primer und Antikörper

fwd und rev Primer für COX-1, COX-2,
E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, GAPDH

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe,
Deutschland

fwd und rev Primer für eNOS

Metabion GmbH, Martinsried,
Deutschland

Oligo-dT-Primer

QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Anti-human E-Selektin

Bender MedSystems GmbH, Wien,
Österreich

Anti-ICAM-1 (Anti-CD54, human (mouse))	Calbiochem / Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-mouse IgG mit POD	Calbiochem / Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-VCAM-1 (Anti-CD106, human (mouse))	Calbiochem / Merck, Darmstadt, Deutschland

Zusammensetzung der Puffer

Agarose-Gel	0,6 g Agarose, 30 ml 0,5xTBE
Lysispuffer (50 mM Tris mit 0,1 % SDS)	0,6057 g Tris, 0,1 g SDS für 0,1 l, pH 7,6
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ für 1l, pH 7,4
Phosphatpuffer (0,2 M)	1,755 g NaCl, 2,722 g KH ₂ PO ₄ für 0,1l, pH 8,3
5xTris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 3,72 g EDTA für 1 l

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Cellstar® Gewebekulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ² steril, mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, 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
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Ow1 Separation Systems, Inc., Portsmouth (NH), USA
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
GeneGenius Gel Documentation	Analysis systems Syngene, Cambridge, Großbritannien
Inkubator (Heraeus Heracell)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
PS-Mikroplatten, 96 Well, Kaminform, schwarz, transp. Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PS-Mikroplatten, 96 Well, F-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Neubauerzählkammer	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop (Nikon Phot 2)	Nikon Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Quarz-Küvetten	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
RotorGene 2000 system	Corbett Research, Mortlake, Australien
SpectroFluor Plus Plattenreader	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Sterilwerkbank (Heraeus Heracell)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler (Mastecycler® personal)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
0,1 ml Tubes/4er Strips mit Deckel für Rotor Gene	-lft- Labortechnik GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Tubes 15 ml und 50 ml steril, mit Deckel	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
UVStar® Mikroplatten, 96 Well, F-Form, TC, µClear®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Waagen	Sartorius AG, Göttingen Deutschland
Wasserbad Julabo Shake Temp SW 22	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach / Schwarzwald, Deutschland

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung der humanen Endothelzellen der Aorta

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden humane Endothelzellen der Aorta (HAoEC) verwendet. Diese Endothelzellen wurden als 1. Passage von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) erworben. Sie sind aus der Aorta einer 28-jährigen Frau entnommen und durch den von Willebrand-Faktor sowie eine Populationsverdopplungszeit von 33,8 h charakterisiert. Typisch für diese Zellen ist adhärentes, pflastersteinartiges Wachstum.

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Deutschland) bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5 Vol.% CO₂ und 95% rel. Feuchte. Die Zellen wuchsen in endotheliale Zellwachstumsmedium MV (ECGM MV) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) bestehend aus Basalmedium,

5% fötalem Kälberserum (FKS) bzw. 4% Ultroser[®]G, 4 g/l endotheliale Zellwachstumssupplement/Heparin, 10 µg/l epidermalem Wachstumsfaktor, 1 mg/l Hydrocortison, 50 µg/l Amphotericin B und 50 mg/l Gentamicin.

Zur Subkultivierung wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit HEPES Buffered Salt Solution (HEPESBSS) gewaschen und mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) abgelöst. Die Proteaseaktivität des Trypsins wurde mit einer Trypsin-Neutralisationslösung (TNS) gestoppt und dann die Zellsuspension in einem Falcon-Tube bei 170 g/min zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in Zellwachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde ein Teil der Zellsuspension in 0,9%igem NaCl im Verhältnis 1:10 verdünnt und in 4 Großquadranten einer Neubauerzählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde unter Berücksichtigung des Kammervolumens, des Verdünnungsfaktors und des Volumens der Gesamtzellsuspension berechnet. In Abhängigkeit von den folgenden Versuchen wurden die Endothelzellen der 3.-8. Passage mit Zelldichten von 3000 - 12000 Zellen/cm² unter Hinzufügen der entsprechenden Menge Zellwachstumsmedium in 96er-Multititerplatten (MTP), 24- oder 6-well-Platten, 25 cm² oder 75 cm²-Kulturflaschen ausgesät. Das Zellwachstumsmedium wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt.

2.3.2 Serumfreie Kultivierung der HAOEC

Die HAOEC wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und nach 24 h Anhaftungsphase mit serumersatzhaltigem Medium inkubiert. Die Anpassung der Zellen an das serumfreie Medium erfolgte stufenweise nach folgendem Muster:

	Serumersatzhaltiges ¹ ECGM MV ohne FKS	ECGM MV mit 4 % FKS
Tag 0 (Zellaussaat)	0%	100%
Tag 2	50%	50%
Tag 4	75%	25%
Tag 6	90%	10%
Tag 8	100%	0%

¹ 4% Ultroser[®]G, 5% Basal Medium Supplement (BMS) oder 0,1% Serumersatz (SES)

Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde statt FKS der Serumersatz Ultrosor[®]G verwendet in dem vom Hersteller empfohlenen Anteil von 4% am Medium.

2.3.3 Stimulation der HAoEC mit TNF- α

Zur Stimulierung der HAoEC wurde TNF- α eingesetzt. In den Zellen sollte dadurch eine inflammatorische Situation hervorgerufen werden. In Vorversuchen erwies sich eine Konzentration an TNF- α von 0,2 ng/ml Medium als wirkungsvoll in Bezug auf NF- κ B-abhängige Zellregulationsmechanismen, ohne dabei zelltoxisch zu sein. Die HAoEC wurden zeitgleich für 24 h mit 0,2 ng TNF- α /ml Medium und der Testsubstanz inkubiert.

2.3.4 Kultivierung der U937-Monozyten

Die für einen Monozytenadhäsionstest verwendeten U937-Monozyten (humane Monozytenzelllinie) kamen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland). Die Kultivierung der U937-Monozyten erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5 Vol.% CO₂, 95% rel. Feuchte. Die Zellen wuchsen in Suspension in RPMI 1640 Medium (GIBCO) mit 111 ml FKS/l und 5,56 ml Gentamicin/l. Das Medium wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt. Die Zellzahlbestimmung wurde entsprechend der der HAoEC vorgenommen.

2.4 Screening nach bioaktiven Peptiden

2.4.1 Ermittlung häufiger Aminosäuresequenzen aus Milch- und Sojaprotein

Die Auswahl der Peptide für das Screening erfolgte basierend auf deren Häufigkeit in der Primärsequenz von Nahrungsproteinen. Es wurden die Primärsequenzen des α_{s1} -Caseins, des β -Caseins, des Glycinins G1 und β -Conglycinins mittels spezieller Software auf die Häufigkeit von Di- und Tripeptiden hin untersucht. Die Peptide, die am häufigsten auftraten, wurden in das Screening einbezogen.

2.4.2 Extinktionsmessungen zur Bestimmung der Dipeptidstabilität in Lösung

Die Peptidbindung zeigt bei 192 nm eine Lichtabsorption. Da bei 192 nm die Lichtabsorption des O₂ mit der Messung interferiert, kann die Peptidbindung bei 205 nm photometrisch erfasst werden (Pingoud, 1997). Ein Peptidabbau, welcher durch die vermutete Hydrolyseaktivität von FKS erwartet wurde, müsste sich in geringer werdenden Lichtabsorptionen bemerkbar machen.

Als Beispielsubstanz wurde das Dipeptid H-Ser-Glu-OH in 5 Konzentrationen zwischen 3 und 35 µg/ml destilliertem Wasser gelöst, in Quarzküvetten überführt und seine Lichtabsorption bei 205 nm bestimmt. Zu den Peptidlösungen in der Küvette wurden FKS bzw. Ultrosor[®]G so gegeben, dass diese in einer Endkonzentration von 0,05% bzw. 0,04% vorlagen (diese Konzentrationen entsprachen je 1/100stel der im Medium zur Zellkultivierung enthaltenen Konzentrationen). Die Lichtabsorption dieser Peptidlösung wurde nun alle 5 – 10 min gemessen.

2.4.3 Zellproliferationsassay

Die Endothelzellproliferation wurde mit dem „Cell Proliferation Biotrak ELISA System, version 2“ von Amersham Biosciences erfasst. Dieses Testsystem beruht auf der Messung des Einbaus von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin in die DNA proliferierender Zellen.

Die Endothelzellen wurden mit 2500 Zellen/well in 96er-MTP ausgesät und 48 h anhaften lassen. Die Zellen wurden dann entweder mit frischem Medium (Kontrolle) oder mit Di- und Tripeptid-supplementiertem Medium für 24 h inkubiert. Die Di- und Tripeptide wurden in Medium so gelöst, dass sich Endkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM, 10 mM und gegebenenfalls 2,5 mM, 5 mM und 7,5 mM ergaben. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 10 µM 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) inkubiert, welches als Pyrimidinanalogon anstelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut wurde. Nach der Inkubationszeit erfolgten die Fixierung der Endothelzellen, die Denaturierung der DNA und die Behandlung mit Peroxidase-konjugierten monoklonalen Mausantikörpern, die an das BrdU in der neu synthetisierten DNA binden. Aus der folgenden Substratreaktion von Tetramethylbenzidin mit dem Immunkomplex entstand ein Farbstoff, dessen Intensität bei 450 nm im Spektrophotometer

detektiert werden konnte und mit der Menge an DNA und damit der Zellzahl korrelierte.

2.4.4 MTT-Test zur Viabilitätsbestimmung

Die Viabilität der HAoEC nach Behandlung mit einer Testsubstanz wurde mit dem MTT-Test nach Mosmann (1983) und Vistica et al. (1991) untersucht. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) kann in Zellen eindringen und von Oxidoreduktasen der Mitochondrien und des Zytosols lebender Zellen in alkohollösliches, dunkelblaues Formazan umgesetzt werden. Dieses kann photometrisch erfasst werden.

Die zu 80% konfluenten HAoEC in 24-well-Platten wurden mit Zellwachstumsmedium mit oder ohne Testsubstanz 24 h bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte inkubiert. Der Zellüberstand wurde abgenommen und die Zellen mit 160 µl frischem Medium und mit 40 µl steriler MTT-Lösung (5 mg/ml Phosphate Buffered Saline (PBS)) versetzt. Nach 40 min Inkubation bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte wurde der Zellüberstand abgenommen und die blau gefärbten HAoEC in 150 µl Isopropanol aufgenommen. Die Formazankristalle wurden durch 10minütiges Schütteln der Platte gelöst. Die optische Dichte dieses Gemisches wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm im Tecan-Plattenreader bestimmt.

2.4.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des Bio-Rad Protein-Assay. Das Absorptionsmaximum des gelösten Coomassie Brilliant Blau G-250 Farbstoffes verschiebt sich von 465 nm auf 595 nm, wenn Proteine, insbesondere basische und aromatische Aminosäurereste an den Farbstoff binden. Die Extinktion bei 595 nm verhält sich proportional zur Proteinkonzentration.

Die HAoEC wurden 24 h in 0,1 N NaOH lysiert. Die Probe wurde mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt und 160 µl der verdünnten Probe mit 40 µl Bio-Rad Farbstoffreagenz versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Standardkurve (2 - 30 µg/ml) mit bovinem Serumalbumin berechnet, die parallel mitgeführt worden ist.

2.5 Untersuchungen zum Einfluss bioaktiver Peptide auf die Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen in bzw. aus HAOEC

2.5.1 Bestimmung der Freisetzung des Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid ist sehr instabil und durchläuft in biologischen Flüssigkeiten Reaktionen, die schnell zur Bildung von Nitrat und Nitrit führen. Für die Analyse von Nitrat und Nitrit in flüssigen Medien stellt die angewendete Griess-Reaktion eine etablierte Methode dar (Green et al., 1982). Während einer zweistufigen Reaktion wird zunächst Nitrat zu Nitrit reduziert, welches dann mit dem Griessreagenz 1 (1% Sulfanilamid in 5%iger Phosphorsäure) und dem Griessreagenz 2 (0,1% N-(1-Naphtyl)ethylendiamin in 5%iger Phosphorsäure) einen roten Azofarbstoff bildet. Dieser kann bei 540 nm photometrisch detektiert werden.

Die zu 80% konfluenten HAOEC in 6-well-Platten wurden mit phenolrotfreiem Zellwachstumsmedium mit oder ohne Testsubstanz 24 h bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte inkubiert. Der Zellüberstand wurde abgenommen und bis zur Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert.

Zur Nitratkonzentrationsbestimmung wurden 100 µl des Zellüberstandes in eine 96er-MTP überführt und mit 100 µl Griessreagenz (Griess 1 : Griess 2 = 1:1) vermischt. Die Absorption wurde nach 10 min Farbentwicklung im Tecan-Plattenreader gemessen.

Eine Nitratstandardkurve in einem Konzentrationsbereich von 0 - 20 µM wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in phenolrotfreiem Zellwachstumsmedium aufgenommen. Die Eigenabsorption des Mediums wurde von allen Messwerten abgezogen.

2.5.2 Bestimmung der Freisetzung der Eicosanoide Thromboxan A₂ (TXA₂) und Prostazyklin (PGI₂)

Das Thromboxan B₂ (TXB₂) entsteht aus der Hydrolyse des TXA₂ und gilt als dessen stabiler Marker. Es wurde mit dem Thromboxan B₂-EIA-Kit von CAYMAN Chemicals bestimmt.

Der Enzymimmunoassay (EIA) basiert auf dem kompetitiven Prinzip. Das TXB₂ der Probe konkurriert mit einem zugesetzten TXB₂-Acetylcholinesterase-Konjugat (Tracer) um eine begrenzte Anzahl Bindungsstellen des TXB₂-spezifischen

Kaninchen-Antiserums, welches wiederum an einen in der 96er-MTP immobilisierten monoklonalen Antikörper bindet (Maus). Da die Konzentration des Tracers immer konstant bleibt, die Menge des TXB_2 aus den Proben jedoch variiert, ist die Menge des Tracers, die mit dem Antiserum bindet, umgekehrt proportional zur TXB_2 -Konzentration der Probe. Alle nicht bindenden Substanzen werden ausgewaschen und dann ein für die Acetylcholinesterase spezifisches Substrat, das Ellmanns Reagenz zugegeben. Dieses besteht aus Acetylthiocholin und 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure). In Gegenwart der Acetylcholinesterase des Tracers wird das Acetylthiocholin zu Acetat und Thiocholin gespalten, welches mit 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) zu dem gelben Produkt 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure reagiert, dessen Extinktion bei 405 nm photometrisch gemessen wird. Die Extinktion ist umgekehrt proportional zur TXB_2 -Menge der Probe. Diese wird aus einer mitgeführten Standardreihe ermittelt.

Die zu 80% konfluenten HAoEC in 24-well-Platten wurden mit Zellkulturmedium mit oder ohne Testsubstanz 24 h bei 37°C, 5% CO_2 , 95% rel. Feuchte inkubiert. Der Zellüberstand wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit *Hanks'Balanced Salts* (HBSS) gewaschen und dann für 1 h bei 37°C, 5% CO_2 , 95% rel. Feuchte mit HBSS nachinkubiert.

Der HBSS-Zellüberstand wurde abgenommen und bis zur Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert.

Die Durchführung des EIA erfolgte nach den vorgegebenen Arbeitsschritten des Handbuchs

6-keto Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$) entsteht aus der Hydrierung des Prostazyklins (PGI_2) und gilt als dessen stabiler Marker. Es wurde mit dem 6-keto Prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ -EIA-Kit von CAYMAN Chemicals bestimmt.

Prinzip und Methode der 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Bestimmung entsprechen denen der TXA_2 -Bestimmung.

2.5.3 Bestimmung der Konzentrationen des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) in HAoEC

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurde das cAMP Biotrak Enzymimmunoassay System von Amersham Biosciences verwendet.

Der EIA basiert auf dem kompetitiven Prinzip. Das durch Lyse der Zellmembran freigesetzte intrazelluläre cAMP konkurriert mit Peroxidase-konjugiertem-cAMP um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen eines cAMP-spezifischen Kaninchen-Antiserums, welches wiederum an einen in der 96er-MTP immobilisierten Antikörper (Esel) bindet. Da die Menge an Peroxidase-konjugiertem cAMP konstant bleibt, die Konzentration von cAMP der Probe jedoch variiert, ist die Menge an Peroxidase-konjugiertem-cAMP, die an das Antiserum bindet umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration der Probe. Alle nicht gebundenen Substanzen werden ausgewaschen und das für die Peroxidase spezifische Substrat Tetramethylbenzidin zugegeben. Aus dieser Reaktion entsteht ein blauer Farbstoff, dessen Intensität bei 450 nm detektiert werden kann und die sich umgekehrt proportional zur cAMP-Konzentration verhält. Diese kann aus einer mitgeführten Standardreihe ermittelt werden.

HAoEC wurden in 24-well-Platten bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert. Der Zellüberstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 100 μ M 3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin (IBMX) in HBSS für 5 min bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte vorinkubiert. Das IBMX sollte als Phosphodiesterasehemmer die Degradation des gebildeten cAMP während der Inkubation mit den Testsubstanzen verhindern. Nach Zugabe der Testsubstanzen und Forskolin (10 μ M) als Positivkontrolle erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte. Nach Entfernung des Zellüberstandes wurde die Platte in flüssigen Stickstoff getaucht, um die Reaktion abzustoppen. Bis zum Gebrauch wurde die Platte bei -80°C gelagert. Die Zellyse und die Durchführung des Assays erfolgten nach den vorgegebenen Arbeitsschritten des Handbuchs

2.5.4 Aktivitätsbestimmung des ACE

Die ACE-Aktivität wurde in Anlehnung an die Methode von Friedland und Silverstein (1976) mittels fluorimetrischem Assay ermittelt.

Aus der Hydrolyse des Substratanalogons Hippuryl-His-Leu (HHL) durch ACE entsteht His-Leu. Dieses wird mit o-Phtaldialdehyd markiert und die Fluoreszenz dieses His-Leu-Produktes im Fluoreszenzspektralphotometer gemessen.

Die zu 80% konfluenten HAoEC in 24-well-Platten wurden mit Zellwachstumsmedium mit oder ohne Testsubstanz 24 h bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte inkubiert. Der Zellüberstand wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 4 mM HHL-Assaypuffer für 90 min bei 5% CO₂, 95% rel. Feuchte inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,28 N NaOH abgestoppt und Probenaliquote mit o-Phtaldialdehyd versetzt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 465 nm nach einer Anregung mit 360 nm. Die Konzentrationsberechnung erfolgte anhand einer His-Leu-Standardkurve, die parallel mitgeführt worden ist.

2.6 Untersuchungen zum Einfluss bioaktiver Peptide auf die adhäsiven Eigenschaften von HAoEC

2.6.1 Bestimmung der Oberflächenexpression von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1

Die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 wurde mit einem nach Rothlein et al. (1988) und Lemaire et al. (1998) modifiziertem Zelloberflächen-*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Das als Antigen fungierende Adhäsionsmolekül reagiert in einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem entsprechenden monoklonalen Antikörper. Nach Auswaschung aller nichtgebundenen Antikörper werden die gebundenen Antikörper mit einem sekundären Peroxidase-konjugiertem monoklonalen anti-Maus-IgG markiert. Aus der folgenden Substratreaktion von Tetramethylbenzidin mit dem Immunkomplex entsteht ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe eines Stoppreagens nach gelb umschlägt und dessen Intensität bei 450 nm im Spektrophotometer detektiert werden kann.

Die zu 80% konfluenten HAoEC in 96er-MTP wurden mit Zellwachstumsmedium mit oder ohne Testsubstanz für 24 h bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte inkubiert. Die behandelten Zellen wurden mit 4% Formaldehyd in PBS für 5 min fixiert und danach für 60 min bei 37°C mit 2% BSA in PBS inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Die Zellen wurden dann für jeweils eine Stunde mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper (anti-ICAM-1 1:500, anti-VCAM-1 1:300, anti-E-Selektin 1:250) und dem sekundären Peroxidase-markierten monoklonalen anti-Maus-IgG bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit Tetramethylbenzidin zur Farbreaktion versetzt.

2.6.2 Bestimmung der Adhäsion von Monozyten an HAoEC

Die Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen wurde mit einer Methode nach Vaporciyan et al. (1993) ermittelt. Dabei adhären mit 2,7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF-AM) markierte Monozyten der Zelllinie U937 an die exprimierten Oberflächenmoleküle der HAoEC. BCECF-AM wird in lebenden Monozyten durch Esterasen in das fluoreszierende BCECF gespalten, dessen Emission bei 535 nm gemessen werden kann.

Die Monozyten wurden mit 5 µmol/l BCECF-AM in RPMI-1640-Medium bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte für 30 min markiert, gewaschen und in Zellwachstumsmedium aufgenommen.

Die zu 80% konfluenten HAoEC in 24-well-Platten wurden mit Zellkulturmedium mit oder ohne Testsubstanz 24 h bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte inkubiert und danach mit den BCECF-markierten Monozyten behandelt. Nach 30minütiger Inkubationszeit bei 37°C wurden die nicht gebundenen Monozyten entfernt, die Endothelzellen gewaschen und in Lysispuffer (50 mM Tris mit 0,1% Natrium Dodecyl Sulfate (SDS), pH 7,6) lysiert. Für die Fluoreszenzmessung im Tecan-Plattenreader wurde das Zelllysate in eine spezielle 96er-MTP überführt.

2.7 Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration der Enzyme eNOS, COX-1, COX-2, E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1

2.7.1 RNA-Isolierung, Quantifizierung, Qualitätsbestimmung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus HAoEC erfolgte mit TRIzol[®]Reagenz nach dem für Kulturzellen vorgegebenem Standardprotokoll.

Die HAoEC wurden mit TRIzol[®]Reagenz lysiert, mit 0,2 ml Chloroform/ml TRIzol[®]Reagenz versetzt und zentrifugiert (4°C, 12000 g, 15 min). Aus der wässrigen Phase konnte mit 0,5 ml Isopropanol/ml TRIzol[®]Reagenz die RNA präzipitiert werden. Nach Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und unter leichtem Schütteln (Thermomixer, 60°C, 10 min) in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

Die RNA-Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm ermittelt. Über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm wurde die Reinheit der isolierten RNA überprüft.

Die Unversehrtheit der RNA wurde mit Gelelektrophorese kontrolliert.

2.7.2 Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mit der PCR können von bestimmten Nukleotidsequenzen millionenfach Kopien hergestellt werden. Ausgehend von einem zuvor an die Matrizen-DNA angelegerten Primer (Startermolekül) wird durch eine DNA-Polymerase an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize ein neuer DNA-Strang gebildet. Bei der Verwendung eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA zwischen den beiden Primern kopiert werden. Entscheidend ist die zyklische Wiederholung der Primeranlagerung (Annealing) und der DNA-Strangbildung (Elongation) bis zur gewünschten Vervielfachung der Nukleotidsequenz.

Spezifisch RNA-Sequenzen lassen sich mit der RT-PCR vervielfachen. Dabei wird zunächst die aus den Zellen isolierte mRNA als Matrize für eine cDNA Erststrangsynthese verwendet, welche dann als Matrize für die PCR dient (Schrimpf, 2002).

2.7.3 cDNA-Erststrangsynthese

Für die cDNA Erststrangsynthese, bei der möglichst die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben werden sollte, wurden Oligo (dT) Primer und das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Die Synthese wurde entsprechend der Anleitung zur Transkriptase durchgeführt.

Dementsprechend setzte sich der Reaktionsansatz pro Probe (25 µl) wie folgt zusammen:

RNA in 10 µl DEPC-Wasser	1,2 µg
Oligo dT Primer (100 µM)	1 µl
5 x Puffer (250 mM Tris-HCl ; 250 mM KCl ; 20 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT)	5 µl
dNTP (10 mM pro dNTP)	1,25 µl
reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,3 µl
DEPC-Wasser	7,45 µl

Der Ansatz wurde gemischt und die cDNA im Thermocycler (42°C, 1 h) synthetisiert. Im Anschluss wurde die reverse Trankriptase durch Erhöhung der Temperatur auf 70°C für 10 min inaktiviert. Die cDNA lagerte bei -20°C.

2.7.4 Real-time RT-PCR

Die relativen mRNA-Konzentrationen für die Enzyme eNOS, COX-1, E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1 und des Referenzgenes Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) der HAoEC wurden mit der Real-time RT-PCR im ermittelt.

Die Real-time RT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, zusätzlich kann jedoch die Quantität der amplifizierten Matrizen gemessen werden. Dazu werden spezifische DNA-Farbstoffe (SYBR[®]Green 1) verwendet, die an die neu gebildete DNA koppeln und deren Fluoreszenz in jedem Zyklus erfasst wird. Die zur Real-time RT-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Der entsprechend der Anleitung zur Taq Polymerase (Promega) angefertigte Reaktionsansatz enthielt pro Probe (20 µl):

2 Material und Methoden

Primermix, fwd und rew	2,67 µl (10 pmol/µl)
10xPuffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1% Tritonx-100)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,8 µl
dNTP (10 mM pro dNTP)	1 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
SYBR [®] Green I (1:1000)	0,5 µl
DEPC-Wasser	0,78 µl
cDNA (1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt)	10 µl

Die PCR erfolgte im RotorGene 2000 mit folgendem Temperaturverlauf:

Initial-Denaturierung	95°C	120 s	} Zyklen
Denaturierung	95°C	20 s	
Annealing	Tabelle 1	35 s	
Elongation	72°C	55 s	

Tabelle 1: Verwendete Primer für die real-time RT-PCR im RotorGene 2000

Enzyme	PCR Primer	Annealing- temperatur	bp
GAPDH (human)	(fwd) 5'- GACCACAGTCCATGCCATCAC - 3' (rev) 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3'	60°C	453
eNOS (human)	(fwd) 5'- CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT - 3' (rev) 5'- GTCTCGGAGCCATACAGGATT - 3'	55°C	354
COX-1 (human)	(fwd) 5'- CAGCTCCTGGCCCGCCGCTT - 3' (rev) 5'- GTGCATCAACACAGGCGCCTC - 3'	65°C	299
E-Selektin (human)	(fwd) 5'- GTCTGGCCTGCTACCTACCTGT - 3' (rew) 5'- CCTTGCCTGCTGGACTTTGA - 3'	56°C	391
VCAM-1 (human)	(fwd) 5'- GAGCGGGAAGGTGAGGAGTGA - 3' (rew) 5'- CTGGGGGCAACATTGACATAAAGT - 3'	57°C	471
ICAM-1 (human)	(fwd) 5'- AGCCACGCCTCCCTGAACCTATCC - 3' (rew) 5'- CTCCCCCACCCTCCCTCTCAT - 3'	61°C	319

Zur Identifizierung der DNA-Fragmente aus der real-time-PCR wurden diese mit Gelladepuffer gemischt und zeitgleich mit einem Leitemix auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese konnte das DNA-Fragment anhand der Basenpaare (bp) erkannt werden (Tabelle 1)

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:

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

$$\text{Ratio} = [E_{GAPDH} + E_{Zielgen} / 2]^{\Delta Ct} \quad E \text{ Effizienz des bestimmten Gens der real-time RT-PCR (optimal = 2)}$$

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

2.7.5 Semiquantitative RT-PCR

Die relativen mRNA-Konzentrationen für die COX-2 und das Referenzgen GAPDH der HAOEC wurde mit semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Die für die semiquantitative RT-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Der Reaktionsansatz setzte sich pro Probe (20 μ l) wie folgt zusammen:

Primermix, fwd und rew	4 μ l (10 pmol/l)
10 x MgCl ₂ -Puffer	2 μ l (1 x Puffer mit 1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs (100 mM)	0,4 μ l
Taq Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
cDNA	2 μ l
DEPC-Wasser	11,4 μ l

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	

Tabelle 2: Verwendete Primer für die semiquantitative RT-PCR im Mastercycler[®] personal von Eppendorf

Enzyme	PCR Primer	Annealing- temperatur	bp
GAPDH (human)	(fwd) 5'- GACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'	60°C	453
	(rev) 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3'		
COX-2 (human)	(fwd) 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT - 3'	59°C	296
	(rev) 5'- AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTTT - 3'		

Zur anschließenden Gelelektrophorese wurden 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl Gelladepuffer gemischt und über ein 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt. Die mit Ethidiumbromid im TBE-Puffer gefärbten Banden wurden mit einer UV-Photoeinrichtung (SYNGENE) sichtbar gemacht und vermessen. Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentration wurde die Fläche der COX-2-Bande ins Verhältnis zur Fläche der GAPDH-Bande gesetzt. Die Werte der behandelten HAoEC wurden zu den Werten der unbehandelten Kontrollzellen ins Verhältnis gesetzt.

2.8 Bestimmung der DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB

2.8.1 Nuklearextraktion

Die Präparation des Nuclearextraktes wurde entsprechend der Anleitung des verwendeten Nuclear Extract Kit von Active Motif durchgeführt.

Die zu 80% konfluenten HAoEC in 24-well-Platten wurden mit Zellkulturmedium mit oder ohne Testsubstanz 24 h bei 37°C, 5% CO₂, 95% rel. Feuchte inkubiert. Der Zellüberstand wurde abgesaugt und die Zellen in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren (um weitere Proteinmodifikationen zu verhindern) gesammelt und zentrifugiert. Durch Aufnahme in einen hypotonischen Puffer schollen die Zellmembranen an und wurden durchlässig. Unter Zusatz des Detergenten Nonidet p-40 sickerten die zytoplasmatischen Proteine in den Überstand. Diese zytoplasmatische Fraktion wurde gesammelt, die Zellkerne lysiert und die Kernproteine in einem Lysispuffer in Gegenwart von Proteaseinhibitoren gelöst.

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode von Bradford mit Hilfe des Bio-Rad Protein-Assays bestimmt.

Bis zum Gebrauch lagerte der Nuclearextrakt bei -80°C.

2.8.2 DNA-Bindungsaktivität der NF- κ B Untereinheiten p50 und p65

Die Aktivitäten der Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B wurden mit dem TransAM™ NF- κ B Family Assay Kit von Active Motif quantifiziert. Das Prinzip des ELISA's beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktionen zwischen den aktiven NF- κ B-Untereinheiten und auf einer 96er-MTP immobilisierten Oligonukleotiden, die NF- κ B-Konsensus-Bindungsstellen aufweisen. Der gebundene Transkriptionsfaktor reagiert dann mit spezifisch gegen p50 und p60 gerichteten Antikörpern, welche nachfolgend über einen zweiten mit einer horseradish-Peroxidase konjugierten Antikörper detektiert werden. Das Ausmaß der Peroxidase-wirkung kann über eine Entwicklerlösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm im Spektrophotometer erfasst werden und verhält sich proportional zur NF- κ B-Aktivität.

Vom Nuklearextrakt wurden 2,5 μ g (über die Proteinbestimmung für den Nuklearextrakt ermittelt) für den Assay eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten 5 μ g Raji-Nuklearextrakt. Die Durchführung des Assays erfolgte nach den vorgegebenen Arbeitsschritten des Handbuches.

2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) dargestellt. Die statistische Auswertung sollte zeigen, ob zwischen den Mittelwerten der Behandlungsgruppen und den Mittelwerten der Kontrollgruppen signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bestanden. Zu diesem Mittelwertvergleich wurde mit Microsoft® Excel der T-Test (nach Student; zweiseitig, Typ 3 - für Stichproben mit ungleichen Varianzen) durchgeführt und Ergebnisse mit $p < 0,05$ mit einem * als signifikant markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Ermittlung geeigneter Kultivierungsbedingungen für HAoEC

3.1.1 Stabilität des Dipeptids H-Ser-Glu-OH in Lösung

Fötale Kälberserum enthält neben Wachstumshormonen auch hydrolytisch wirksame Substanzen (Proteasen, Peptidasen), die Proteine und Peptide zu Aminosäuren spalten können. Abbildung 1 zeigt die konzentrationsabhängige Absorption des Dipeptides H-Ser-Glu-OH in Wasser gelöst. Durch Zusatz von 0,05% FKS zur Peptidlösung nimmt die Absorption im Zeitverlauf von 30 min um 50% ab. Die hydrolytische Aktivität des FKS führt zum Abbau des Dipeptids.

Durch Zusatz von 0,04% des Serumersatzes Ultrosor[®]G, welches Aprotinin, ein Serin-Protease-Inhibitor enthält, verändert sich die konzentrationsabhängige Absorption des Dipeptides H-Ser-Glu-OH innerhalb von 30 min nicht (Abbildung 2).

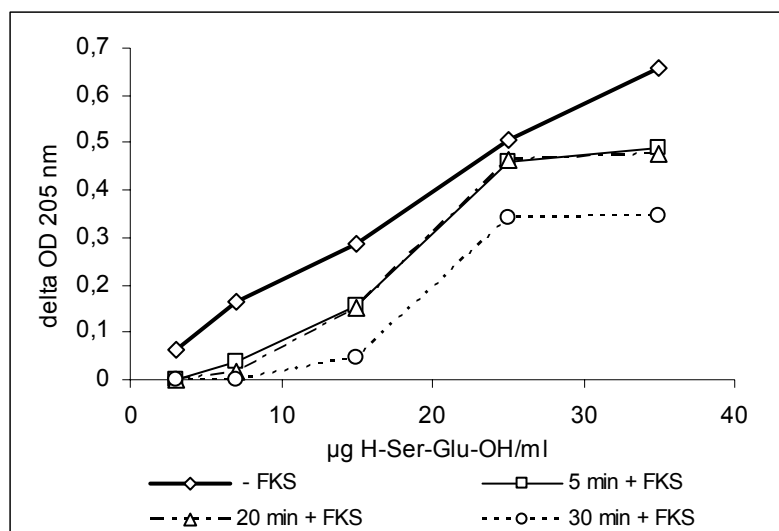


Abbildung 1: Konzentrationsabhängige Absorption des in bidestilliertem Wasser gelösten Dipeptids H-Ser-Glu-OH unter Einfluss von FKS

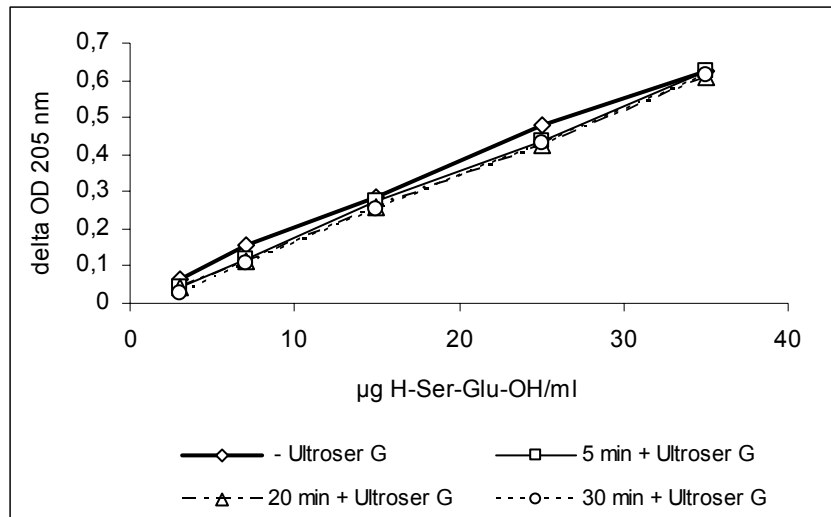


Abbildung 2: Konzentrationsabhängige Absorption des in bidestilliertem Wasser gelösten Dipeptids H-Ser-Glu-OH unter Einfluss von Ultrosor®G

3.1.2 Einfluss von Serumalternativen auf die Morphologie von HAoEC

Endothelzellen in FKS-haltigem Medium zeigten sich unter dem Mikroskop als langgestreckte auf der Wachstumsfläche anhaftende Zellen (Abbildung 3). In Konfluenz bilden sie das charakteristische „cobblestone“ Muster. Endothelzellen, die stufenweise an serumfreies Medium mit dem Serumersatz Ultrosor®G adaptiert wurden, unterschieden sich in ihrer Morphologie nicht von den Endothelzellen in FKS-haltigem Medium (Abbildung 4). Die Kultivierung der Endothelzellen in serumfreiem BMS- bzw. SES-haltigem Medium bewirkte eine Veränderung der Zellmorphologie. Die Zellen im BMS-haltigen Medium (Abbildung 5) waren deutlich runder, wirkten „aufgepumpt“. In SES-haltigem Medium (Abbildung 6) kam es zur Verklumpung und Ablösung der Zellen vom Untergrund. Die Serumalternativen BMS und SES waren für die Kultivierung von HAoEC ungeeignet.

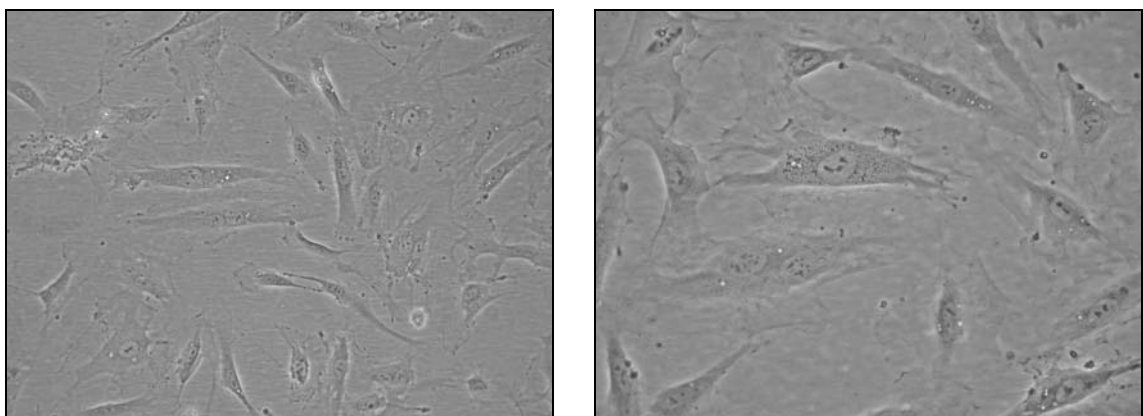


Abbildung 3: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 5% FKS (10x20 und 10x40 vergrößert)

3 Ergebnisse

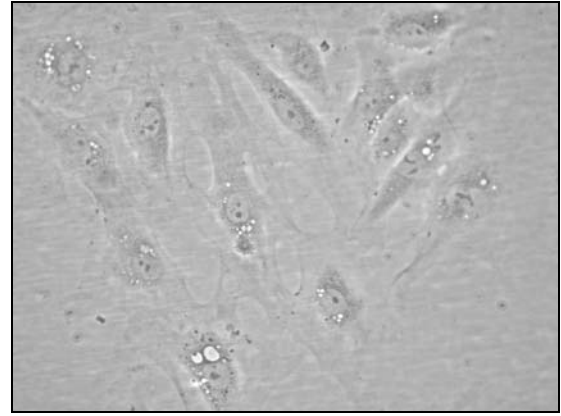
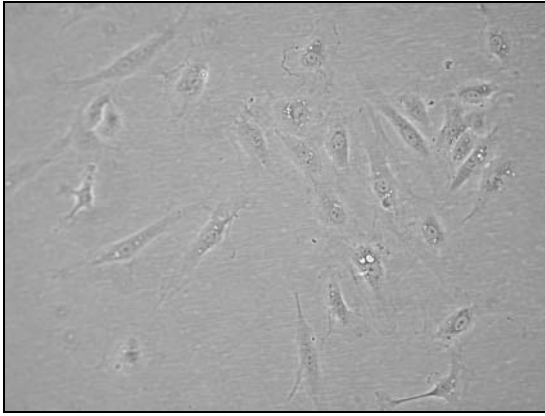


Abbildung 4: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 4% Ultrosor[®]G (10x20 und 10x40 vergrößert)

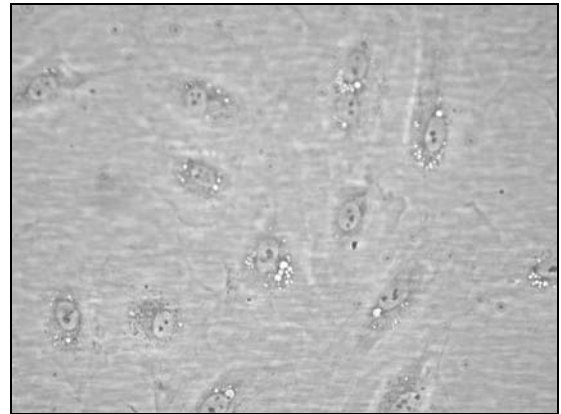
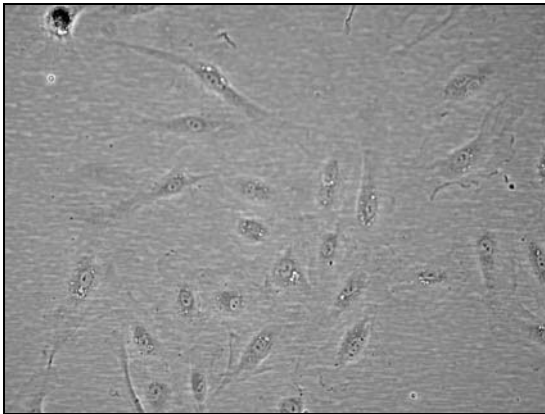


Abbildung 5: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 5% BMS (10x20 und 10x40 vergrößert)

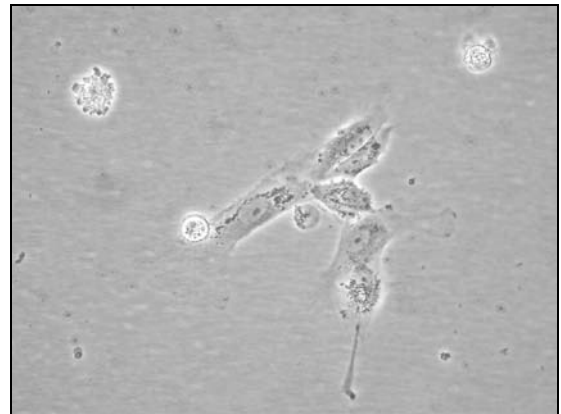
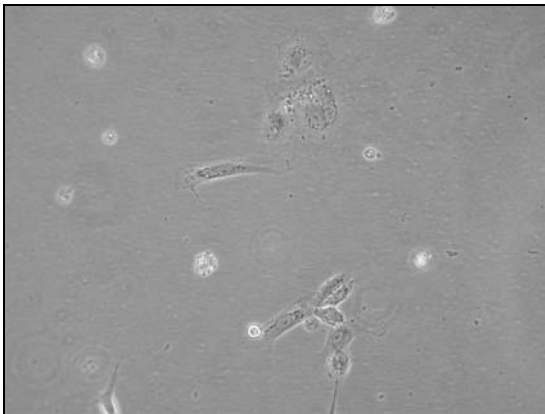


Abbildung 6: HAoEC in ECGM-MV-Medium mit 0,1% SES (10x20 und 10x40 vergrößert)

3.2 Screening nach bioaktiven Peptiden

3.2.1 Ermittlung häufiger Aminosäuresequenzen aus Milch- und Sojaprotein

Das häufigste Dipeptid war H-Glu-Glu-OH, deren Aminosäuresequenz trat in den untersuchten Sojaproteinen 17-mal, im Casein 8-mal auf. Die Aminosäuresequenzen der in Tabelle 3 weiter aufgeführten Peptide waren in den jeweiligen Proteinen 5- bis 10-mal vertreten. Die Aminosäuresequenzen der aufgeführten Tripeptide traten mehr als einmal in den Primärsequenzen der Proteine auf.

Tabelle 3: Vorkommen von Di- und Tripeptiden in der Primärsequenz von Caseinen und den Sojaproteinen Glycinin G1 und β -Conglycinin

Peptide	Casein	Glycinin G1	β -Conglycinin
H-Val-Pro-OH·HCl	x	-	-
H-Ser-Glu-OH	x	-	-
H-Glu-Ser-OH·0.3H ₂ O	x	-	-
H-Lys-Glu-OH	x	-	-
H-Pro-Ile-OH	x	-	-
H-Pro-Leu-OH·0.2H ₂ O	x	-	-
H-Phe-Leu-OH	-	-	x
H-Ser-Ser-OH	-	-	x
H-Leu-Ser-OH	-	x	x
H-Ala-Leu-OH	-	x	-
H-Gln-Gln-OH	-	x	x
H-Val-Ala-OH	-	x	-
H-Glu-Glu-OH	x	x	x
H-Gln-Glu-OH	-	x	-
H-Pro-Gln-OH	-	x	-
H-Leu-Leu-Leu-OH	x	-	x
H-Val-Pro-Leu-OH	x	-	-
H-Ser-Ser-Ser-OH	x	-	-
H-Glu-Glu-Glu-OH	x	x	x
H-Ala-Pro-Phe-OH	x	-	-
H-Ala-Pro-Leu-OH	-	-	-
H-Glu-Gln-Gln-OH	x	-	-
H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH	-	x	-
H-Gly-Lys-Gly-OH	-	x	-
H-Leu-Gly-Tyr-OH	x	-	-
H-Pro-Leu-Gly-NH ₂	x	-	-

3.2.2 Endothelzellproliferation unter Peptid- bzw. Aminosäureeinfluss

Die Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml vaskulärem endothelialestem Wachstumsfaktor (rHuVEGF165) stimulierte die Zellproliferation, die Behandlung mit 0,1 ng/ml TNF- α inhibierte die Zellproliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (VEGF $110 \pm 5\%$, TNF- α $79 \pm 6\%$, Kontrolle $100 \pm 8\%$; $n=3$; $p<0.05$). Die untersuchten Dipeptide H-Val-Pro-OH·HCl, H-Glu-Ser-OH·0.3H₂O, H-Lys-Glu-OH, H-Pro-Leu-OH·0.2H₂O, H-Phe-Leu-OH, H-Ser-Ser-OH, H-Leu-Ser-OH, H-Ala-Leu-OH, H-Gln-Gln-OH, H-Val-Ala-OH, H-Glu-Glu-OH, H-Gln-Glu-OH, H-Pro-Gln-OH, H-Arg-Tyr-OH und L-Carnosin zeigten im Konzentrationsbereich 1 nM - 1 mM keine Wirkung auf die Proliferation der Zellen (Tabelle 4). Dagegen stimulieren die Dipeptide H-Ser-Glu-OH und H-Pro-Ile-OH die Zellproliferation im Konzentrationsbereich 10 nM - 10 μ M bzw. 1 μ M - 100 μ M. Konzentrationen >5 mM bewirkten bei den Dipeptiden H-Val-Pro-OH·HCl, H-Glu-Ser-OH·0.3H₂O, H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH eine Hemmung der Proliferation um nahezu 100%. Von den untersuchten Tripeptiden steigerten H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH signifikant die Proliferation der Zellen. H-Glu-Glu-Glu-OH, H-Glu-Gln-Gln-OH, H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH, H-Gly-Lys-Gly-OH und H-Pro-Leu-Gly-NH₂ verursachen in hohen Konzentrationen (10 mM) eine Hemmung der Proliferation um 12 - 99%. Die Tripeptide H-Ala-Pro-Phe-OH, H-Ala-Pro-Leu-OH und H-Leu-Gly-Tyr-OH hatten keinen Effekt auf die Zellproliferation.

Die Aminosäuren Serin und Valin wirkten im Konzentrationsbereich 1 μ M - 1 mM leicht stimulierend auf die Zellproliferation (Tabelle 5). Dagegen zeigten Alanin, Glutamin, Glutaminsäure, Leucin, Phenylalanin und Prolin in einer Konzentration von 10 mM inhibierende Effekte auf die Endothelzellproliferation.

3.2.3 Einfluss bioaktiver Peptide auf die Zellviabilität

Die Behandlung der Endothelzellen mit den in Tabelle 6 aufgeführten Peptiden in Konzentrationen zwischen 1 nM und 1 mM hatte keinen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Endothelzellen. Die Lebensfähigkeit der Endothelzellen nahm durch die Behandlung der Zellen mit 10 mM H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH und H-Glu-Glu-Glu-OH im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant ab. Glutaminsäure beeinflusste im untersuchten Konzentrationsbereich die Lebensfähigkeit der Zellen nicht.

3 Ergebnisse

Tabelle 4: Relative Proliferation von HAOEC nach 24h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	Peptidkonzentration										
	1 nM	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM	1 mM	2,5mM	5mM	7,5mM	10 mM
<i>relative Zellproliferation (% der Kontrolle = 100 ± 10)</i>											
<i>Dipeptide</i>											
H-Val-Pro-OH·HCl	97,6 ±1,2	99,6 ± 8,1	105,2 ± 9,2	104,8 ± 10,7	103,4 ± 6,3	101,6 ± 8,2	97,6 ± 6,5	95,5 ± 5,9	94,2 * ± 2,3	28,1 * ± 5,1	0,4 * ± 0,5
H-Ser-Glu-OH	97,0 ± 4,7	106,3 * ± 4,1	106,9 * ± 4,9	106,3 * ± 6,6	105,0 * ± 4,4	104,9 ± 7,2	102,3 ± 8,0	101,2 ± 3,2	100,0 ± 4,9	67,9 * ± 1,3	0,5 * ± 0,1
H-Glu-Ser-OH·0.3H ₂ O	94,1 ± 2,7	96,6 ± 7,7	97,5 ± 8,4	99,3 ± 4,8	100,7 ± 7,1	97,7 ± 4,2	98,2 ± 3,5	98,5 ± 8,5	96,1 ± 5,7	55,7 * ± 9,9	0,5 * ± 0,3
H-Lys-Glu-OH	96,3 ± 5,2	100,8 ± 4,9	103,4 ± 6,1	102,2 ± 7,0	106,3 ± 5,5	101,3 ± 7,2	96,3 ± 10,5	---	---	---	91,7 * ± 4,6
H-Pro-Ile-OH	84,9 * ± 4,0	101,6 ± 6,8	102,4 ± 4,0	109,1 * ± 4,5	104,2 * ± 0,6	104,1 * ± 1,4	95,9 ± 4,5	---	91,2 * ± 6,3	---	---
H-Pro-Leu-OH·0.2H ₂ O	96,1 ± 6,4	99,5 ± 9,9	101,7 ± 7,7	103,9 ± 6,6	105,3 ± 7,7	102,9 ± 9,8	100,3 ± 9,1	---	---	---	97,3 ± 6,6
L-Carnosin	96,1 ± 5,0	99,2 ± 5,0	100,1 ± 4,0	103,0 ± 6,6	102,5 ± 4,9	98,4 ± 5,1	96,0 ± 7,5	---	---	---	93,0 * ± 3,5
H-Phe-Leu-OH	96,5 ± 6,9	97,2 ± 4,5	98,4 ± 5,1	102,5 ± 4,4	104,7 * ± 4,6	101,6 ± 5,8	97,1 ± 6,8	---	---	---	95,9 ± 9,5
H-Ser-Ser-OH	95,1 ± 5,6	96,7 ± 3,0	97,6 ± 6,8	98,2 ± 6,9	99,8 ± 7,0	98,5 ± 7,3	95,9 ± 5,6	---	---	---	84,8* ± 12,2
H-Leu-Ser-OH	98,3 ± 4,6	98,4 ± 4,8	99,1 ± 3,2	102,8 ± 5,9	100,6 ± 4,8	98,1 ± 6,5	95,5 ± 6,2	---	---	---	90,7* ± 6,1
H-Ala-Leu-OH	96,9 ± 6,9	99,1 ± 8,8	98,1 ± 9,1	104,4 ± 6,4	106,4 ± 11,6	108,0 ± 11,2	100,2 ± 8,5	---	---	---	95,3 ± 6,3

3 Ergebnisse

Peptid	Peptidkonzentration										
	1 nM	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM	1 mM	2,5mM	5mM	7,5mM	10 mM
	<i>relative Zellproliferation (% der Kontrolle = 100 ± 10)</i>										
H-Gln-Gln-OH	96,5 ± 4,1	96,5 ± 3,9	98,0 ± 3,3	97,4 ± 7,6	98,1 ± 4,0	98,1 ± 6,3	95,9 ± 8,4	---	---	---	89,1* ± 12,2
H-Val-Ala-OH	97,1 ± 3,9	97,4 ± 11,4	97,9 ± 5,2	105,3 ± 7,1	101,0 ± 12,1	98,5 ± 6,7	95,5 ± 8,3	---	---	---	95,4 ± 6,3
H-Glu-Glu-OH	98,4 ± 4,1	99,3 ± 6,5	101,5 ± 2,3	108,9 ± 8,5	103,5 ± 6,9	102,0 ± 5,6	98,2 ± 8,2	98,7 ± 8,8	75,6* ± 3,5	16,0* ± 3,5	0,7* ± 1,2
H-Gln-Glu-OH	94,5 ± 7,1	92,8 ± 7,7	91,4* ± 3,0	99,2 ± 2,3	97,8 ± 5,7	98,1 ± 4,2	95,6 ± 4,8	95,0 ± 3,4	87,4* ± 3,8	77,0* ± 4,1	34,2* ± 17,5
H-Pro-Gln-OH	95,3 ± 7,6	98,1 ± 2,4	99,9 ± 5,0	101,7 ± 3,5	103,5 ± 3,8	100,9 ± 3,5	98,5 ± 4,8	---	---	---	92,9* ± 5,7
H-Arg-Tyr-OH	97,8 ± 4,7	96,8 ± 3,8	101,5 ± 6,7	98,1 ± 3,9	101,2 ± 2,7	98,0 ± 8,6	100,8 ± 3,8	---	---	---	77,5* ± 5,2
<i>Tripeptide</i>											
H-Leu-Leu-Leu-OH	101,4 ± 15,3	102,7 ± 17,5	100,3 ± 13,6	104,7 ± 21,6	99,6 ± 21,1	116,3 ± 31,9	124,7* ± 33,4	---	---	---	95,8 ± 29,6
H-Val-Pro-Leu-OH	95,3 ± 21,9	97,1 ± 22,0	98,8 ± 22,9	114,9* ± 18,4	115,4* ± 20,2	119,5* ± 23,6	117,8* ± 27,4	---	---	---	95,4 ± 20,5
H-Ser-Ser-Ser-OH	92,6 ± 19,6	106,5 ± 17,4	110,0 ± 24,8	111,6 ± 28,4	113,0* ± 11,2	115,5* ± 10,4	117,5* ± 13,7	---	---	---	138,7* ± 31,3
H-Glu-Glu-Glu-OH	119,0* ± 15,6	119,4* ± 18,5	122,8* ± 14,8	118,9* ± 8,5	116,9* ± 15,2	113,3* ± 12,0	105,6 ± 27,44	---	---	---	1,4* 0,9
H-Ala-Pro-Phe-OH	94,3 ± 8,7	96,1 ± 16,1	107,8 ± 12,8	100,9 ± 28,0	95,1 ± 8,3	103,4 ± 22,6	102,9 ± 14,0	---	---	---	97,3 ± 4,9
H-Ala-Pro-Leu-OH	105,0 ± 15,6	105,4 ± 14,8	102,1 ± 17,3	104,5 ± 29,7	100,4 ± 18,6	103,3 ± 17,1	104,1 ± 14,9	---	---	---	100,9 ± 13,9

3 Ergebnisse

Peptid	Peptidkonzentration										
	1 nM	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM	100 µM	1 mM	2,5mM	5mM	7,5mM	10 mM
	<i>relative Zellproliferation (% der Kontrolle = 100 ± 10)</i>										
H-Glu-Gln-Gln-OH	87,5* ± 5,5	88,8 ± 15,8	90,2 ± 19,9	90,8 ± 16,0	88,0* ± 7,3	96,4 ± 13,1	97,1 ± 17,5	---	---	---	1,4* ± 0,8
H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH	100,8 ± 23,6	100,3 ± 2,8	116,8 ± 13,7	125,8* ± 15,6	108,9 ± 7,5	107,2 ± 27,1	101,5 ± 13,9	---	---	---	6,9* ± 11,2
H-Gly-Lys-Gly-OH	100,3 ± 22,4	96,5 ± 9,0	103,2 ± 16,8	92,5 ± 19,4	91,5 ± 15,7	101,4 ± 17,5	107,1 ± 11,7	---	---	---	88,4* ± 4,2
H-Leu-Gly-Tyr-OH	100,2 ± 8,9	98,8 ± 17,2	115,7 ± 26,6	124,7 ± 27,3	111,8 ± 17,8	91,7 ± 14,9	88,6 ± 16,4	---	---	---	89,3 ± 19,7
H-Pro-Leu-Gly-NH ₂	90,6 ± 20,1	101,8 ± 9,9	101,7 ± 15,6	102,8 ± 21,0	111,9 ± 19,5	103,7 ± 18,5	99,1 ± 16,3	---	---	---	60,5* ± 17,9

^a Ergebnisse als Mittelwert ± SD für n=3-6

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

--- nicht bestimmt

3 Ergebnisse

Tabelle 5: Relative Proliferation von HAOEC nach 24h Inkubation mit Aminosäuren verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Aminosäure	Aminosäurekonzentration				
	1 µM	10 µM	100 µM	1 mM	10 mM
	<i>relative Zellproliferation (% der Kontrolle = 100 ± 6,7)</i>				
Alanin	101,5 ± 12,2	100,5 ± 8,4	96,4 ± 4,7	94,2 ± 6,6	81,0* ± 9,8
Glutamin	101,5 ± 8,3	106,8* ± 4,4	98,2 ± 4,2	97,0 ± 6,6	89,5* ± 8,2
Glutaminsäure	102,8 ± 12,7	106,2 ± 11,2	102,1 ± 8,5	101,0 ± 9,7	30,8* ± 24,7
Leucin	102,0 ± 9,0	101,2 ± 14,1	103,8 ± 5,9	100,4 ± 7,1	89,3* ± 6,0
Phenylalanin	111,4 ± 10,3	110,6 ± 9,6	101,7 ± 7,1	99,9 ± 10,5	49,5* ± 5,6
Prolin	96,8 ± 7,7	97,9 ± 3,5	100,4 ± 4,5	94,5 ± 7,9	80,7* ± 5,2
Serin	107,1* ± 4,0	109,7* ± 8,5	108,6 ± 7,9	104,9 ± 5,0	98,4 ± 8,6
Valin	105,3* ± 2,5	105,3* ± 0,6	107,3* ± 4,6	105,8* ± 4,6	99,3 ± 4,1

^a Ergebnisse als Mittelwert ± SD für n=3-6

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

Tabelle 6: Relative Lebensfähigkeit von HAOEC nach 24h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	Peptidkonzentration					
	1 nM	100 nM	10 µM	100 µM	1 mM	10 mM
	<i>relative Lebensfähigkeit (% der Kontrolle = 100 ± 7,1)</i>					
H-Val-Pro-OH-HCl	99,2 ± 12,4	104,9 ± 5,9	108,0 ± 10,2	107,6 ± 0,6	84,9 ± 10,5	82,9 ± 15,1
H-Ser-Glu-OH	94,1 ± 10,6	101,8 ± 6,5	101,1 ± 5,8	105,9 ± 1,3	105,8 ± 1,8	81,7* ± 1,8
H-Glu-Glu-OH	99,1 ± 3,0	103,6 ± 6,4	106,8 ± 2,9	105,3 ± 15,0	105,3 ± 6,2	44,6* ± 4,1
H-Val-Pro-Leu-OH	104,7 ± 2,6	102,3 ± 8,1	108,9 ± 6,6	113,4* ± 2,4	109,4 ± 10,2	103,6 ± 6,6
H-Leu-Leu-Leu-OH	108,4 ± 1,6	109,1* ± 1,8	114,6 ± 12,8	115,1 ± 8,5	116,4 ± 7,5	113,5* ± 3,8
H-Ser-Ser-Ser-OH	102,5 ± 9,6	98,1 ± 15,0	98,6 ± 7,9	107,4* ± 1,0	110,0 ± 5,4	117,0 ± 10,1
H-Glu-Glu-Glu-OH	90,6 ± 3,2	93,5 ± 10,1	96,0 ± 3,4	95,7 ± 1,14	107,1 ± 8,6	41,4* ± 2,3
H-Glu-OH	96,2 ± 17,8	103,7 ± 18,7	103,8 ± 2,3	105,6 ± 4,9	104,0 ± 10,4	94,4 ± 5,5

^a Ergebnisse als Mittelwert ± SD für n=3

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

3.3 Einfluss bioaktiver Peptide auf die Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen in bzw. aus HAoEC

3.3.1 Stickstoffmonoxid

Als Index für die NO-Konzentration wurde die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Zellüberstand nach 24 h Inkubation mittels Griess-Reaktion gemessen. Um die Ergebnisse der verschiedenen Testansätze miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten NO-Konzentrationen prozentual zur Kontrolle und bezogen auf das Zellprotein angegeben.

Die Freisetzung von NO aus den Endothelzellen in den Zellüberstand wurde zunächst an unstimulierten Endothelzellen untersucht. Um festzustellen, ob atherosklerotisch veränderte Endothelzellen auf Peptidgaben anders reagieren als gesunde, wurden die folgenden Untersuchungen auch an Endothelzellen untersucht, die mit 0,2 ng TNF- α /ml stimuliert wurden.

Die Freisetzung von NO aus den Endothelzellen konnte durch die Inkubation mit Peptiden signifikant beeinflusst werden (Tabelle 7). Die Inkubation mit dem Tripeptid H-Val-Pro-Leu-OH (100 nM - 1 mM) und mit der Aminosäure Glutaminsäure (50 μ M - 1 mM) führte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen sowohl an TNF- α -stimulierten als auch an unstimulierten Zellen zu einer höheren NO-Freisetzung in den Zellüberstand. An TNF- α -stimulierten Endothelzellen führte auch die Inkubation mit H-Ser-Glu-OH (100 nM -1 mM), H-Leu-Leu-Leu-OH (50 μ M), H-Ser-Ser-Ser-OH (100 nM, 100 μ M) und H-Glu-Glu-Glu-OH (100 μ M – 1 mM) zu einer höheren NO-Freisetzung verglichen mit unbehandelten TNF- α -stimulierten Kontrollzellen. An unstimulierten Endothelzellen hatten H-Val-Pro-OH-HCl, H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH im untersuchten Konzentrationsbereich keinen Effekt auf die Freisetzung von NO.

3.3.2 Thromboxan A₂

Die Konzentration von TXB₂ (als Messzahl für TXA₂) im Zellüberstand nach 1 h Nachinkubation in HBSS wurde mit dem Thromboxan B₂ EIA Kit von CAYMAN Chemicals bestimmt. Die ermittelten TXB₂-Konzentrationen sind prozentual zur Kontrolle und bezogen auf das Zellprotein angegeben.

Von den untersuchten Peptiden hatte keines einen Einfluss auf die TXB₂-Freisetzung von stimulierten (TNF- α 0,2 ng/ml) Endothelzellen während 1h Nachinkubation in HBSS (Tabelle 8). Die Behandlung von unstimulierten Zellen mit 50 μ M H-Leu-Leu-Leu-OH und 50 μ M bzw. 1 mM Glutaminsäure führte zu höheren TXB₂-Konzentrationen im Zellüberstand. Die TXB₂-Konzentration des Zellüberstandes von mit H-Val-Pro-OH·HCl, H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH (50 μ M, 1 mM), H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH (100 nM, 50 μ M) behandelten unstimulierten Zellen unterschied sich nicht von der Kontrolle. Die TXB₂-Konzentration im Zellüberstand von TNF- α stimulierte Kontrollzellen lag um $51,4 \pm 9,1\%$ ($p < 0.05$) niedriger als im Zellüberstand von unstimulierten Kontrollzellen.

3.3.3 Prostazyklin

Die Konzentration von 6-keto PGF_{1 α} (als Messzahl für PGI₂) im Zellüberstand nach 1h Nachinkubation in HBSS wurde mit dem 6-keto PGF_{1 α} -EIA Kit von CAYMAN Chemicals bestimmt. Die ermittelten 6-keto PGF_{1 α} -Konzentrationen sind prozentual zur Kontrolle und bezogen auf das Zellprotein angegeben.

Die Behandlung von unstimulierten Endothelzellen mit H-Ser-Glu-OH (50 μ M), H-Glu-Glu-OH (1 mM), H-Val-Pro-Leu-OH (50 μ M), H-Ser-Ser-Ser-OH (100 nM), H-Glu-Glu-Glu-OH (100 nM, 50 μ M) und H-Glu-OH (50 μ M) führte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zu höheren Konzentrationen an 6-keto PGF_{1 α} im Zellüberstand (Tabelle 9). In den Zellüberständen von mit H-Ser-Glu-OH (50 μ M, 1 mM), H-Val-Pro-Leu-OH (50 μ M), H-Glu-Glu-Glu-OH (100 nM, 50 μ M) inkubierten stimulierten (0,2 ng TNF- α /ml) Endothelzellen wurden höhere 6-keto PGF_{1 α} -Konzentrationen bestimmt als in den Überständen der Kontrollen. H-Val-Pro-OH·HCl und H-Leu-Leu-Leu-OH hatten unter den gegebenen Bedingungen keinen Effekt auf die 6-keto PGF_{1 α} -Freisetzung aus Endothelzellen. Die 6-keto PGF_{1 α} -Konzentration im Zellüberstand von TNF- α stimulierte Kontrollzellen lag um $52,5 \pm 7,3\%$ ($p < 0.05$) niedriger als im Zellüberstand von unstimulierten Kontrollzellen.

3 Ergebnisse

Tabelle 7: Relative NO-Konzentration pro Mikrogramm Zellprotein im Zellüberstand von HAoEC nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	TNF- α	Kontrolle	Peptidkonzentration			
			100 nM	50 μ M	100 μ M	1 mM
<i>relative NO_x-Konzentration (% der Kontrolle)</i>						
H-Val-Pro-OH-HCl	-	100,0 ± 32,2	---	76,9 ± 38,3	---	120,0 ± 45,1
	-	100,0 ± 21,9	---	116,4 ± 47,9	---	103,2 ± 10,8
H-Ser-Glu-OH	+	100,0 ± 34,1	167,3* ± 9,9	170,7* ± 26,2	184,1* ± 29,0	107,4 ± 19,1
	-	100,0 ± 43,5	---	85,1 ± 39,3	---	78,7 ± 39,9
H-Val-Pro-Leu-OH	-	100,0 ± 51,1	194,6* ± 38,1	198,4* ± 48,8	---	---
	+	100,0 ± 34,1	185,0* ± 31,5	232,2* ± 68,4	228,1* ± 77,7	210,9* ± 68,3
H-Leu-Leu-Leu-OH	-	100,0 ± 10,9	107,6 ± 8,3	96,1 ± 9,8	---	---
	+	100,0 ± 31,2	137,4 ± 40,7	147,8* ± 45,5	125,8 ± 41,7	107,9 ± 42,2
H-Ser-Ser-Ser-OH	-	100,0 ± 20,0	108,1 ± 24,5	105,3 ± 7,2	---	---
	+	100,0 ± 33,9	141,1* ± 30,9	163,1 ± 55,1	139,3* ± 21,5	132,2 ± 54,5
H-Glu-Glu-Glu-OH	-	100,0 ± 36,8	93,6 ± 27,8	109,6 ± 36,6	---	---
	+	100,0 ± 56,2	134,1 ± 44,6	146,6 ± 39,8	165,1* ± 44,9	152,0* ± 40,6
H-Glu-OH	-	100,0 ± 19,5	---	192,4* ± 29,7	---	165,3* ± 35,2
	+	100,0 ± 31,8	126,2 ± 40,8	137,1 ± 33,5	150,6* ± 41,6	161,0* ± 42,9

^a Ergebnisse als Mittelwert \pm SD für n=3

^b 0,2 ng/ml TNF- α ; + mit TNF- α ; - ohne TNF- α

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

--- nicht bestimmt

3 Ergebnisse

Tabelle 8: Relative TXB₂-Konzentration pro Mikrogramm Zellprotein im Zellüberstand nach 1 h Inkubation in HBSS von HAoEC nach 24 h Vorinkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	TNF- α	Peptidkonzentration			
		Kontrolle	100 nM	50 μ M	1 mM
<i>relative TXB₂-Konzentration (% der Kontrolle)</i>					
H-Val-Pro-OH·HCl	-	100,0 ± 11,8	---	102,4 ± 13,5	79,4 ± 25,7
H-Ser-Glu-OH	-	100,0 ± 11,8	---	109,3 ± 12,3	116,5 ± 21,6
	+	100,0 ± 18,7	---	123,6 ± 28,9	119,1 ± 10,9
H-Glu-Glu-OH	-	100,0 ± 11,8	---	108,0 ± 22,9	120,5 ± 30,6
H-Val-Pro-Leu-OH	-	100,0 ± 11,8	100,6 ± 29,8	107,8 ± 49,1	---
	+	100,0 ± 18,7	102,7 ± 17,2	123,5 ± 12,4	---
H-Leu-Leu-Leu-OH	-	100,0 ± 11,8	96,9 ± 33,1	160,0* ± 42,0	---
	+	100,0 ± 18,7	95,9 ± 23,4	90,5 ± 34,7	---
H-Ser-Ser-Ser-OH	-	100,0 ± 14,3	100,3 ± 10,2	106,2 ± 13,5	---
	+	100,0 ± 18,7	101,5 ± 43,8	112,2 ± 26,3	---
H-Glu-Glu-Glu-OH	-	100,0 ± 14,3	121,2 ± 37,0	104,5 ± 43,4	---
	+	100,0 ± 18,7	106,3 ± 17,7	104,7 ± 47,1	---
H-Glu-OH	-	100,0 ± 11,8	---	126,6* ± 15,6	123,9* ± 18,1
	+	100,0 ± 18,7	---	108,5 ± 16,2	113,4 ± 43,1

^a Ergebnisse als Mittelwert \pm SD für n=3

^b 0,2 ng/ml TNF- α ; + mit TNF- α ; - ohne TNF- α

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

--- nicht bestimmt

3 Ergebnisse

Tabelle 9: Relative 6-keto PGF_{1 α} -Konzentration pro Mikrogramm Zellprotein im Zellüberstand nach 1 h Inkubation in HBSS von HAoEC nach 24 h Vorinkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	TNF- α	Peptidkonzentration			
		Kontrolle	100 nM	50 μ M	1 mM
<i>relative 6-keto PGF_{1α} Konzentration (% der Kontrolle)</i>					
H-Val-Pro-OH-HCl	-	100,0 \pm 2,1	---	98,5 \pm 11,9	120,6 \pm 18,2
H-Ser-Glu-OH	-	100,0 \pm 2,1	---	192,6* \pm 42,8	163,1 \pm 34,6
	+	100,0 \pm 15,1	---	155,8 \pm 28,3	182,9 \pm 41,8
H-Glu-Glu-OH	-	100,0 \pm 2,1	---	116,9 \pm 45,2	156,0* \pm 27,8
H-Val-Pro-Leu-OH	-	100,0 \pm 1,2	156,7 \pm 36,0	159,7* \pm 16,1	---
	+	100,0 \pm 15,1	163,7 \pm 40,9	167,1* \pm 28,6	---
H-Leu-Leu-Leu-OH	-	100,0 \pm 2,1	154,3 76,1	130,3 \pm 52,7	---
	+	100,0 \pm 15,1	117,0 \pm 27,6	96,5 \pm 15,0	---
H-Ser-Ser-Ser-OH	-	100,0 \pm 2,1	173,2* \pm 17,6	160,7 \pm 66,8	---
	+	100,0 \pm 15,1	128,3 \pm 24,6	155,1 \pm 33,0	---
H-Glu-Glu-Glu-OH	-	100,0 \pm 2,1	173,2* \pm 17,2	137,7* \pm 11,4	---
	+	100,0 \pm 15,1	171,5* \pm 41,8	145,7* \pm 19,9	---
H-Glu-OH	-	100,0 \pm 21,0	---	163,8* \pm 17,4	146,0 \pm 39,8
	+	100,0 \pm 2,1	---	169,4 \pm 27,2	182,3 \pm 49,9

^a Ergebnisse als Mittelwert \pm SD für n=3

^b 0,2 ng/ml TNF- α ; + mit TNF- α ; - ohne TNF- α

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

--- nicht bestimmt

3.3.4 mRNA-Konzentrationen von eNOS, COX-1 und COX-2

Die relative mRNA-Konzentration der eNOS sank durch die Behandlung der Zellen mit 50 μ M H-Ser-Ser-Ser-OH und Glutaminsäure tendenziell ($p < 0.13$) (Tabelle 10). H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH und H-Glu-Glu-Glu-OH hatten in der untersuchten Konzentration auf eNOS-mRNA-Konzentration keinen Einfluss. Die Inkubation/Stimulation der Zellen mit 0,2 ng TNF- α /ml führte zu einer $32,1 \pm 6,9\%$ ($p < 0.05$) geringeren relativen mRNA-Konzentration der eNOS. In stimulierten Zellen sank die relative mRNA-Konzentration der eNOS durch die Behandlung mit 50 μ M H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH und Glutaminsäure. H-Glu-Glu-Glu-OH beeinflusste die relative mRNA-Konzentration des Enzymes nicht.

Eine mRNA der induzierbaren NOS konnte in den untersuchten Zellen nicht nachgewiesen werden.

Unstimulierte Zellen, die mit 50 μ M Glutaminsäure inkubiert wurden, wiesen signifikant höhere relative mRNA-Konzentrationen der COX-1 auf, als Kontrollzellen (Tabelle 11). Für das Dipeptid H-Ser-Glu-OH traf dies tendenziell ($p < 0.13$) zu. Die untersuchten Tripeptide konnten in der Konzentration 50 μ M keine Veränderung der relativen COX-1-mRNA-Konzentration bewirken.

Unstimulierte Zellen, die mit 50 μ M H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH oder Glutaminsäure inkubiert wurden, enthielten signifikant höhere relative mRNA-Konzentrationen der COX-2 als Kontrollzellen. Für das Dipeptid H-Ser-Glu-OH traf dies tendenziell ($p < 0.13$) zu. Das Tripeptid H-Leu-Leu-Leu-OH konnte in der untersuchten Konzentration keine Veränderung der relativen COX-2-mRNA-Konzentration bewirken (Tabelle 11).

3 Ergebnisse

Tabelle 10: Relative mRNA-Konzentration von eNOS in unstimulierten und stimulierten HAoEC nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	eNOS	
	<i>relative mRNA-Konzentration (% der Kontrolle)</i>	
	-	+
Kontrolle	100,0 ± 26,9	100,0 ± 24,6
H-Ser-Glu-OH	133,3 ± 80,5	40,8 ± 22,6
H-Val-Pro-Leu-OH	97,9 ± 25,9	23,3* ± 8,4
H-Leu-Leu-Leu-OH	128,1 ± 25,9	27,4* ± 18,7
H-Ser-Ser-Ser-OH	31,2 ± 38,2	17,7* ± 11,6
H-Glu-Glu-Glu-OH	150,7 ± 59,7	82,6 ± 14,9
H-Glu-OH	53,1 ± 31,1	41,7* ± 21,6

^a Ergebnisse als Mittelwert ± SD für n=3

^b 0,2 ng/ml TNF- α ; + mit TNF- α ; - ohne TNF- α

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

Tabelle 11: Relative mRNA-Konzentration von COX-1 und COX-2 in unstimulierten HAoEC nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	COX-1	COX-2
	<i>relative mRNA-Konzentration (% der Kontrolle)</i>	
Kontrolle	100,0 ± 17,1	100,0 ± 22,8
H-Ser-Glu-OH	167,0 ± 40,9	135,1 ± 15,9
H-Val-Pro-Leu-OH	101,5 ± 20,1	253,4* ± 37,5
H-Leu-Leu-Leu-OH	110,0 ± 17,0	95,2 ± 21,3
H-Ser-Ser-Ser-OH	89,9 ± 22,3	147,2* ± 16,3
H-Glu-Glu-Glu-OH	141,9 ± 18,9	208,1* ± 47,2
H-Glu-OH	196,2* ± 52,5	192,0* ± 51,2

^a Ergebnisse als Mittelwert ± SD für n=3

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

3.3.5 Aktivität des ACE

Die mittels fluorimetrischem Assay nachgewiesene ACE-Aktivität wurde prozentual zur Kontrolle und bezogen auf Zeit und Zellprotein angegeben.

Eine Inkubation der Endothelzellen mit dem ACE-inhibitorischen Peptid H-Ile-Pro-Pro-OH führte in einem untersuchten Konzentrationsbereich von 100 nM bis 100 µM zu relativ geringeren ACE-Aktivitäten gegenüber unbehandelten Kontrollen (100 nM $91 \pm 5,3\%$; 1 µM $50,0 \pm 2,9\%^*$; 10 µM $47 \pm 1,0\%^*$; 100 µM $48 \pm 0,2\%^*$; Kontrolle $100 \pm 10,2\%$; n=3; *p>0.05).

Zellen, die mit dem 1 µM H-Val-Pro-Leu-OH inkubiert wurden, wiesen gegenüber unbehandelten Kontrollen eine signifikant geringere Aktivität des ACE auf (Tabelle 12). Die anderen Peptide bzw. Glutaminsäure hatten im untersuchten Konzentrationsbereich keinen Effekt auf die ACE-Aktivität der Endothelzellen.

Tabelle 12: Relative Aktivität des ACE [$\mu\text{mol H-His-Leu-OH min}^{-1} \mu\text{g Zellprotein}^{-1}$] in HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	Peptidkonzentration			
	1 µM	50 µM	100 µM	200 µM
	<i>relative ACE-Aktivität (% der Kontrolle = 100 ± 9,4)</i>			
H-Ser-Glu-OH	108,1 ± 34,1	103,8 ± 17,0	102,6 ± 12,4	107,3 ± 1,2
H-Val-Pro-Leu-OH	86,5* ± 13,7	96,1 ± 9,2	105,0 ± 13,5	98,4 ± 12,6
H-Leu-Leu-Leu-OH	100,6 ± 8,5	100,8 ± 11,8	109,2 ± 10,9	100,9 ± 9,2
H-Ser-Ser-Ser-OH	96,5 ± 9,6	99,6 ± 6,8	105,2 ± 7,4	100,6 ± 10,6
H-Glu-Glu-Glu-OH	102,9 ± 4,7	103,6 ± 8,5	103,1 ± 2,9	107,9 ± 5,4
H-Glu-OH	99,7 ± 22,0	99,1 ± 16,4	97,3 ± 21,6	97,3 ± 9,0

^a Ergebnisse als Mittelwert ± SD für n=3

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

3.3.6 Second Messenger

Die Konzentrationen der *second messenger* cAMP und cGMP wurden mit dem cAMP bzw. cGMP Biotrak Enzymimmunoassay System von Amersham Biosciences ermittelt. Sie sind prozentual zur Kontrolle angegeben.

Die Behandlung der Zellen mit 10 µM Forskolin (Positivkontrolle) führte zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Forskolin $408,6 \pm 94,7\%$, Kontrolle $100,0 \pm 9,6\%$; n=5; p<0.05). Abbildung 7 zeigt, dass durch die Inkubation der Endothelzellen mit H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH oder Glutaminsäure die intrazelluläre Konzentration des *second messenger* cAMP abnahm.

3 Ergebnisse

Auf die Konzentration von intrazellulärem cGMP haben unter den gegebenen Bedingungen weder die untersuchten Peptide (50 μM) noch Glutaminsäure (50 μM) einen Einfluss.

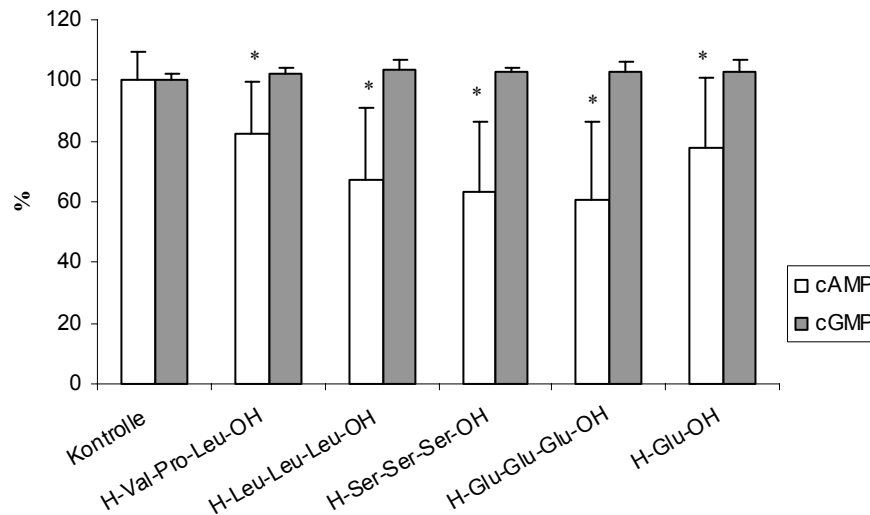


Abbildung 7: Relative intrazelluläre Konzentration von cAMP und cGMP [fmol/well] in HAoEC nach 30 min Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 μM) verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm SD; n=5; *p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

3.4 Einfluss bioaktiver Peptide auf die adhäsiven Eigenschaften von HAoEC

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

Die mittels ELISA erfasste Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle wurde prozentual zur Kontrolle angegeben.

In Abbildung 8 ist die Wirkung von Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure auf die Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin auf unstimulierten und mit 0,2 ng TNF- α /ml stimulierten Zellen dargestellt. Es zeigte sich, dass eine Inkubation von unstimulierten Zellen mit den Peptiden oder mit Glutaminsäure (jeweils 50 μM) keine Veränderung der Oberflächenexpression des E-Selektins bewirkte.

Eine Behandlung der Endothelzellen mit TNF- α verursachte eine Steigerung der E-Selektinexpression um $42,6 \pm 17,4\%$ (p<0.05). Die Inkubation von stimulierten

3 Ergebnisse

Zellen mit jeweils 50 μM H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH oder Glutaminsäure führte zu einer signifikant reduzierten E-Selektinexpression gegenüber der Kontrolle.

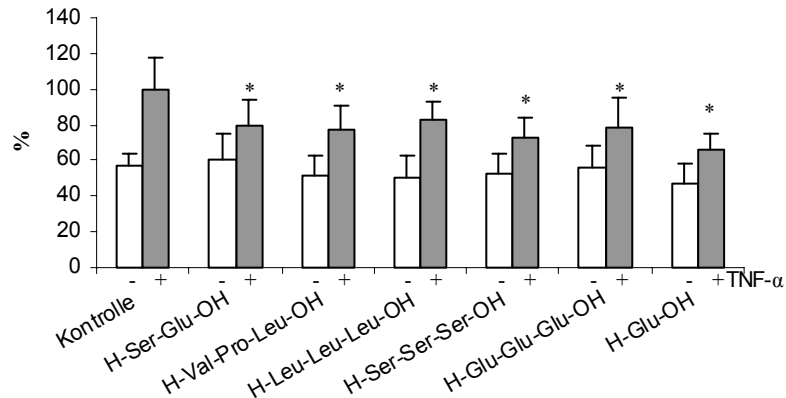


Abbildung 8: Relative Oberflächenexpression von E-Selektin auf HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 μM) verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Balken (weiß=unstimulierte HAoEC; grau=mit 0,2 ng/ml TNF- α stimulierte HAoEC) zeigen die Mittelwerte \pm SD; n=5; *p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle.

Die VCAM-1-Oberflächenexpression wurde in unstimulierten Zellen weder durch die untersuchten Peptide noch durch Glutaminsäure beeinflusst (Abbildung 9). Eine Behandlung der Endothelzellen mit TNF- α verursacht eine Steigerung der VCAM-1-Oberflächenexpression um $74,2 \pm 8,1\%$ ($p < 0.05$). Die Inkubation mit den aufgeführten Substanzen resultierte im Fall von H-Ser-Glu-OH (50 μM) und Glutaminsäure (50 μM) in einer um 29,6% bzw. 20,2% geringeren VCAM-1-Expression. H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH und H-Glu-Glu-Glu-OH waren diesbezüglich ohne Wirkung.

Die ICAM-1-Oberflächenexpression wurde in unstimulierten Zellen weder durch die untersuchten Peptide noch durch Glutaminsäure beeinflusst (Abbildung 10). Auch die ICAM-1-Oberflächenexpression wurde durch eine Stimulierung der Zellen mit TNF- α gesteigert (um $65,5 \pm 5,2\%$; $p < 0.05$). Durch die Behandlung der stimulierten Zellen mit 50 μM H-Ser-Ser-Ser-OH bzw. mit 50 μM Glutaminsäure wurde die ICAM-1-Expression um 9% reduziert, dagegen waren die anderen untersuchten Peptide diesbezüglich wirkungslos.

3 Ergebnisse

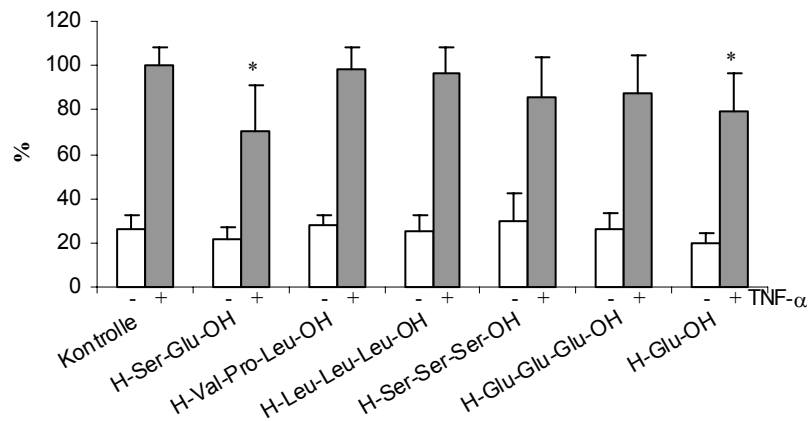


Abbildung 9: Relative Oberflächenexpression von VCAM-1 auf HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 μ M) verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Balken (weiß=unstimulierte HAoEC; grau=mit 0,2 ng/ml TNF- α stimulierte HAoEC) zeigen die Mittelwerte \pm SD; n=5; *p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle.

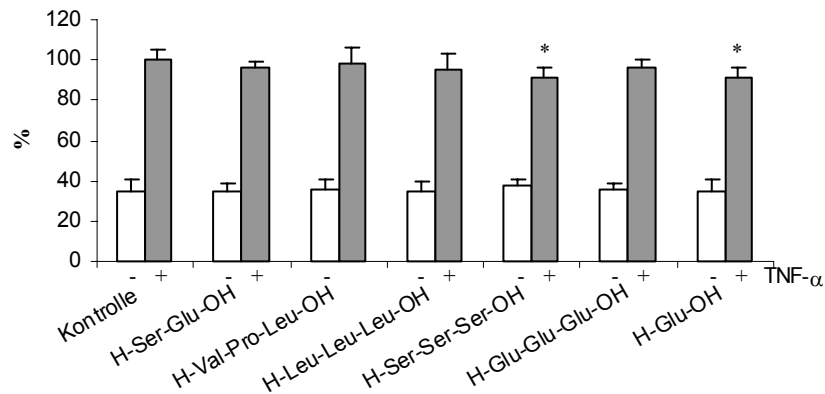


Abbildung 10: Relative Oberflächenexpression von ICAM-1 auf HAoEC nach 24 h Inkubation mit Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 μ M) verglichen mit unbehandelten Zellen. Die Balken (weiß=unstimulierte HAoEC; grau=mit 0,2 ng/ml TNF- α stimulierte HAoEC) zeigen die Mittelwerte \pm SD; n=5; *p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle.

3.4.2 Relative mRNA-Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1

Unstimulierte Endothelzellen wiesen durch die Behandlung mit 50 μ M H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH oder H-Glu-Glu-Glu-OH keine veränderten relativen mRNA-Konzentrationen des E-Selektins auf (Tabelle 13). Nur eine Inkubation mit 50 μ M Glutaminsäure führte zu einer höheren mRNA-Konzentration des E-Selektins gegenüber der Kontrolle. Die Stimulierung der Zellen mit 0,2 ng TNF- α /ml führte zu einer $46,9 \pm 10,3\%$ ($p < 0,05$) höheren relativen mRNA-Konzentration des E-Selektins. Stimulierte Zellen zeigten nach einer Inkubation mit 50 μ M H-Leu-Leu-Leu-OH oder H-Glu-Glu-Glu-OH eine signifikant geringere relative mRNA-Konzentration des E-Selektins. Für H-Ser-Glu-OH trifft dies tendenziell zu ($p < 0,13$). Die Behandlung mit 50 μ M H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH und Glutaminsäure zeigte keine Wirkung auf die relative mRNA-Konzentration des E-Selektins.

In unstimulierten Zellen konnte die mRNA des VCAM-1 nicht nachgewiesen werden. In stimulierten Zellen wurde sie durch eine Inkubation mit jeweils 50 μ M H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH oder H-Ser-Ser-Ser-OH in ihrer relativen Konzentration stark vermindert. H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure waren diesbezüglich ohne Wirkung.

Die relative mRNA-Konzentration des ICAM-1 wurde in unstimulierten Endothelzellen durch die Inkubation mit 50 μ M Glutaminsäure erhöht. Bei einer Inkubation mit 50 μ M H-Val-Pro-Leu-OH kam es zu einer tendenziellen Verringerung der relativen mRNA-Konzentration des ICAM-1. Eine Behandlung mit H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH und H-Glu-Glu-Glu-OH blieb ohne Effekt für die relative ICAM-1-mRNA-Konzentration. Durch eine Behandlung der Zellen mit TNF- α stieg die relative ICAM-1-mRNA-Konzentration tendenziell um $53,0 \pm 21,8\%$ ($p < 0,13$). In stimulierten Zellen verringerte sich die relative mRNA-Konzentration des ICAM-1 durch die Inkubation mit H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH oder H-Ser-Ser-Ser-OH gegenüber den Kontrollen. Die relative mRNA-Konzentration des ICAM-1 unterscheidet sich bei Inkubation mit 50 μ M H-Glu-Glu-Glu-OH oder Glutaminsäure nicht von der unbehandelten Kontrolle.

3 Ergebnisse

Tabelle 13: Relative mRNA-Konzentration von E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 in HAoEC nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 µM) verglichen mit unbehandelten Zellen^a

Peptid	Adhäsionsmoleküle					
	E-Selektin		VCAM-1		ICAM-1	
	<i>relative mRNA-Konzentration (% der Kontrolle)</i>					
	-	+	-	+	-	+
Kontrolle	100,0 ± 22,9	100,0 ± 33,0	n.d.	100,0 ± 54,3	100,0 ± 35,4	100,0 ± 54,5
H-Ser-Glu-OH	91,5 ± 27,0	35,8 ± 37,5	n.d.	72,9 ± 48,4	134,1 ± 27,8	52,6 ± 31,0
H-Val-Pro-Leu-OH	93,1 ± 18,7	82,6 ± 39,9	n.d.	20,3* ± 18,8	75,5 ± 4,4	24,9* ± 23,0
H-Leu-Leu-Leu-OH	89,5 ± 28,1	45,6* ± 24,6	n.d.	14,1* ± 7,5	80,5 ± 23,4	19,4* ± 10,2
H-Ser-Ser-Ser-OH	83,1 ± 17,5	68,7 ± 28,5	n.d.	7,7* ± 2,2	85,2 ± 17,9	5,9* ± 2,2
H-Glu-Glu-Glu-OH	98,3 ± 20,5	26,9* ± 30,8	n.d.	69,4 ± 53,6	108,4 ± 29,1	87,3 ± 53,0
H-Glu-OH	169,5* ± 19,2	91,9 ± 54,9	n.d.	85,8 ± 32,9	174,0* ± 41,4	66,1 ± 23,9

^a Ergebnisse als Mittelwert ± SD für n=3

^b 0,2 ng/ml TNF-α; + mit TNF-α; - ohne TNF-α

* p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

n.d. nicht dedektierbar

3.4.3 Adhäsion von U937-Monozyten an HAoEC

Wie Abbildung 11 deutlich macht, ließ sich die Adhäsion von Monozyten an HAoEC durch eine Behandlung der Endothelzellen mit Peptiden beeinflussen. Die Adhäsion von Monozyten an unstimulierte Endothelzellen wurde durch deren Vorinkubation mit 50 µM H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH oder H-Ser-Ser-Ser-OH vermindert, verglichen mit der Adhäsion an unbehandelte Endothelzellen. H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure konnten diese Wirkung nicht erzielen.

An mit 0,2 ng TNF-α/ml stimulierten Endothelzellen hafteten 41,3 ± 15,0% (p<0.05) mehr Monozyten als an unstimulierten Endothelzellen. Eine Behandlung von stimulierten Endothelzellen mit H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH oder H-Glu-Glu-Glu-OH verringerte die Monozytenadhäsion um 28,1 - 37,3%. H-Ser-Glu-OH und Glutaminsäure waren diesbezüglich ohne Wirkung.

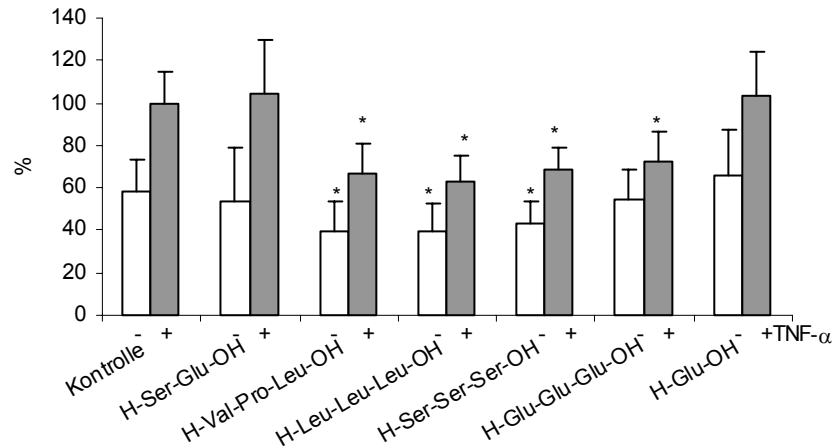


Abbildung 11: Einfluss von Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 μ M) auf die Adhäsion von U937-Monozyten an HAoEC. Die Balken zeigen (weiß=unstimulierte HAoEC; grau=mit 0,2 ng/ml TNF- α stimulierte HAoEC) den Mittelwert \pm SD für die relative Adhäsion verglichen mit der Kontrolle; n=5; *p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

3.5 Einfluss bioaktiver Peptide auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Abbildung 12 zeigt die Aktivität der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 in Endothelzellen unter Einfluss von Peptiden bzw. von Glutaminsäure. Die Aktivität der Untereinheit p50 ließ sich durch die Behandlung der Zellen mit 0,2 ng TNF- α /ml um $46,2 \pm 13,7\%$ ($p < 0.05$) steigern. Durch eine Inkubation der stimulierten Zellen mit H-Ser-Glu-OH oder Glutaminsäure verringerte sich die Aktivität um signifikante 41,7 bzw. 57,4%, durch eine Inkubation mit H-Ser-Ser-Ser-OH um tendenziell 28,9% ($p < 0.13$). Die Inkubation der stimulierten Zellen mit 50 μ M H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH oder H-Glu-Glu-Glu-OH hatte keinen Einfluss auf die p50-Aktivität.

Die Behandlung der Zellen mit TNF- α steigerte die Aktivität der Untereinheit p65 um $34,8 \pm 5,4\%$ ($p < 0.05$). Die p65-Aktivität ließ sich durch eine Inkubation mit Peptiden bzw. mit Glutaminsäure nicht signifikant beeinflussen. Tendenziell ($p < 0.13$) deutet H-Leu-Leu-Leu-OH auf eine Aktivierung, H-Ser-Glu-OH auf eine Inhibierung der p65 hin.

3 Ergebnisse

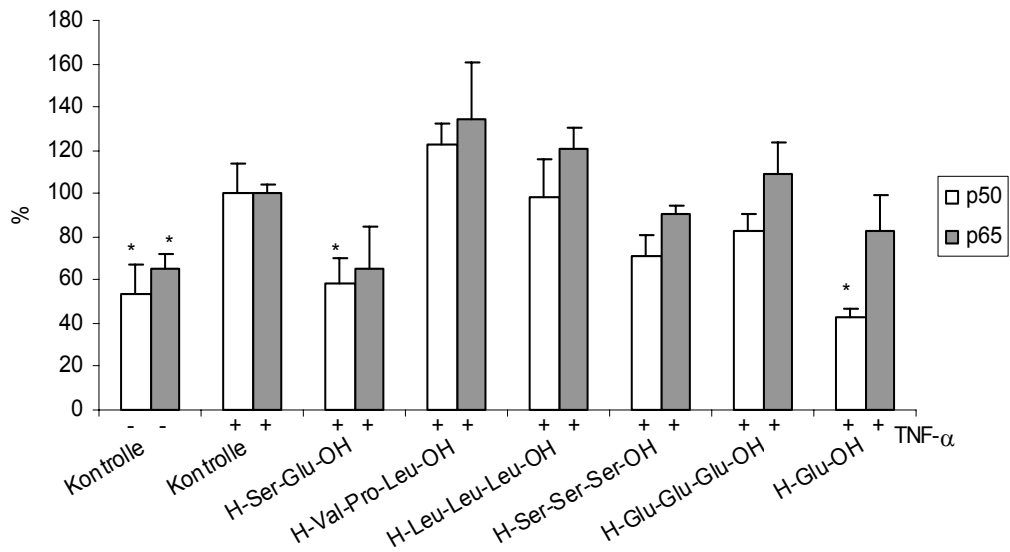


Abbildung 12: Einfluss von Di- und Tripeptiden bzw. Glutaminsäure (jeweils 50 μ M) auf die Aktivität der Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm SD für die relative Aktivität verglichen mit der Kontrolle; n=3; *p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war, aus Nahrungsproteinen abgeleitete Peptide mit definierter Aminosäuresequenz zu finden, die eine Wirkung auf atheroskleroserelevante Parameter von humanen Endothelzellen der Aorta ausüben. Zudem sollte geklärt werden, ob die auftretenden Wirkungen auf transkriptionelle Effekte zurückzuführen sind.

4.1 Serumfreie Zellkultur

Zur optimalen Kultivierung eukaryonter Zellen muss das Kulturmedium eine Vielzahl von Faktoren enthalten. In der Regel werden den Kulturmedien dazu Seren zugesetzt. Sie enthalten die notwendigen Hormone, Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix, Bindungs- und Transportproteine, Plasmalipide, Vitamine und Spurenelemente - insgesamt ca. 1000 unterschiedliche Komponenten, darunter auch verschiedene Serumproteasen, wie Thrombin, Renin, Plasmin, Elastase, Chymotrypsin und andere.

Zur Kultivierung der hier verwendeten HAoEC wurde eine Supplementierung des ECGM-MV-Mediums mit 5% FKS empfohlen.

Die proteolytische Aktivität des FKS konnte mit Hilfe von Lichtabsorptionsmessungen bei 205 nm nachgewiesen werden. Da im Rahmen der Studie jedoch die Wirkung von Di- und Tripeptiden untersucht werden sollte, musste das Kulturmedium so beschaffen sein, dass die Di- und Tripeptide als solche während der Inkubationszeit erhalten blieben. Das heißt, es musste mit serumfreiem Medium bzw. mit einem synthetisch hergestellten Serumersatz gearbeitet werden. Bisher ist eine Kultivierung von humanen Aortenendothelzellen unter serumfreien Bedingungen aus der Literatur kaum bekannt.

Battista & Soderland (1998) gelang eine serumfreie Kultur von humanen arteriellen Endothelzellen. Das serumfreie Medium wurde hier mit *human basic fibroblast growth factor* (hbFGF), *human epidermal growth factor* (hEGF) und dem Anheftungsfaktor CS-5.0-AF supplementiert.

Eine Kultivierung der verwendeten HAoEC in serumfreiem ECGM-MV-Medium, welches nach den Vorgaben des Herstellers mit *Endothelial Cell Growth*

Supplement/Heparin (ECGS/H), hEGF, Hydrocortison, Amphotericin B und Gentamicin supplementiert wurde, gelang in eigenen Versuchen nicht.

Daraufhin wurde eine Kultivierung der HAoEC in voll supplementiertem, serumfreiem ECGM-MV-Medium, welchem verschiedene Serums Substitute zugesetzt wurden, erprobt. Dabei wurden die HAoEC schrittweise an den Serumersatz adaptiert. Wichtigste Kriterien für die Eignung der Serums Substitute stellten hier die Morphologie und das Wachstum der Endothelzellen dar. Ohne Zweifel ist auch die Expression des von Willebrandfaktors für Endothelzellen ein entscheidendes Charakteristikum.

Das Wachstum der HAoEC in mit 5% BMS- bzw. 4% Ultroser[®]G-supplementiertem ECGM-MV-Medium war vergleichbar mit dem Wachstum der Zellen in FKS-haltigem ECGM-MV-Medium. Dagegen wuchsen die HAoEC in SES-supplementiertem ECGM-MV-Medium nicht - die Zellen lösten sich von der Wachstumsfläche ab.

Die Entscheidung fiel auf den Serumersatz Ultroser[®]G, da sich die Zellen, die im Medium mit diesem Substitut wuchsen, in ihrer Morphologie nicht von den Zellen in FKS-haltigem Medium unterschieden. Sie zeigten das für Endothelzellmonolayer typische Kopfsteinpflastermuster. Dagegen zeigten die HAoEC in Medium, welches mit BMS supplementiert wurde, ein deutlich runderes Erscheinungsbild.

Ultroser[®]G wurde auch bei der Kultivierung anderer Zelltypen erfolgreich eingesetzt (Dartsch *et al.*, 1990; Wunderlich *et al.*, 1994; Smit *et al.*, 1995; Sachs *et al.*, 2003). Es enthält den Trypsinhemmer Aprotinin, was im Hinblick auf eine Minimierung der Proteaseaktivität im Medium als günstig zu bewerten ist. Dass das Ultroser[®]G keine proteolytische Aktivität aufweist, konnte mit Lichtabsorptionsmessungen bei 205 nm bestätigt werden.

4.2 Proliferation

Die Untersuchung der Endothelzellproliferation unter Peptideinfluss diente der Suche nach bioaktiven Peptiden. Denn die Beeinflussung der Proliferation von Endothelzellen steht am Ende der Aktivierung von Rezeptoren (zB. Thromboxanrezeptor, Endothelinrezeptor, VEGF-Rezeptor) verschiedener biochemischer Signaltransduktionskaskaden.

Von den 17 untersuchten Dipeptiden konnten 2 die Zellproliferation stimulieren. Mit einer Steigerung der Proliferation um maximal 9% war die Wirkung jedoch gering. Tripeptide waren nach unseren Untersuchungen eher dazu in der Lage, die Endothelzellproliferation zu beeinflussen. Von den 11 untersuchten Tripeptiden bewirkten 5 Peptide eine Erhöhung der Proliferation um bis zu 25%. Auffällig war die stark inhibierende Wirkung von glutaminsäurehaltigen Di- und Tripeptiden in Konzentrationen >5 mM auf die Zellproliferation. Sie betrug bis zu 100%. Diese Wirkung kann nicht allein auf toxische Effekte der Peptide zurückgeführt werden, denn die Lebensfähigkeit der Endothelzellen betrug nach der Inkubation mit glutaminsäurehaltigen Peptiden (10 mM) nicht weniger als 41,4 %. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen, die die Peptidinkubation überlebten, nicht mehr proliferierten. Die einzelne Aminosäure Glutaminsäure hemmte in hoher Konzentration (10 mM) die Proliferation um 69%, wirkte dabei jedoch auch nicht toxisch.

Das Dipeptid H-Val-Pro-OH-HCl inhibierte die Endothelzellproliferation in einer Konzentration von 10 mM ebenfalls um nahezu 100%, ohne dabei toxische Effekte aufzuweisen.

Die Wirkung von Di- und Tripeptiden auf die Proliferation von Endothelzellen der menschlichen Aorta wurden bisher in keiner anderen publizierten Studie untersucht.

Bekannt sind Mechanismen zur proliferationsstimulierenden Wirkung des VEGF (Ferrara & Davis-Smyth, 1997; Neuhaus *et al.*, 2003) und die proliferationsinhibierende Wirkung des TNF- α (Patterson *et al.*, 1996; Petrache *et al.*, 2001). Der VEGF stellt das wichtigste extrazelluläre Signal zur Proliferation dar. Die mitogene Wirkung des rHuVEGF165 konnte von uns nachgewiesen werden. Er aktiviert den VEGF-Rezeptor2 (Abbildung 13), welcher das Signal über Phospho-

lipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$), einen intrazellulären Calciumanstieg und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) weiterleitet und über die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) - Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) -Kaskade zur Proliferation führt (Munoz-Chapuli *et al.*, 2004).

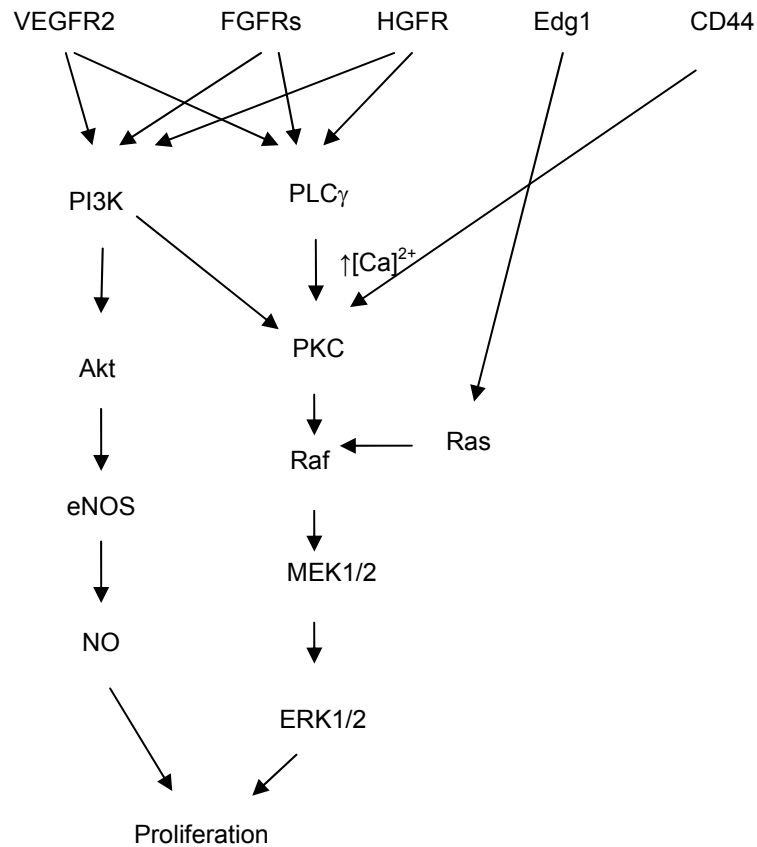


Abbildung 13: Hauptsignalwege zur Proliferationssteigerung in Endothelzellen.

Die Aktivierung verschiedener Rezeptoren wie dem VEGF-Rezeptor2 (VEGFR2), dem *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) und dem *Hepatocyte Growth Factor Receptor* (HGFR) führen über die Phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$) und die Proteinkinase C (PKC) in die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) – Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) –Kaskade. Auch die Aktivierung des Hyaloratzeptors CD44 und des *Endothelial Differentiation sphingolipid G-protein-coupled* (EDG1)-Rezeptors führen zur Proliferation.

Rat sarcoma (Ras), *Rapidly growing Fibrosarcoma* (Raf), Phospho Inositol 3 Kinase (PI3K), Akt=Proteinkinase B (PKB)

Auch die Aktivierung des *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) mit dem FGF und die Aktivierung des *Hepatocyte Growth Factor Receptor* (HGFR = Met) mit dem *Hepatozyt Growth Factor* führen über $PLC\gamma$ in die ERK-MAPK-Kaskade (Munoz-Chapuli *et al.*, 2004). Die Aktivierung des Hyaloratzeptors CD44 und des *Endothelial Differentiation sphingolipid G-protein-coupled* (EDG1) -Rezeptors münden an späterer Stelle ebenfalls in die ERK-MAPK-Kaskade und führen zur Zellproliferation (Munoz-Chapuli *et al.*, 2004).

Welche Rolle eine stimulierte Endothelzellproliferation selbst in der Entstehung von Gefäßkrankheiten spielt, ist umstritten. Während Favot *et al.* (2003) und Martin *et al.* (2003) in der Inhibierung der Endothelzellproliferation eine Prävention der atherosklerotischen Plaquentwicklung sehen, interpretieren Ulrich-Merzenich *et al.* (2002) eine gesteigerte Proliferation als protektiven Mechanismus gegenüber atherogenen Einflüssen im Sinne einer Reendothelialisierung nach vorausgegangener Endothelschädigung. Dem VEGF werden gefäßschützende Eigenschaften zugeschrieben, da er über die Aktivierung seines Rezeptors auch zu einer gesteigerten Synthese vasoaktiver Substanzen wie NO und PGI₂ führt (Zachary, 2001).

Die Wirkung mitogener Faktoren kann durch NO verstärkt werden. Parenti *et al.* (1998) zeigten an koronaren Endothelzellen, dass die mitogene Aktivität des VEGF durch NO erhöht wird, indem NO die ERK1/2-Aktivität steigert und damit die Proliferation stimuliert.

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α induziert in Endothelzellen Apoptose (Petrache *et al.*, 2001) und reduziert die mRNA-Transkripte der VEGF-Rezeptoren (Patterson *et al.*, 1996). Die proliferationsinhibierende Wirkung des TNF- α , die auch von uns nachgewiesen werden konnte, ist unter anderem darauf zurückzuführen.

Eine frühe Studie berichtet über wachstumsstimulierende Wirkungen einiger Di- und Tetrapeptide an humanen Zelllinien (Ito & Moore, 1969). Franek & Katinger (2002) zeigten an Maus-Hybridomazellen ME-750 nach 6 Tagen wachstumssteigernde Wirkungen von H-Gly-Gly-Gly-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Ala-Ala-Ala-OH und H-Thr-Thr-Thr-OH um bis zu 44%. Diese Effekte zeigten sich bei Peptidkonzentrationen im millimolaren Bereich, wobei die Wirkmechanismen unbekannt sind. Wachstumshemmend wirkten in dieser Untersuchung H-Gly-Lys-Gly-OH und H-Gly-His-Gly-OH. Die hemmende Wirkung von H-Gly-Lys-Gly-OH zeigte sich auch in eigenen Untersuchungen.

Nach Untersuchungen von Leitman *et al.* (1986) stellt der *second messenger* cAMP einen wichtigen endogenen Regulator der Endothelzellproliferation dar. Ein intrazellulärer cAMP-Anstieg führt zu einer Proliferationshemmung. Diese ist vermittelt durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). Eine

aktivierte PKA phosphoryliert Raf-1 an Serin 43 und inhibiert damit seine Kinaseaktivität und blockiert die MAPK-Kaskade (Wu *et al.*, 1993). Schon die basale PKA-Aktivität unterdrückt konstitutiv die MAPK (D'Angelo *et al.*, 1997). In unseren Untersuchungen wurde durch H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure eine Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt. Dies deutet darauf hin, dass die Steigerung der Proliferation durch diese Peptide über eine Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgt sein kann. Ob die Konzentrationsabnahme des cAMP auf eine verminderte Aktivität der Adenylatzyklase (einer oder mehrerer der 8 Isoformen) oder eine gesteigerte Phosphodiesteraseaktivität zurückzuführen ist, wurde nicht untersucht. Bekannt ist, dass ein intrazellulärer Calciumanstieg, wie er als Antwort auf mitogene Signale möglich ist, die Adenylatzyklase 6 inhibiert und so zu reduzierten cAMP-Spiegeln führt (Cioffi *et al.*, 2002). Gleichzeitig kann VEGF die Expression der Phosphodiesteraseisoenzyme PDE2 und PDE4 stimulieren. Die hydrolytische Aktivität dieser Enzyme reduziert die cAMP-Spiegel (Favot *et al.*, 2004).

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die Proliferation von Aortaendothelzellen auch von der Aktivität proteolytischer Enzyme, wie der Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) beeinflusst wird. Das Tetrapeptid N-Acetyl-seryl-aspartyl-lyl-prolin (AcSDKP), welches endogen aus Thymosin- β 4 entsteht und als Inhibitor der Proliferation pluripotenter Stammzellen gilt, bewirkt in einer Konzentration von 10 nM eine signifikante Steigerung der Proliferation von Aortaendothelzellen der Maus (Wang *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2003) zeigten, dass AcSDKP in Endothelzellen zu einer gesteigerten MMP-1-Freisetzung führt. Auch VEGF und andere angiogene Signale führen in Endothelzellen zu einer gesteigerten MMP-1-Freisetzung (Unemori *et al.*, 1992). Die proteolytische Aktivität dieses Enzyms degradiert die Basallamina des Endothels, welches einen der ersten Schritte in der Angiogenese darstellt (Munoz-Chapuli *et al.*, 2004). Ob die proliferationsstimulierenden Di- und Tripeptide ebenfalls über eine gesteigerte MMP-1-Freisetzung wirken, kann nur anhand weiterer Untersuchungen geklärt werden.

Auch die Serin/Threoninkinase *mamalian Target of Rapamycin* (mTOR) ist eine zentrale Komponente der Zellwachstumsregulation. Das mTOR ist Angriffspunkt der immunosuppressiven Droge Rapamycin. Nährstoffverfügbarkeit (insbesondere von Aminosäuren) und Energielevel (ATP) sind in der Lage, die Aktivität des mTOR und damit des Zellwachstums zu regulieren (Dennis *et al.*, 2001; Tokunaga *et al.*, 2004). mTOR wird über die Aktivierung des Phosphoinositol-3-Kinase/ProteinkinaseB (PI3K/PKB) Weges aktiviert und reguliert das Zellwachstum durch Phosphorylierung der S6 Kinase (positive Regulation) und des *4E Binding Protein-1* (negative Regulation). Beides sind wichtige Schritte in der Regulation der Proteintranslation (Corradetti *et al.*, 2005). Laut Tokunaga *et al.* (2004) kann Leucin die mTOR-Funktion am effektivsten stimulieren. Die Annahme, dass auch Di- und Tripeptide die Aktivität des mTOR regulieren können, ist spekulativ. Glutamin, Serin und Valin waren in eigenen Untersuchungen im mikromolaren Konzentrationsbereich in der Lage, die Endothelzellproliferation zu steigern, allerdings lag diese Steigerung bei weniger als 10%. Gerade Leucin zeigte in eigenen Versuchen keine proliferationsstimulierende Wirkung. Trotzdem lässt es sich nicht gänzlich ausschließen, dass die proliferationsstimulierende Wirkung der untersuchten Peptide auf eine Aktivierung des mTOR zurückgeführt werden kann. Franek (2004) schreibt glutaminsäure/glutamin-, leucin- und methioninreichen Peptidfraktionen des Weizenglutens antiapoptotische Eigenschaften zu, da Maus-Hybridomazellen, die mit diesen Fraktionen behandelt wurden, eine stärkere Persistenz während der abnehmenden Wachstumsphase der Zellkultur zeigten. Dagegen zeigen zahlreiche Untersuchungen, dass die Aminosäure Glutamat als Neurotransmitter in hohen Konzentrationen (mM-Bereich) in neuronalen Zellen Apoptose induziert (Gary & Mattson, 2001; Bhavnani *et al.*, 2003; Zhang & Bhavnani, 2006). Glutamat bewirkt eine Aktivierung der NF- κ B- Untereinheiten p50 und p65 und eine Induzierung der Expression der proapoptotischen Gene Caspase-3, Caspase-2L und Bax (Pizzi *et al.*, 2005). An neuronalen Zellen wurden bisher viele unterschiedliche Glutamatrezeptoren (GluR) identifiziert. Auch in mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns und der Haut wurde die Expression verschiedener Typen des metabotropischen GluR nachgewiesen (Krizbai *et al.*, 1998; Smith, 2000; Collard *et al.*, 2002). Glutamat reguliert hier die Barriere-

funktion des Endothels. Auch wurden spezifische GluR auf der Plasmamembran von T-Lymphozyten identifiziert. Sie interagierten mit glutaminsäurehaltigen Dipeptiden wie H-Ala-Glu-OH, H-Glu-Ala-OH und H-Glu-Glu-OH (Kostanyan *et al.*, 1997). Bis jetzt gibt es keine Untersuchungen, die das Vorkommen von GluR in der Membran von humanen Aortaendothelzellen bestätigen. Deshalb ist die Behauptung spekulativ, dass Glutaminsäure und glutaminsäurehaltige Peptide in hohen Konzentrationen (mM) über Glutamat-rezeptoren die metabolische Aktivität von HAoEC reduzieren und Apoptose induzieren können. Wenn man davon ausgeht, dass mit der Induzierung der Apoptose die Zellproliferation blockiert ist, könnte dies jedoch eine Erklärung für die nahezu 100%ig gehemmte Proliferation der HAoEC unter Einfluss hoher Konzentrationen glutaminsäurehaltiger Peptide sein.

Es ist nicht möglich, mit den vorliegenden Ergebnissen den Signaltransduktionsweg, welcher zur erhöhten oder verminderten Proliferation der Endothelzellen unter Peptideinfluss führte, zu definieren. Dies war auch nicht Ziel der Arbeit. Ziel war, mit Hilfe des Proliferationstests Peptide ausfindig zu machen, die sich möglicherweise als bioaktiv herausstellen, und mit diesen weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Veränderung atheroskleroserelevanter Endothelzellfunktionen durchzuführen.

4.3 Freisetzung vasoaktiver Substanzen

Weiterführende Untersuchungen mit den Peptiden, die im Proliferationstest eine Wirkung hervorriefen, sollten zeigen, ob diese eine Veränderung der Bildung vasoprotektiver Substanzen wie NO und PGI₂ oder des prothrombotisch wirksamen TXA₂ in den HAoEC bewirken.

NO ist ein potenter Vasodilator, vermindert die Plättchenaggregation und -adhäsion, limitiert die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, verhindert die Monozytenchemotaxis und inhibiert die Leukozytenadhäsion an das Endothelium (Caulin-Glaser *et al.*, 1997). Zudem kann NO Endothelzellen direkt vor Schädigung durch prooxidative und proapoptotische Agenzien schützen (Wallace & Miller, 2000).

Eine verminderte NO-Synthese ist häufig Ursache der endothelialen Dysfunktion, welche wiederum eine zentrale Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen spielt (Rösen, 2002; Var *et al.*, 2003). Dagegen werden erhöhte eNOS-Aktivitäten und daraus resultierende gesteigerte NO-Konzentrationen im Blut mit atheroprotektiven Effekten (Verminderung des Blutdrucks, der Cholesterolsplasmaspiegel und atherosklerotischer Läsionen) in Verbindung gebracht (van Haperen *et al.*, 2002). NO wird durch NO-Synthasen aus Arginin über eine Fünf-Elektronen-Reaktion erzeugt. Die in Endothelzellen konstitutiv exprimierte eNOS ist primär ein kalzium- und calmodulinabhängiges Enzym (Michal, 1999; Toborek & Kaiser, 1999).

Eigene Untersuchungen zeigten, dass die NO-Freisetzung aus HAoEC durch Peptide gesteigert wird. In TNF- α -stimulierten HAoEC bewirkten H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Glu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure eine signifikante Steigerung der NO-Freisetzung. In unstimulierten HAoEC zeigte sich nur bei H-Val-Pro-Leu-OH diese Wirkung.

Dass Peptide aus Nahrungsproteinen die NO-Freisetzung aus arteriellen Endothelzellen beeinflussen können, wurde in noch keiner publizierten Studie untersucht. Jedoch konnte an isolierten mesenterialen Arterien von spontan hypertensiven Ratten durch das Peptid H-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-OH aus dem chymotryptischen Verdau des Ovalbumins eine NO-vermittelte Vasorelaxation hervorgerufen werden (Matoba *et al.*, 1999). Das als Ovokinin bezeichnete H-Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu-OH, welches ebenfalls aus Ovalbumin gereinigt wird, wirkt als Bradykininrezeptor (BKR)-Agonist und führt zur Freisetzung von NO und PGI₂ aus mesenterialen Arterien des Hundes (Fujita *et al.*, 1995). Das Casomokinin L (H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Pro-Leu-OH) ein Derivat des β -Casomorphins hat 3 übereinstimmende Reste mit der Substanz P und bindet an dessen Rezeptor, den Neurokininrezeptor 1 (NK1-Rezeptor). Dessen Aktivierung führt zur NO-vermittelten Vasorelaxation (Fujita *et al.*, 1996). Dass dieser NK1-Rezeptor tatsächlich auf humanen Endothelzellen exprimiert wird, zeigten Greeno *et al.* (1993). Die Aktivierung dieser G-Protein gekoppelten Rezeptoren (zB. für Bradykinin, Substanz P) führt über nachfolgende Aktivierungen einer oder mehrerer Isoformen der PLC und gesteigerte Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) zum Anstieg des

intrazellulären Kalziumspiegels, was wiederum zu einer Aktivierung der eNOS führt. Unsere Untersuchungen zeigten, dass es vor allem Peptide mit Prolin- und Leucinresten sind, die die Freisetzung von NO stimulieren können. Möglicherweise können auch H-Val-Pro-Leu-OH und H-Leu-Leu-Leu-OH über die Aktivierung einer der G-Protein gekoppelten Rezeptoren die NO-Freisetzung erhöhen.

Die eNOS kann laut Toborek & Kaiser (1999) auch kalziumunabhängig reguliert werden. Zum einen führt Scherspannung über die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Weges (Abbildung 13) zur gesteigerten NO-Produktion (Fleming *et al.*, 1998). Zum anderen zeigen Untersuchungen von Marrero *et al.* (1999), dass das eNOS-Enzym an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (BKR2, Ang II-Rezeptor, Endothelin (ET)-1-Rezeptor) gebunden und damit inhibiert sein kann. Erst durch Agonistenstimulation der Rezeptoren kommt es zu Phosphorylierungen am Rezeptor, wodurch ein Ablösen und eine Aktivierung des eNOS-Enzyms möglich werden.

Die erhöhte NO-Freisetzung, die durch H-Val-Pro-Leu-OH und Glutaminsäure in unstimulierten HAoEC verursacht wurde, kann nicht auf transkriptionelle Effekte zurückgeführt werden, denn die eNOS-mRNA-Konzentration war unter diesen Bedingungen nicht signifikant verändert. Die Ursache liegt möglicherweise in einer erhöhten Aktivität der eNOS. Die eNOS-mRNA-Konzentration in TNF- α stimulierten HAoEC nahm durch eine Inkubation mit H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Glu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH und Glutaminsäure signifikant ab. Dafür kann es zwei Gründe geben. Zum einen ist bekannt, dass NO selbst als negativer Feedbackmodulator fungiert (Buga *et al.*, 1993). Davis *et al.* (2004) zeigten, dass Scherspannung die Translokation von p50 und p65 (NF- κ B-Aktivierung) in den Zellkern und eine Bindung an die GAGACC-Sequenz bewirkt und dadurch zur eNOS-Promotoraktivierung führt. Die daraus folgende erhöhte NO-Freisetzung führt zu einer Inhibierung des NF- κ B. Dabei induziert und stabilisiert NO den NF- κ B-Inhibitor I κ B α und verhindert damit die Aktivierung des NF- κ B. Dieser Mechanismus kann zumindest für die Wirkung von H-Ser-Glu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH und Glutaminsäure eine Erklärung sein, denn unsere Messungen zeigten für diese Peptide eine tendenziell verminderte Konzentration der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 im Zellkern. Für diesen Mechanismus

spricht auch, dass das NO in dem Zellüberstand gemessen worden ist, welcher sich 24 Stunden über den Zellen befand. Die Konzentration der eNOS-mRNA wurde nach Ablauf der 24 Stunden gemessen. Das aus den Endothelzellen freigesetzte NO konnte 24 Stunden auf die eNOS-Promotoraktivität einwirken.

Zum anderen gibt es mehrere AT-reiche Sequenzen in der Promotorregion des eNOS-Genes, welche empfänglich für Destabilisierungsmeldungen sind. Das Phänomen der mRNA-Destabilisierung tritt u.a. unter TNF- α -Einfluss auf, kann aber auch in anderen Situationen eine Rolle spielen (Harrison *et al.*, 1996). Eigene Untersuchungen zeigen eine um 32% geringere eNOS-mRNA-Konzentration in TNF- α stimulierten HAoEC gegenüber unstimulierten HAoEC. Möglicherweise wird die eNOS-mRNA der untersuchten HAoEC durch TNF- α destabilisiert und diese Wirkung durch eine Koinkubation mit den Peptiden H-Val-Pro-Leu-OH und H-Leu-Leu-Leu-OH verstärkt. Das würde bedeuten, dass die Peptide kurzfristig über eine Aktivitätssteigerung der eNOS die NO-Freisetzung erhöhen, aber langfristig (>24h) über eine Destabilisierung der eNOS-mRNA zu einer verminderten NO-Freisetzung führen. Um dies abzuklären, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Synergistisch zum NO wirkt das Eicosanoid PGI₂. PGI₂ inhibiert die Proliferation von vaskulären *Smooth muscle cells* (SMC), inhibiert die Plättchenaggregation und hat vasodilatatorische Effekte (Itoh *et al.*, 2003). Geringe PGI₂-Level wurden als Risikofaktor für ischämische Herzkrankheiten identifiziert (Gryglewski *et al.*, 1995). Gegenspieler des PGI₂ ist das TXA₂. Dieses Eicosanoid bewirkt eine Vasokonstriktion und Plättchenaggregation. Es wird primär in den Plättchen synthetisiert, jedoch sind auch Endothelzellen in der Lage, kleine Mengen TXA₂ zu bilden (Toborek & Kaiser, 1999). Die vorliegende Studie zeigt, dass eine Inkubation von unstimulierten HAoEC mit H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure und die Inkubation von stimulierten HAoEC mit H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure signifikant oder tendenziell zu einer gesteigerten Freisetzung von PGI₂ führten, jedoch die Synthese von TXA₂ nicht beeinflussten (außer Glutaminsäure). Das heißt, der antithrombotische und antiatherogene Status wurde durch die Peptidinkubation verbessert. Nur H-Leu-Leu-Leu-OH

fürhte zu einer Verschlechterung dieses Status, da es die PGI₂-Freisetzung nicht beeinflusste, in unstimulierten HAoEC jedoch zu einer erhöhten Konzentration von TXA₂ im Zellüberstand führte.

Geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der Bildung der genannten Eicosanoide ist die Aktivität der Cyclooxygenase (COX). Die COX-1 wird in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert. Die COX-2 wird in Endothelzellen, Monozyten, Muskelzellen und Fibroblasten durch verschiedene Cytokine, Wachstumsfaktoren und bakterielle Endotoxine induziert (Trifan & Hla, 2003; Norata *et al.*, 2004). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die COX-1-mRNA-Konzentration in HAoEC durch Peptidinkubation nicht beeinflusst werden konnte. Nur Glutaminsäure führte zu einer erhöhten mRNA-Konzentration der COX-1. Die Transkription der COX-2 dagegen wurde in unstimulierten HAoEC durch eine Inkubation mit H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure signifikant oder tendenziell stimuliert. Die Freisetzung von Eicosanoiden aus HAoEC kann durch Peptide also auf transkriptioneller Ebene reguliert werden.

Bisher gibt es keine publizierte Studie, die die Freisetzung von Eicosanoiden aus Endothelzellen unter Peptideinfluss untersucht hat. Lediglich Yanagisawa *et al.* (1994) und Yanagisawa & Wada (1998) zeigten an Ratten, dass eine Fütterung mit einer proteinreichen Diät (40% Kasein) zu einer erhöhten Aktivität der COX und einem signifikanten Konzentrationsanstieg von Eicosanoiden (PGE₂, PGI₂, TXA₂) in den Nierenkanälchen und Glomeruli führte. Der Einfluss von als vasoprotektiv bekannten Substanzen auf die COX und die Eicosanoidfreisetzung wurde in zahlreichen Untersuchungen gezeigt. Kohlstedt *et al.* (2005) zeigten, dass der ACE-Inhibitor Ramipril eine Signalkaskade auslöst, die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und dadurch zu einer Steigerung der COX-2-Expression in HUVEC führt. Die Phytoestrogene Genistein und Daidzein steigern die COX-2-mRNA-Expression (nicht die der COX-1) und die Synthese von PGI₂ in HUVECs über einen Estrogenrezeptor vermittelten Mechanismus (Hermenegildo *et al.*, 2005). Auch VEGF induziert die COX-2 (mRNA und Protein) in *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) über p38 und JNK-Aktivierung (Wu *et al.*, 2006). Darüber hinaus induziert VEGF die Aktivierung der ERK1/2. Dies führt

zu erhöhter Zellproliferation, aber auch zu gesteigerter cPLA₂- und COX-1-vermittelter PGI₂-Freisetzung. Bei Norata *et al.* (2004) induzieren die *High Density Lipoproteins 3* (HDL3) die COX-2 Expression und die PGI₂-Freisetzung aus HUVECs via p38-Aktivierung. Sie gehen davon aus, dass die Aktivierung dieses Signalweges die COX-2-mRNA-Transkription und -stabilisierung fördert. Die COX-2 wird also hauptsächlich über p38-Kinase und Jun N-terminale Kinase (JNK) vermittelte Signalwege induziert. Dabei sind verschiedene Transkriptionsfaktoren wie *cAMP Response Element-Binding Protein* (CREB), *Nuclear Factor of Activated T Cells* (NFAT), *Activating Protein-1* (AP-1) und NF-κB involviert. Über welchen der Wege die von uns untersuchten Peptide die COX-2 induzieren, ist unklar. Unwahrscheinlich ist jedoch eine Aktivierung über den Transkriptionsfaktor NF-κB, da dieser durch Peptidinkubation nicht aktiviert wurde.

Der Einfluss einer Peptidinkubation auf die enzymatische Aktivität der COX wurde nicht untersucht. Es gibt Studien, die einen Einfluss von NO auf die COX-Aktivität zeigen, so dass eine indirekte Wirkung unserer Peptide auf die COX-Aktivität über eine NO-Konzentrationssteigerung nicht ausgeschlossen werden kann. Bei Davidge *et al.* (1995) führte eine Stimulierung der eNOS in kultivierten bovinen koronaren mikrovaskulären Endothelzellen über eine Aktivierung der COX zu einer gesteigerten Eicosanoidsynthese (6-keto-PGF_{1α}, TXB₂). Möglicherweise kann NO die COX cGMP-unabhängig direkt aktivieren, indem es an das Eisen-Zentrum der COX bindet (Salvemini *et al.*, 1993).

Lange Zeit wurde ein Anstieg der COX-2-Expression nicht mit vasoprotektiven Effekten assoziiert, da die COX-2 als die „schlechte“ COX-Isoform galt. Laut Norata *et al.* (2004) und Bolego *et al.* (2006) kommt der COX-2 jedoch gerade in Endothelzellen (auch in unstimulierten) eine bedeutende Rolle als Quelle der Prostazyklinproduktion zu.

Der beobachtete Effekt der Peptide auf die Freisetzung der vasoaktiven Substanzen könnte auch durch eine unspezifische Hemmung des ACE durch die Peptide verursacht werden. Es wurden inzwischen zahlreiche Peptide aus Nahrungsproteinen identifiziert, die die Aktivität des ACE hemmen und eine

Blutdrucksenkung bewirken (Clare & Swaisgood, 2000). Das ACE ist eine in der Endothelzellmembran lokalisierte Zinkmetalloproteinase, die carboxyterminal Dipeptide von verschiedenen Peptiden abspaltet (Ackermann *et al.*, 1998) und so u.a. zur Bildung des vasokonstriktorisch wirksamen Angiotensin 2 und zum Abbau des vasodilatatorisch wirksamen Bradykinin führt. Bradykinin stimuliert über einen PLC γ und Ca²⁺ vermittelten Signalweg die eNOS. Eine Verhinderung des Bradykininabbaus durch ACE stimuliert die Freisetzung von NO und PGI₂ aus Endothelzellen (Zurbano *et al.*, 1999; Ambrosioni *et al.*, 2001). In eigenen Untersuchungen zeigte nur H-Val-Pro-Leu-OH in einer Konzentration von 1 μ M eine ACE-inhibitorische Wirkung. In höheren Konzentrationen war dieser Effekt nicht nachzuweisen. Dieser Effekt ist nicht zu erklären, wenn man die Gesetzmäßigkeiten der Enzymhemmung zugrunde legt. Eine potente ACE-inhibitorische Sequenz aus dem β -Casein der Kuhmilch, das H-Ile-Pro-Pro-OH zeigte in unserer Studie die erwartete konzentrationsabhängige Wirkung. Die anderen von uns untersuchten Peptide beeinflussten die Aktivität des ACE nicht.

Die Bindung von natürlichen ACE-Inhibitoren an ACE wird stark von deren C-terminaler Tripeptidsequenz beeinflusst. Aus Nahrung freigesetzte ACE-Inhibitoren enthalten Prolin, Lysin oder Arginin am C-Terminus (FitzGerald *et al.*, 2004). Cheung *et al.* (1980) konnten ACE-inhibitorische Aktivitäten auch von Dipeptiden nachweisen. Dabei stellten sie fest, dass für die hemmende Wirkung des Dipeptids die Aminosäure am C-terminalen Ende entscheidend ist. Prolin am C-Terminus hatte in diesen Untersuchungen die stärkste inhibierende Wirkung, gefolgt von Tyrosin und Phenylalanin. Da keines der hier untersuchten Peptide Prolin, Lysin, Arginin, Tyrosin oder Phenylalanin am C-Terminus aufwies, konnte eine ACE-inhibitorische Wirkung nicht unbedingt erwartet werden. Die Ursache der Freisetzung der vasoaktiven Substanzen durch die untersuchten Peptide liegt nicht in einer ACE-Inhibierung.

4.4 Adhäsive Eigenschaften der HAoEC

Die Adhäsion von Monozyten an Adhäsionsmoleküle vaskulärer Endothelzellen ist ein entscheidender Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose (Huo & Ley, 2001). Die Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 werden in Endothelzellen nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert (Baeuerle & Henkel, 1994). Auch eigene Untersuchungen zeigten, dass eine Stimulierung/Aktivierung der HAoEC mit 0,2 ng TNF- α /ml eine deutliche Steigerung der Adhäsionsmoleküloberflächenexpression sowie eine erhöhte Anheftung von Monozyten induziert.

Eigene Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle auf TNF- α -stimulierten HAoEC durch Inkubation mit Peptiden zu beeinflussen ist. Die Oberflächenexpression des E-Selektins konnte an TNF- α -stimulierten HAoEC durch Inkubation mit H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Glu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure signifikant vermindert werden. In unstimulierten Zellen hatten die Peptide, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle.

Im funktionellen Test, in dem die Adhäsion von U937-Monozyten an die mit Peptiden vorbehandelten HAoEC untersucht wurde, zeigte sich, dass die getesteten Tripeptide alle in der Lage waren, die Monozytenadhäsion an stimulierte HAoEC signifikant zu vermindern. Aufgrund der geringeren Oberflächenexpression des E-Selektins unter Peptideinfluss, war dieser Effekt zu erwarten. Die Selektinfamilie wurde als prinzipieller Vermittler der initialen Bindung zwischen Leukozyten und der Endothelzelloberfläche und dem Leukozyten-„Rolling“ identifiziert (Springer, 1995). Die Immunglobuline VCAM-1 und ICAM-1 führen im nächsten Schritt der Leukozytenimmobilisierung zu einer festeren Adhäsion (Rodgers *et al.*, 2000). Das Anhaften der Leukozyten am vaskulären Endothel (Ludwig *et al.*, 2004) ist ein frühes Ereignis in der Entstehung der Atherosklerose. Durch eine verminderte Oberflächenexpression der E-Selektine können initial weniger Monozyten gebunden werden, so dass es unabhängig von der Oberflächenexpression der VCAM-1 und ICAM-1 zu einer verminderten

Adhäsion der Monozyten kommt. Dass dieser Vorgang auch von anderen Faktoren beeinflusst wird, zeigt die Tatsache, dass H-Ser-Glu-OH und Glutaminsäure in eigenen Untersuchungen ebenfalls zu einer geringeren E-Selektin- und auch VCAM-1-Oberflächenexpression an der Zelloberfläche führten, jedoch nicht zu einer reduzierten Monozytenadhäsion.

Wahrscheinlich führt die Inkubation mit Tripeptiden nicht nur zur verminderten E-Selektin-Expression, sondern gleichzeitig auch zu einer verminderten Freisetzung von proadhäsiven Mediatoren oder zur vermehrten Bildung von adhäsionsinhibierenden Faktoren. H-Ser-Glu-OH und Glutaminsäure können zwar die E-Selektin und VCAM-1-Oberflächenexpression reduzieren, aber möglicherweise nicht günstig auf das Muster adhäsionsinhibierender Faktoren wirken.

Lindemann *et al.* (2003) zeigten an aktivierten HUVECs, dass Prostacyclinanaloga eine adhäsionsinhibierende Wirkung auf polymorphonukleare Leukozyten haben, die unabhängig von den Adhäsionsmolekülen erfolgt und auf die Beeinflussung der Mediatorfreisetzung zurückzuführen ist.

Als Mediatoren der Endothelzell-Monozyten-Adhäsion wirken chemotaktische Cytokine (Chemokine). Sehr stark reagieren Monozyten auf die Chemokine *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP)-1 (Schall *et al.*, 1990; Rollins, 1991), RANTES, MCP-2, MCP-3 und *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1(α) (Ugucioni *et al.*, 1995), welche in zahlreichen Zelltypen (u.a. in Endothelzellen, Makrophagen und Monozyten) synthetisiert werden können (Lukacs *et al.*, 1995).

Die reduzierte Oberflächenexpression des E-Selektins auf stimulierten HAoEC durch Peptidinkubation kann im Fall von H-Ser-Glu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH und H-Glu-Glu-Glu-OH auf die transkriptionelle Ebene zurückgeführt werden, da hier auch die mRNA-Konzentrationen des E-Selektins vermindert waren. In der Promotorregion des E-Selektins wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und des AP-1 identifiziert (Krieglstein & Granger, 2001). Da die Aktivität der NF- κ B-Untereinheit p50 unter H-Ser-Glu-OH-Einfluss reduziert wurde, ist eine Regulierung über diesen Weg denkbar. Auch das Tripeptid H-Ser-Ser-Ser-OH bewirkte eine verminderte Aktivität der NF- κ B-Untereinheit p50 (tendenziell) und vermittelt darüber vermutlich eine Abnahme der VCAM-1- und ICAM-1-mRNA-Konzentration und eine verminderte Oberflächenexpression des ICAM-1. Bis jetzt

gibt es keine publizierte Studie, die den Einfluss von Tripeptiden auf die adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen untersuchte. Dagegen gibt es zahlreiche Untersuchungen zu anderen adhäsionsinhibierenden Nahrungsinhaltsstoffen. Vor allem sind es phenolische und polyphenolische Verbindungen aus Pflanzen, die über eine Inhibierung des NF- κ B die Expression der Adhäsionsmoleküle, die Produktion von Chemokinen und die Anheftung von Monozyten an aktivierte Endothelzellen reduzieren (Carluccio *et al.*, 2003; Jiang & Dusting, 2003; Liu *et al.*, 2004; Dell'Agli *et al.*, 2006). Dies ist vor allem auf die antioxidativen Eigenschaften dieser Verbindungen zurückzuführen, denn die Signaltransduktionswege, inklusive dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, zur Regulierung der Adhäsionsmolekülexpression sind redox-sensitiv (Dwivedi *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004). Auch die kurzkettige Fettsäure Butyrat inhibiert in physiologischen Konzentrationen eine Aktivierung des NF- κ B und die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 in aktivierten Endothelzellen (Zapolska-Downar *et al.*, 2004).

Das H-Ser-Ser-Ser-OH ist das einzige der untersuchten Peptide, dessen anti-atherogenes bzw. adhäsionsinhibierendes Potential auf allen 4 Untersuchungsebenen (Transkriptionsfaktoraktivität, mRNA-Konzentration der Adhäsionsmoleküle, Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle, U937-Adhäsion) nachgewiesen werden konnte. Zwar zeigten alle untersuchten Tripeptide im U937-Adhäsionstest adhäsionsinhibierende Effekte, diese lassen sich jedoch nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht schlüssig erklären. So nahm die mRNA-Konzentration des VCAM-1 und ICAM-1 in stimulierten HAoEC durch Inkubation mit H-Val-Pro-Leu-OH und H-Leu-Leu-Leu-OH zwar ebenfalls ab, jedoch zeigte sich auf der Ebene der Oberflächenexpression von VCAM-1 und ICAM-1 und auf der Ebene der NF- κ B-Aktivität kein Einfluss. Möglicherweise sind diese adhäsionsinhibierenden Effekte auch auf einen Einfluss der Peptide auf die Freisetzung adhäsionsregulierender Mediatoren zurückzuführen.

Dass eine Regulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen auch unabhängig vom Transkriptionsfaktor NF- κ B möglich ist, zeigen mehrere Studien. Das Tee flavonoid Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) reduziert die cytokinininduzierte VCAM-1-Expression und die Monozytenadhäsion an Endothelzellen, ohne die NF- κ B-Aktivität zu beeinflussen (Ludwig *et al.*, 2004). Man geht davon aus, dass EGCG

den für VCAM-1 spezifischen Transkriptionsfaktor GATA supprimiert. Stangl *et al.* (2005) zeigten, dass Phloretin, ein Flavonoid aus dem Apfel, die Translokation des IRF-1 in den Zellkern verhindert und damit die zytokininduzierte Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin inhibiert. Aus den Arbeiten von Voraberger *et al.* (1991), Iademaro *et al.* (1992), Neish *et al.* (1992), Collins *et al.* (1995), Neish *et al.* (1995a) und Neish *et al.* (1995b) geht hervor, dass die Aktivierung des NF- κ B für die transkriptionelle Induzierung der Adhäsionsmoleküle zwar wichtig ist, für eine maximale Induzierung der Transkription durch Zytokin-stimulierung jedoch eine Aktivierung von Kombinationen verschiedener Transkriptionsfaktoren nötig ist: AP-1, SP-1, GATA und IRF-1 zusammen mit NF- κ B für VCAM-1; SP-1 und AP-1 zusammen mit NF- κ B für ICAM-1; *cAMP-responsiv element* (CRE) / *activated transcription factor* (ATF) und AP-1 zusammen mit NF- κ B für E-Selektin. So könnte der Einfluss von H-Val-Pro-Leu-OH und H-Leu-Leu-Leu-OH auf die mRNA-Konzentration von VCAM-1 und ICAM-1 auch auf eine Inhibierung anderer Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sein.

Als Ursache für die adhäsionsinhibierende Wirkung des Tripeptids H-Ser-Ser-Ser-OH könnte der stimulierende Einfluss des Peptids auf die NO-Freisetzung angesehen werden. NO ist als wichtiger endogener Mediator bekannt, der die Leukozytenadhäsion hemmt (Kubes *et al.*, 1991). Das NO hat antioxidative Eigenschaften, welche die Aktivierung des redoxsensitiven NF- κ B verhindern und damit auch die Transkription des VCAM-1 (Khan *et al.*, 1996) und ICAM-1 reduzieren (Lindemann *et al.*, 2000).

Wong *et al.* (2004) und Wong *et al.* (2005) zeigten, dass NO auch zu Effekten an Blutzellen führt, die eine Adhäsion an das Endothel verhindern. In humanen Endothelzellen des Gehirns wurde durch NO-Donatoren die Expression der Adhäsionsmoleküle nicht beeinflusst, jedoch zeigte eine Vorbehandlung von *polymorphonuclear neutrophils* (PMN) mit NO-Donatoren oder einem cGMP-Agonist eine verminderte Adhäsion der PMN an Adhäsionsmoleküle. Hier werden die Interaktionen zwischen PMN und Endothelzellen über einen cGMP-abhängigen Signalweg reguliert, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist.

Möglicherweise reguliert das NO, welches unsere peptidbehandelten Endothelzellen abgegeben haben, nicht nur die Expression der Adhäsionsmoleküle in den

Endothelzellen selbst, sondern hat auch Einfluss auf die adhäsiven Eigenschaften der Monozyten. Obwohl dieser Effekt aufgrund des Versuchsaufbaus kaum zu erreichen ist, lässt er sich nicht ausschließen.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Studien deuten daraufhin, dass aus Nahrungsproteinen freigesetzte Peptide mit bestimmten Aminosäuresequenzen neben ihrer nutritiven Funktion, die Fähigkeit besitzen, verschiedene biologische Funktionen bei Mensch und Tier zu beeinflussen. Bisher wurden für solche bioaktiven Peptide antimikrobielle, hypotensive, cholesterolsenkende, antithrombotische und immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben. Solche regulatorischen Peptide werden durch enzymatische Proteolyse während der gastrointestinalen Passage freigesetzt und können über spezifische Transportsysteme durch das Epithel transportiert werden, in den Blutkreislauf gelangen und auf die das Blutgefäßsystem auskleidenden Endothelzellen einwirken.

Ziel dieser Arbeit war, aus Nahrungsproteinen abgeleitete Peptide mit definierter Aminosäuresequenz zu finden, die eine Wirkung auf atheroskleroserelevante Parameter von humanen arteriellen Endothelzellen ausüben. Zudem sollte untersucht werden, ob die auftretenden Wirkungen auf transkriptionelle Effekte zurückzuführen sind.

Dazu wurden im Rahmen eines Screenings kultivierte humane Endothelzellen der Aorta 24 h mit 28 Di- und Tripeptiden (1 nM – 10 mM) aus der Caseinfraction des Kuhmilchproteins und den Glycinin G1- und β -Conglycinin-Untereinheiten des Sojaproteins inkubiert und deren Wirkung auf die Proliferation der Endothelzellen untersucht. Dabei erwiesen sich die Dipeptide H-Ser-Glu-OH und H-Pro-Ile-OH und die Tripeptide H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH als bioaktiv, da sie die Proliferation der HAoEC stimulierten. Die Peptide H-Val-Pro-OH·HCl, H-Glu-Ser-OH·0.3H₂O, H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH, H-Glu-Gln-Gln-OH, H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH, H-Gly-Lys-Gly-OH und H-Pro-Leu-Gly-NH₂ hemmten die Endothelzellproliferation in hohen Konzentrationen (>5 mM).

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob diese bioaktiven Peptide atheroskleroserelevante Parameter der Endothelzellfunktion beeinflussen können. Dazu wurde die Freisetzung der vasoaktiven Substanzen NO, PGI₂ und TXA₂ aus HAoEC nach 24 h Inkubation mit bioaktiven Peptiden (100 nM - 1 mM) ermittelt.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit dem Tripeptid H-Val-Pro-Leu-OH und der Aminosäure Glutaminsäure die Freisetzung des vasorelaxierend und antiinflammatorisch wirksamen NO stimulierte. In HAoEC, in denen durch eine Inkubation mit 0,2 ng TNF- α /ml eine inflammatorische Situation geschaffen worden war, konnten auch H-Ser-Glu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH und H-Glu-Glu-Glu-OH eine NO-Freisetzung stimulieren. Auch die Bildung des zum NO synergistisch wirkenden Eicosanoid PGI₂ konnte von bioaktiven Peptiden beeinflusst werden. So zeigte unsere Studie, dass eine Inkubation von unstimulierten HAoEC mit H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure und die Inkubation von stimulierten HAoEC mit H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure signifikant oder tendenziell zu einer gesteigerten Freisetzung von PGI₂ führten, jedoch die Synthese von TXA₂, dem Gegenspieler des PGI₂, nicht beeinflussten. Das hämodynamische Gleichgewicht des Endothels wird durch zahlreiche weitere Faktoren bestimmt, jedoch deuten diese Ergebnisse auf eine Verbesserung des antithrombotischen und antiatherogenen Status durch eine Inkubation mit bioaktiven Peptiden hin.

Auch scheinen einige der bioaktiven Peptide in der Lage zu sein, eine durch TNF- α hervorgerufene inflammatorische Situation zum Teil abzuwenden, denn HAoEC die mit H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH oder Glutaminsäure vorbehandelt wurden, adhärirten deutlich weniger Monozyten als die Kontrollzellen, was vermutlich auf die unter Peptideinfluss reduzierte Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin zurückzuführen ist. Die Oberflächenexpression zweier weiterer Immunglobuline, VCAM-1 und ICAM-1, wurde durch die Peptidinkubation kaum beeinflusst.

Die Wirkungen der bioaktiven Peptide können nur zum Teil auf transkriptionelle Effekte zurückgeführt werden. So veränderte sich die mRNA-Konzentration der eNOS unter Peptideinfluss nicht oder nahm sogar ab, obwohl die NO-Freisetzung durch Peptide erhöht wurde. Auch die Transkription der konstitutiv exprimierten COX-1 konnte in HAoEC durch Inkubation mit bioaktiven Peptiden nicht beeinflusst werden. Die Transkription der COX-2 dagegen wurde in unstimulierten HAoEC durch eine Inkubation mit H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-

Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und Glutaminsäure signifikant oder tendenziell stimuliert. Die Freisetzung von Eicosanoiden aus HAoEC kann durch Peptide also auf transkriptioneller Ebene reguliert werden.

Die im Monozytenadhäsionstest nachgewiesenen adhäsionsinhibierenden Effekte der Peptide lassen sich mit den vorliegenden Ergebnissen und dem derzeitigen Kenntnisstand nicht schlüssig erklären. Vermutlich beeinflussen die Peptide ein sehr komplexes System adhäsionsregulierender Faktoren. Allein die Wirkung des Tripeptids H-Ser-Ser-Ser-OH lässt sich auf eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zurückführen, welche sich in einer verminderten Transkription und Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle widerspiegelt.

Abschließend kann festgestellt werden, dass bioaktive Peptide ausfindig gemacht wurden, die die Proliferation, die Freisetzung vasoaktiver Substanzen und die adhäsiven Eigenschaften von humanen arteriellen Endothelzellen im Sinne einer Atheroskleroseprävention günstig beeinflussen.

Die Wirkungen wurden auch mit Peptidkonzentrationen erreicht, die als physiologisch erachtet werden können.

Die publizierten proatherogenen Effekte von Casein können durch die vorliegenden Untersuchungen nicht unterstützt werden.

6 Summary

Numerous studies indicate that apart from their basic nutritional function, peptides that are released from food proteins are capable of modulating several biological functions at humans and animals using specific amino acid sequences. Until now, antimicrobial, hypertensive, cholesterol-lowering, antithrombotic and immunomodulatory properties have been described for such biologically active peptides. Such regulatory peptides are released by enzymatic proteolysis during gastrointestinal passage and are thought to be transported through the epithelium thereby reaching to the bloodstream, where they act on the endothelial cells that line the blood vessel systems.

The aim of this study was to find food protein-derived peptides with defined amino acid sequences which show an impact on parameters of endothelial cells in human arteries which are relevant for the development of atherosclerosis. Furthermore it should be examined whether the effects observed are mediated at the transcriptional level. Therefore cultivated human endothelial cells from the aorta were treated for 24 h with 28 di- and tripeptides derived from cow milk protein and from glycinin G1- and β -conglycinin-subunits of soy protein; and the effect on endothelial cell proliferation was examined.

The dipeptides H-Ser-Glu-OH und H-Pro-Ile-OH and the tripeptides H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH und H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH could be demonstrated to be bioactive because they stimulated the proliferation of the endothelial cells.

The peptides H-Val-Pro-OH·HCl, H-Glu-Ser-OH·0.3H₂O, H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH, H-Glu-Gln-Gln-OH, H-Glu-(Gly-Gly-OH)-OH, H-Gly-Lys-Gly-OH and H-Pro-Leu-Gly-NH₂ inhibited the proliferation of the endothelial cells at high concentrations (>5 mM).

Next, it was examined whether these bioactive peptides could influence parameters of endothelial cell function relevant to atherosclerosis. Therefore, HAoECs were incubated for 24 h with bioactive peptides (at concentrations of 100 nM – 1 mM), and the effect on the release of vasoactive substances, NO, PGI₂ and TXA₂, was investigated. Incubating the tripeptide H-Val-Pro-Leu-OH and the amino

acid glutamic acid stimulated the release of the vasorelaxant and anti-inflammatory NO. In HAoECs stimulated with the proinflammatory agent TNF- α (0,2 ng/ml), H-Ser-Glu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH and H-Glu-Glu-Glu-OH also stimulated the release of NO. The release of the eicosanoid PGI₂, acting synergistically with NO, was also influenced by bioactive peptides. The present study showed that incubating unstimulated HAoECs with H-Ser-Glu-OH, H-Glu-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH and glutamic acid and incubating stimulated HAoECs with H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH and glutamic acid either significantly or tendentially increased the release of PGI₂ but did not increase the synthesis of TXA₂, which acts antagonistic to PGI₂. The hemodynamic balance of the endothelium is determined by numerous factors other than the proliferation and release of NO, PGI₂, TXA₂; however, these results of the present study indicate that incubating with bioactive peptides status improves the anti-thrombotic and anti-atherogenic status of the cultivated endothelial cells.

The observation that HAoECs treated with H-Val-Pro-Leu-OH, H-Leu-Leu-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-Glu-OH or glutamic acid had a lower monocyte adhesion than control cells suggests that some of the bioactive peptides are able to prevent the inflammatory situation caused by TNF- α . Presumably, the reduced monocytes adhesion was the result of a reduced surface expression of the adhesion molecule E-selectin following treatment with bioactive peptides. In contrast, only slight effects on the surface expression of two other immunoglobulins, VCAM-1 and ICAM-1, could be observed following incubation with peptides.

The effects of the peptides can only be partially explained by alterations at the level of gene transcription. For instance, the mRNA concentration of eNOS either remained unchanged or it was even reduced in response to the treatment with peptides, although the release of NO was increased by the peptides. In addition the transcription of the constitutively expressed COX-1 in HAoECs was unaffected by incubation with bioactive peptides. The transcription of COX-2, on the other hand, was significantly or tendentially stimulated in unstimulated HAoECs by incubation with H-Ser-Glu-OH, H-Val-Pro-Leu-OH, H-Ser-Ser-Ser-OH, H-Glu-Glu-

Glu-OH and glutamic acid. This suggests that the release of eicosanoids from HAoECs is regulated by peptides on the transcriptional level.

The results of this study can not explain the anti-adhesive effects of the peptides as demonstrated in the Monocyte adhesion assay. However, it is likely that the peptides influence a complex system of adhesion-regulating factors. Only the effect of the tripeptide H-Ser-Ser-Ser-OH can be explained by the inhibition of the transcription factor NF- κ B; which is probably responsible for the decreased mRNA levels and the surface expression of adhesion molecules.

In conclusion, within the present study bioactive peptides could be identified which influence the proliferation, release of vasoactive substances, and the adhesive properties of HAoEC in a beneficial manner making them less prone to atherosclerosis.

Noteworthy, the effects observed were present at concentration which can be regarded as physiologically relevant.

The present findings do not support observations from the literature reporting pro-atherogenic effects of casein.

7 Literaturverzeichnis

- Ackermann A, Fernandez-Alfonso MS, Sanchez de Rojas R, Ortega T, Paul M & Gonzalez C (1998) Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 124, 291-298.
- Adams MR, Golden DL, Franke AA, Potter SM, Smith HS & Anthony MS (2004) Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J Nutr* 134, 511-516.
- Ambrosioni E, Bacchelli S, Esposti DD & Borghi C (2001) Anti-ischemic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors: a future therapeutic perspective. *J Cardiovasc Pharmacol* 37 Suppl 1, S3-9.
- Aoyama T, Kohno M, Saito T, Fukui K, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Hirotsuka M & Kito M (2001) Reduction by phytate-reduced soybean beta-conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 1071-1075.
- Baeuerle PA & Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-179.
- Battista P & Soderland C (1998) Serum-free culture of human arterial and microvascular endothelial cells. *Focus* 17, 106-108.
- Bhavnani BR, Berco M & Binkley J (2003) Equine estrogens differentially prevent neuronal cell death induced by glutamate. *J Soc Gynecol Investig* 10, 302-308.
- Bolego C, Buccellati C, Radaelli T, Cetin I, Puglisi L, Folco G & Sala A (2006) eNOS, COX-2, and prostacyclin production are impaired in endothelial cells from diabetics. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 188-190.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE & Ignarro LJ (1993) Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res* 73, 808-812.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A & De Caterina R (2003) Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 622-629.

- Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC & Bender JR (1997) 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res* 81, 885-892.
- Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF & Cushman DW (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 255, 401-407.
- Cioffi DL, Moore TM, Schaack J, Creighton JR, Cooper DM & Stevens T (2002) Dominant regulation of interendothelial cell gap formation by calcium-inhibited type 6 adenylyl cyclase. *J Cell Biol* 157, 1267-1278.
- Clare DA & Swaisgood HE (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci* 83, 1187-1195.
- Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL & Colgan SP (2002) Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. *J Biol Chem* 277, 14801-14811.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D & Maniatis T (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J* 9, 899-909.
- Corradetti MN, Inoki K & Guan KL (2005) The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* 280, 9769-9772.
- Damasceno NR, Gidlund MA, Goto H, Dias CT, Okawabata FS & Abdalla DS (2001) Casein and soy protein isolate in experimental atherosclerosis: influence on hyperlipidemia and lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab* 45, 38-46.
- D'Angelo G, Lee H & Weiner RI (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, 353-366.
- Dartsch PC, Weiss HD & Betz E (1990) Human vascular smooth muscle cells in culture: growth characteristics and protein pattern by use of serum-free media supplements. *Eur J Cell Biol* 51, 285-294.
- Davidge ST, Baker PN, Laughlin MK & Roberts JM (1995) Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ Res* 77, 274-283.

- Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A & Harrison DG (2004) Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* 279, 163-168.
- Dell'Agli M, Fagnani R, Mitro N, Scurati S, Masciadri M, Mussoni L, Galli GV, Bosisio E, Crestani M, De Fabiani E, Tremoli E & Caruso D (2006) Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *J Agric Food Chem* 54, 3259-3264.
- Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC & Thomas G (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.
- Dwivedi A, Anggard EE & Carrier MJ (2001) Oxidized LDL-mediated monocyte adhesion to endothelial cells does not involve NFkappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 239-244.
- Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL & Machado RA (2006) Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 5, 4.
- Favot L, Keravis T & Lugnier C (2004) Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost* 92, 634-645.
- Favot L, Martin S, Keravis T, Andriantsitohaina R & Lugnier C (2003) Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc Res* 59, 479-487.
- Feletou M & Vanhoutte PM (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H985-1002.
- Ferrara N & Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25.
- FitzGerald RJ, Murray BA & Walsh DJ (2004) Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 134, 980S-988S.
- Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B & Busse R (1998) Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res* 82, 686-695.
- Franek F (2004) Gluten of spelt wheat (*Triticum aestivum* subspecies *spelta*) as a source of peptides promoting viability and product yield of mouse hybridoma cell cultures. *J Agric Food Chem* 52, 4097-4100.
- Franek F & Katinger H (2002) Specific effects of synthetic oligopeptides on cultured animal cells. *Biotechnol Prog* 18, 155-158.

- Friedland J, Silverstein E (1976) A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme, *Am J Clin Pathol* 66, 416-424
- Fujita H, Suganuma H, Usui H, Kurahashi K, Nakagiri R, Sasaki R & Yoshikawa M (1996) Vasorelaxation by casomokinin L, a derivative of beta-casomorphin and casoxin D, is mediated by NK1 receptor. *Peptides* 17, 635-639.
- Fujita H, Usui H, Kurahashi K & Yoshikawa M (1995) Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides* 16, 785-790.
- Ganapathy V & Leibach F (1999) Protein digestion and assimilation. Philadelphia, PA: Lippincott William & Wilkins.
- Ganong W (1997) Gastrointestinal function. Stamford, CT: Appleton & Lange.
- Gardner ML (1984) Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet--a neglected field? *Biol Rev Camb Philos Soc* 59, 289-331.
- Gardner ML (1988) Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annu Rev Nutr* 8, 329-350.
- Gary DS & Mattson MP (2001) Integrin signaling via the PI3-kinase-Akt pathway increases neuronal resistance to glutamate-induced apoptosis. *J Neurochem* 76, 1485-1496.
- Gimbrone A, Topper, JN (1999) Biology of the vessel wall: endothelium. Philadelphia.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS & Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126, 131-138.
- Greeno EW, Mantyh P, Vercellotti GM & Moldow CF (1993) Functional neurokinin 1 receptors for substance P are expressed by human vascular endothelium. *J Exp Med* 177, 1269-1276.
- Grimble GK (2000) Mechanisms of peptide and amino acid transport and their regulation. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 3, 63-84; discussion 84-68.
- Gryglewski RJ, Chlopicki S, Swies J & Niezabitowski P (1995) Prostacyclin, nitric oxide, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 748, 194-206; discussion 206-197.
- Harrison DG, Inoue N, Ohara Y & Fukai T (1996) Modulation of endothelial cell nitric oxide synthase expression. *Jpn Circ J* 60, 815-821.

- Hermenegildo C, Oviedo PJ, Garcia-Perez MA, Tarin JJ & Cano A (2005) Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 722-728.
- Huo Y & Ley K (2001) Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 173, 35-43.
- Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD & Dean DC (1992) Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 267, 16323-16329.
- Ito T & Moore GE (1969) The growth-stimulating activity of peptides on human hematopoietic cell cultures. *Exp Cell Res* 56, 10-14.
- Itoh A, Nishihira J, Makita H, Miyamoto K, Yamaguchi E & Nishimura M (2003) Effects of IL-1beta, TNF-alpha, and macrophage migration inhibitory factor on prostacyclin synthesis in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Respirology* 8, 467-472.
- Jiang F & Dusting GJ (2003) Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Curr Vasc Pharmacol* 1, 135-156.
- Karaki H, Doi K, Sugano S, Uchiwa H, Sugai R, Murakami U & Takemoto S (1990) Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol C* 96, 367-371.
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW & Medford RM (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9114-9119.
- Kohlstedt K, Busse R & Fleming I (2005) Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension* 45, 126-132.
- Kostanyan IA, Merkulova MI, Navolotskaya EV & Nurieva RI (1997) Study of interaction between L-glutamate and human blood lymphocytes. *Immunol Lett* 58, 177-180.
- Kriegelstein CF & Granger DN (2001) Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 14, 44S-54S.
- Krizbai IA, Deli MA, Pestenacz A, Siklos L, Szabo CA, Andras I & Joo F (1998) Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 54, 814-819.

- Kubes P, Suzuki M & Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4651-4655.
- Leitman DC, Fiscus RR & Murad F (1986) Forskolin, phosphodiesterase inhibitors, and cyclic AMP analogs inhibit proliferation of cultured bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* 127, 237-243.
- Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Gueldry S, Volot F, Gambert P & Neel D (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, 434-439.
- Lindemann S, Gierer C & Darius H (2003) Prostacyclin inhibits adhesion of polymorphonuclear leukocytes to human vascular endothelial cells due to adhesion molecule independent regulatory mechanisms. *Basic Res Cardiol* 98, 8-15.
- Lindemann S, Sharafi M, Spiecker M, Buerke M, Fisch A, Grosser T, Veit K, Gierer C, Ibe W, Meyer J & Darius H (2000) NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb Res* 97, 113-123.
- Liu JM, Lawrence F, Kovacevic M, Bignon J, Papadimitriou E, Lallemand JY, Katsoris P, Potier P, Fromes Y & Wdzieczak-Bakala J (2003) The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Blood* 101, 3014-3020.
- Liu L, Zubik L, Collins FW, Marko M & Meydani M (2004) The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds. *Atherosclerosis* 175, 39-49.
- Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Frattini R, Fumagalli R & Sirtori CR (1992) Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J Nutr* 122, 1971-1978.
- Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Arnoldi A, Kurowska E, Carroll KK & Sirtori CR (2000) Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr* 130, 2543-2549.
- Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G & Stangl V (2004) The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 659-665.
- Lukacs NW, Strieter RM, Elnor V, Evanoff HL, Burdick MD & Kunkel SL (1995) Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86, 2767-2773.

- Marrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB & Venema RC (1999) Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 343 Pt 2, 335-340.
- Martin S, Favot L, Matz R, Lugnier C & Andriantsitohaina R (2003) Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2. *Biochem Pharmacol* 65, 669-675.
- Masuda O, Nakamura Y & Takano T (1996) Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 126, 3063-3068.
- Matoba N, Usui H, Fujita H & Yoshikawa M (1999) A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett* 452, 181-184.
- Matsui T, Tamaya K, Seki E, Osajima K, Matsumoto K & Kawasaki T (2002) Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 204-208.
- Meng CQ, Somers PK, Hoong LK, Zheng XS, Ye Z, Worsencroft KJ, Simpson JE, Hotema MR, Weingarten MD, Mac DML, Hill RR, Marino EM, Suen KL, Luchoomun J, Kunsch C, Landers LK, Stefanopoulos D, Howard RB, Sundell CL, Saxena U, Wasserman MA & Sikorski JA (2004) Discovery of novel phenolic antioxidants as inhibitors of vascular cell adhesion molecule-1 expression for use in chronic inflammatory diseases. *J Med Chem* 47, 6420-6432.
- Michal G (1999) cGMP-abhängige Signalwege und die Wirkungen von Stickstoffmonoxid (NO). Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N & Maebuchi M (2004) Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 352-359.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Munoz-Chapuli R, Quesada AR & Angel Medina M (2004) Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61, 2224-2243.

- Neish AS, Khachigian LM, Park A, Baichwal VR & Collins T (1995a) Sp1 is a component of the cytokine-inducible enhancer in the promoter of vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem* 270, 28903-28909.
- Neish AS, Read MA, Thanos D, Pine R, Maniatis T & Collins T (1995b) Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol Cell Biol* 15, 2558-2569.
- Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ & Collins T (1992) Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* 176, 1583-1593.
- Neuhaus T, Stier S, Totzke G, Gruenewald E, Fronhoffs S, Sachinidis A, Vetter H & Ko YD (2003) Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif* 36, 75-86.
- Neumann P, Gertzberg N & Johnson A (2004) TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L452-459.
- Norata GD, Callegari E, Inoue H & Catapano AL (2004) HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 871-877.
- Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F & Ziche M (1998) Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 273, 4220-4226.
- Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME & Haber E (1996) Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98, 490-496.
- Petrache I, Verin AD, Crow MT, Birukova A, Liu F & Garcia JG (2001) Differential effect of MLC kinase in TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis and barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L1168-1178.
- Pfaffl MW (2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007
- Pingoud A, Urbanke C: *Arbeitsmethoden der Biochemie* Berlin, New York: de Gruyter 1997

- Pizzi M, Sarnico I, Boroni F, Benetti A, Benarese M & Spano PF (2005) Inhibition of I κ B phosphorylation prevents glutamate-induced NF- κ B activation and neuronal cell death. *Acta Neurochir Suppl* 93, 59-63.
- Rodgers SD, Camphausen RT & Hammer DA (2000) Sialyl Lewis(x)-mediated, PSGL-1-independent rolling adhesion on P-selectin. *Biophys J* 79, 694-706.
- Rösen P (2002) Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *J Kardiol* 9, 556-562.
- Rollins BJ (1991) JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells* 3, 517-524.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ & Packer L (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 189-212.
- Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E & Merluzzi VJ (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, 1665-1669.
- Rutherford-Markwick KJ & Moughan PJ (2005) Bioactive peptides derived from food. *J AOAC Int* 88, 955-966.
- Sachs LA, Finkbeiner WE & Widdicombe JH (2003) Effects of media on differentiation of cultured human tracheal epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39, 56-62.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG & Needleman P (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7240-7244.
- Satake M, Enjoh M, Nakamura Y, Takano T, Kawamura Y, Arai S & Shimizu M (2002) Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 378-384.
- Schall TJ, Bacon K, Toy KJ & Goeddel DV (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669-671.
- Schlimme E & Meisel H (1995) Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung* 39, 1-20.

- Schrimpf G: Gentechnische Methoden 3. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag 2002
- Sen CK & Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 10, 709-720.
- Sipola M, Finckenberg P, Korpela R, Vapaatalo H & Nurminen ML (2002) Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J Dairy Res* 69, 103-111.
- Sirtori CR & Lovati MR (2001) Soy proteins and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 3, 47-53.
- Smit NP, Westerhof W, Menko WJ, Verbeek NM & Pavel S (1995) Stimulation of cultured melanocytes in medium containing a serum substitute: Ultrosor-G. *Pigment Cell Res* 8, 19-27.
- Smith QR (2000) Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr* 130, 1016S-1022S.
- Springer TA (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57, 827-872.
- Stangl V, Lorenz M, Ludwig A, Grimbo N, Guether C, Sanad W, Ziemer S, Martus P, Baumann G & Stangl K (2005) The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets. *J Nutr* 135, 172-178.
- Tak PP & Firestein GS (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107, 7-11.
- Toborek M & Kaiser S (1999) Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 94, 295-314.
- Tokunaga C, Yoshino K & Yonezawa K (2004) mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 443-446.
- Trifan OC & Hla T (2003) Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 7, 207-222.
- Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B & Baggiolini M (1995) Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol* 25, 64-68.
- Ulrich-Merzenich G, Metzner C, Schiermeyer B & Vetter H (2002) Vitamin C and vitamin E antagonistically modulate human vascular endothelial and smooth muscle cell DNA synthesis and proliferation. *Eur J Nutr* 41, 27-34.

- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA & Amento EP (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 153, 557-562.
- van Haperen R, de Waard M, van Deel E, Mees B, Kutryk M, van Aken T, Hamming J, Grosveld F, Duncker DJ & de Crom R (2002) Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide. *J Biol Chem* 277, 48803-48807.
- Var A, Yildirim Y, Onur E, Kuscu NK, Uyanik BS, Goktalay K & Guvenc Y (2003) Endothelial dysfunction in preeclampsia. Increased homocysteine and decreased nitric oxide levels. *Gynecol Obstet Invest* 56, 221-224.
- Varet J, Vincent L, Mirshahi P, Pille JV, Legrand E, Opolon P, Mishal Z, Soria J, Li H & Soria C (2003) Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci* 60, 810-819.
- Vermeirssen V, Deplancke B, Tappenden KA, Van Camp J, Gaskins HR & Verstraete W (2002) Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer. *J Pept Sci* 8, 95-100.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A & Boyd MR (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51, 2515-2520.
- Voraberger G, Schafer R & Stratowa C (1991) Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol* 147, 2777-2786.
- Wallace JL & Miller MJ (2000) Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119, 512-520.
- Wang D, Carretero OA, Yang XY, Rhaleb NE, Liu YH, Liao TD & Yang XP (2004) N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline stimulates angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2099-2105.
- Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K & Vincent SR (2004) Nitric oxide regulates interactions of PMN with human brain microvessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 142-148.
- Wong D, Prameya R, Wu V, Dorovini-Zis K & Vincent SR (2005) Nitric oxide reduces T lymphocyte adhesion to human brain microvessel endothelial cells via a cGMP-dependent pathway. *Eur J Pharmacol* 514, 91-98.
- Wu G, Luo J, Rana JS, Laham R, Sellke FW & Li J (2006) Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 69, 512-519.

- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ & Sturgill TW (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262, 1065-1069.
- Wunderlich K, Knorr M & Dartsch PC (1994) Serum-free cultivation of bovine lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232, 355-360.
- Yanagisawa H, Morrissey J, Kurihara N, Wada O & Klahr S (1994) Effects of dietary protein on glomerular eicosanoid production in rats with bilateral ureteral obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 207, 234-241.
- Yanagisawa H & Wada O (1998) Effects of dietary protein on eicosanoid production in rat renal tubules. *Nephron* 78, 179-186.
- Yang CY, Dantzig AH & Pidgeon C (1999) Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res* 16, 1331-1343.
- Zachary I (2001) Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1375-1386.
- Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kolodziej B & Naruszewicz M (2004) Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF-kappaB and PPARalpha. *J Nutr Biochem* 15, 220-228.
- Zhang Y & Bhavnani BR (2006) Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neurosci* 7, 49.
- Ziv E & Bendayan M (2000) Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microsc Res Tech* 49, 346-352.
- Zurbano MJ, Anguera I, Heras M, Roig E, Lozano M, Sanz G & Escolar G (1999) Captopril administration reduces thrombus formation and surface expression of platelet glycoprotein IIb/IIIa in early postmyocardial infarction stage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1791-1795.

Erklärung

Hiermit versichere ich Eides Statt, dass ich die eingereichte Dissertation "Die Wirkung von Di- und Tripeptiden auf funktionelle Parameter von humanen Endothelzellen der Aorta" 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.

Weimar, den 19.06.2008

Vera Götze

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 für ihre freundliche und motivierende Betreuung in den ersten eineinhalb Jahren. Ebenso möchte ich Herrn PD Dr. R. Ringseis danken für seine Unterstützung während der experimentellen Arbeit, seine unkomplizierte, schnelle und kritische Durchsicht meines Manuskriptes und seine wertvollen Ratschläge.

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 Dipl. Troph. B. Matthes für ihre stete Hilfsbereitschaft und die hervorragende Zusammenarbeit (auch zu nächtlicher Stunde).

Meinem Bruder F. Lehmann danke ich für Erstellung des Programms zur Auffindung häufiger Di- und Tripeptidsequenzen in den Primärsequenzen von Proteinen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinem Mann Christian und meinen Kindern Hanna und Oskar für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Hilfe und bei meinen Eltern, deren Interesse an meiner Arbeit mir ein stetiger Ansporn war.

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

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname	Vera Götze (geb. Lehmann)
Geburtsdatum	11.07.1977
Geburtsort	Ueckermünde
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1984 – 1986	August Nitz Oberschule in Ueckermünde
1986 – 1991	Max Matern Oberschule in Ueckermünde
1991 – 1996	Sportgymnasium in Neubrandenburg Abschluss: Abitur

Studium

1996 -2002	Friedrich Schiller Universität Jena Abschluss: Diplom-Trophologin
------------	--

Wissenschaftliche Tätigkeit

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

Berufliche Tätigkeit

Seit 05/2006	Lehrerin am Staatlichen Berufsschulzentrum Hermsdorf
--------------	--

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.