

Aus der Medizinischen Klinik m. S. für Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Kardioprotektive Eigenschaften der Teepolyphenole
Epigallocatechin-3-gallat und Theaflavin-3,3'-digallat**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexandra Katrin Hertha Kehrer

aus Backnang

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. V.Stangl
2. Priv.-Doz. Dr. med. R. Dechend
3. Priv.-Doz. Dr. habil. V.Böhm

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhalt

1 Einleitung	6
1.1 Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen	6
1.2 Oxidativer Stress und seine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen	7
1.2.1 Arteriosklerose	7
1.2.2 Myokardinfarkt und Reperfusionsschaden	8
1.2.3 Herzinsuffizienz	9
1.3 Zellreaktionen auf oxidativen Stress	9
1.3.1 Antioxidative Enzyme	9
1.3.2 Antioxidantien	10
1.3.3 Signaltransduktion	10
1.3.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	11
1.3.3.2 Akt-Signalkaskade	11
1.4 Regionale Unterschiede in der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen	11
1.5 Grüner und schwarzer Tee – ein kurzer Überblick	12
1.5.1 Wirkungsspektrum der Catechine	14
1.5.2 Wirkungsspektrum der Theaflavine	17
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Zellpräparation und -kultur	19
2.1.1 Materialien	19
2.1.2 Durchführung	20
2.2 Oxidatives Stressmodell und LDH-Assay	21
2.2.1 Materialien	21
2.2.2 Durchführung	22
2.3 Zellyse	23
2.3.1 Materialien	23
2.3.2 Durchführung	24

2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.4.1	Materialien	24
2.4.2	Durchführung	25
2.5	Western Blots	25
2.5.1	Materialien	25
2.5.2	Durchführung	27
2.6	RNA-Präparation und RT-PCR-Analyse	29
2.6.1	Materialien	29
2.6.2	Durchführung	30
2.7	Bestimmung der intrazellulären ROS mittels Durchflusszytometrie	31
2.7.1	Materialien	31
2.7.2	Durchführung	31
2.8	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	EGCG und TF3 schützen vor oxidativem Stress	33
3.2	Antioxidative Enzyme spielen keine Rolle in der Teepolyphenol- vermittelten Kardioprotektion	36
3.2.1	Expression antioxidativer Enzyme	36
3.2.2	Inhibition der RNA- und Proteinsynthese sowie von HO-1 hat kei- nen Einfluss auf die Teepolyphenol-vermittelte Kardioprotektion	38
3.2.2.1	Inhibition der Hämoxigenase-1	38
3.2.2.2	Inhibition der RNA-Synthese	39
3.2.2.3	Inhibition der Proteinsynthese	40
3.2.2.4	Lösungsmittelkontrolle	41
3.3	Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden durch EGCG und TF3	42
3.4	Reduktion der intrazellulären ROS-Konzentration durch EGCG und TF3	46
4	Diskussion	48
4.1	Polyphenole schützen vor oxidativem Stress	48
4.1.1	EGCG vermittelt Kardioprotektion	48
4.1.2	Einfluss von EGCG auf andere Zelltypen	49

	Inhalt
4.1.3 TF3 vermittelt Zytoprotektion vor oxidativem Stress	50
4.2 Expression antioxidativer Enzyme	50
4.2.1 EGCG induziert die Hämoxygenase-1	50
4.2.2 Einfluss von TF3 auf die Expression antioxidativer Enzyme	51
4.3 EGCG und TF3 aktivieren Signalkaskaden	52
4.4 Induktion der Expression antioxidativer Enzyme und Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden spielen keine wesentliche Rolle in der Polyphenol-vermittelten Kardioprotektion	53
4.5 EGCG und TF3 reduzieren intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies	54
4.6 Antioxidative Eigenschaften der Teepolyphenole <i>in vivo</i>	56
4.7 Ausblick	57
5 Zusammenfassung	58
Anhang	60
Abkürzungsverzeichnis	60
Literaturverzeichnis	62
Danksagung	74
Lebenslauf	75
Publikationsliste	77
Erklärung an Eides Statt	78

1 Einleitung

1.1 Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen

Zu der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen (CVD, für engl. *cardiovascular diseases*) gehören unter anderem die koronare Herzkrankheit (KHK) sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen wie z. B. zerebrovaskuläre Insulte. Im Jahr 2003 verstarben Schätzungen zufolge weltweit 16,7 Millionen Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung, was einem Anteil von 29,2% aller globalen Todesfälle entspricht. Als Trend zeichnet sich ab, dass auch in Entwicklungsländern die kardiovaskulären Krankheiten zunehmen und im Jahr 2010 Haupttodesursache sein werden (World Health Report 2003).

Schädliche Lebens- und Genussgewohnheiten, wie zum Beispiel vermehrter Tabakkonsum, Übergewicht (de Koning *et al.* 2007) und verminderte körperliche Aktivität, stehen mit dem Anstieg der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen in engem Zusammenhang, da diese Gewohnheiten zur Entwicklung von Risikofaktoren (z. B. arterieller Hypertonus, Dyslipoproteinämie, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2) führen (Rahman Al-Nuaim 1997).

Von 16,7 Millionen Todesfällen pro Jahr sind 7,2 Millionen Todesfälle der koronaren Herzkrankheit zuzuordnen, 5,5 Millionen den zerebrovaskulären Erkrankungen und weitere 3,9 Millionen sind Folge anderer Herzerkrankungen (World Health Organization, Cardiovascular Disease: prevention and control). Im Jahr 2004 war die häufigste Todesursache in Deutschland die chronische ischämische Herzkrankheit, gefolgt vom akutem Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz auf den Plätzen 2 und 3 (statistisches Bundesamt, Gesundheitswesen 2004).

Insgesamt verstarben im Jahr 2004 in Deutschland 36.803 männliche Patienten an einem akuten Myokardinfarkt. Auch bei Frauen fand sich eine hohe Mortalitätsrate. 30.346 verstarben an den Folgen eines Herzinfarkts. Somit belegte der akute Myokardinfarkt Platz 3 der Todesursachen aller weiblicher Patienten (statistisches Bundesamt, Gesundheitswesen, 2004).

Diese Zahlen unterstreichen – trotz der therapeutischen Erfolge der vergangenen Jahrzehnte – die Bedeutung der Suche nach neuen Ansätzen, die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen zu verringern und ihre Therapien weiter zu verbessern.

1.2 Oxidativer Stress und seine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen

In der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen spielt oxidativer Stress, der durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, für engl. *reactive oxygen species*) verursacht wird, eine entscheidende Rolle.

Ein freies Radikal ist Träger eines oder mehrerer ungepaarter Elektronen. Sie entstehen aus nichtradikalen Atomen durch Zugewinn oder Verlust eines Elektrons und sind ausgesprochen reaktionsfreudig. *In vivo* handelt es sich dabei meist um Sauerstoffmoleküle, die z. B. in Superoxidradikale (O_2^-) oder Stickstoffmonoxid (NO) umgewandelt werden (Davies 1995). Wichtige Zwischenprodukte sind Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit ($ONOO^-$), die nicht im klassischen Sinne freie Radikale, aber ebenfalls sehr reaktiv sind und ähnliche schädigende Auswirkungen auf Moleküle der Zelle haben. Als Überbegriff wird der Ausdruck reaktive Sauerstoffspezies benutzt.

Freie Radikale fallen unter physiologischen Bedingungen in der Atmungskette in den Mitochondrien im Rahmen der ATP-Produktion (Szasz *et al.* 2007), bei Reaktionen, die von den Enzymen Xanthinoxidase, Lipoxygenase/Cyclooxygenase und NO-Synthetase (Madamanchi *et al.* 2005) katalysiert werden und bei der Autooxidation physiologischer Substanzen (z.B. Katecholamine) an. Ihre Schädlichkeit erklärt sich aus der hohen Reaktionsfreudigkeit der ROS. Sie nehmen Elektronen anderer Zellmoleküle, z. B. von Lipiden, Proteinen und DNA, auf (Valko *et al.* 2006).

Lipidperoxidation führt zu Schäden an der Zellmembran (Tavazzi *et al.* 1998). Veränderung an Proteinstrukturen kann zu Funktionsverlusten (Dean *et al.* 1991) oder Proteolyse führen. Reaktionen mit der Zell-DNA ziehen eine erhöhte Brüchigkeit derselben nach sich.

1.2.1 Arteriosklerose

Ein vermehrtes Vorkommen von ROS in Gefäßen führt zu Apoptose und Nekrose der Endothelzellen (Burlacu *et al.* 2001), Proliferation von glatten Muskelzellen (Roa *et al.* 1992) und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (Rajagopalan *et al.* 1996). Daraus resultiert eine verstärkte Entstehung von Arteriosklerose. Die Relevanz dieses Pathomechanismus unterstreichen Studien, die zeigen konnten, dass durch Gabe des Antio-

xidans α -Tocopherol eine Restenosierung von Koronararterien nach Angioplastie verhindert werden konnte (Lafont *et al.* 1995; Lee *et al.* 1996).

1.2.2 Myokardinfarkt und Reperfusionsschaden

Als Myokardinfarkt bezeichnet man eine ischämische Nekrose des Herzmuskels, der meist ein akuter Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien zugrunde liegt. Diagnostisch spielen neben erhöhten kardialen Enzymen im peripheren Blut, pathologische Q-Wellen, sowie ST-Strecken-Hebungen oder -Senkungen im EKG als Indikator einer Ischämie eine wichtige Rolle (Agewall *et al.* 2005).

Circa 30% aller Patienten versterben an einem akuten Herzinfarkt, mehr als die Hälfte davon noch vor Erreichen des Krankenhauses. Im Krankenhaus versterben 10% aller Herzinfarktpatienten, weitere 10% im ersten Jahr nach dem Infarktereignis (Fenton *et al.* 2006).

Grundsätzlich stehen zwei Therapieformen zur Verfügung, um eine baldige Reperfusion zu ermöglichen: PTCA (perkutane transluminare Koronarangioplastie) mit eventueller Stent-Implantation oder eine medikamentöse fibrinolytische Therapie. Keeley und Boura analysierten 23 Studien, die sich mit o.g. Therapieformen und den Überlebenschancen im Falle eines akuten Myokardinfarkts befasst hatten. Die PTCA zeigte sich der thrombolytischen Therapie in Kurzzeit- und Langzeitüberleben überlegen (Keeley *et al.* 2003). Im Rahmen der Reperfusion kommt es allerdings zum sogenannten Reperfusionsschaden, der für das Herz eine zusätzliche Belastung bedeutet (Buja 2005). Es wird angenommen, dass es während der Ischämiephase des akuten Infarktgeschehens zu einer ersten Akkumulation von ROS aus Mitochondrien kommt. In der anschließenden Reperusionsphase folgt dann eine Überschwemmung des Herzmuskels mit ROS (Becker 2004), was zu Arrhythmien, reversibler kontraktiler Dysfunktion (sog. „Stunning“), Apoptose und Nekrose führen kann (Bolli 1991).

Ebenso kommt es zu Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die ebenfalls am Ischämie/Reperfusionsschaden beteiligt sind (Lee *et al.* 2001). Desweiteren induzieren ROS über Signalkaskaden direkt Apoptose (Maulik *et al.* 1998).

1.2.3 Herzinsuffizienz

ROS sind auch an der Entstehung von Herzinsuffizienz beteiligt (Byrne *et al.* 2003; Nojiri *et al.* 2006).

Die Aktivität der Calcium-ATPase und die Adrenorezeptorsensitivität sind unter dem Einfluss der ROS herabgesetzt (Qin *et al.* 2006), was zu einem Kontraktilitätsverlust der Kardiomyozyten führt. Eine vermehrte Produktion von ROS in den Mitochondrien führt zudem zu Schäden an der Mitochondrien-DNA der Kardiomyozyten und zu Zellschäden. Außerdem aktivieren ROS Metalloproteinasen und fördern somit eine Hypertrophie der Kardiomyozyten, Zellapoptose und interstitielle Fibrosierung (Tsutsui 2006).

1.3 Zellreaktionen auf oxidativen Stress

Die Zelle hat verschiedene Verteidigungssysteme, um sich vor oxidativem Stress zu schützen. Bei Überproduktion von ROS werden diese Verteidigungsmechanismen allerdings überlastet und es kommt zur Zellschädigung.

1.3.1 Antioxidative Enzyme

Als endogene Verteidigungsmechanismen sind die Enzyme Superoxiddismutase-1 (SOD1), Katalase, Glutathionperoxidase und Hämoxxygenase-1 (HO-1) zu nennen (Abbildung 1).

Die Glutathionperoxidase oxidiert zwei Glutathionmoleküle zu Glutathiondisulfid und Wasser und reduziert somit H_2O_2 und freie Radikale. Die Superoxiddismutase reduziert Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid, das dann wieder in eine Reaktion mit Glutathion eintritt.

Das Enzym Katalase sorgt für die Umwandlung von zwei Molekülen H_2O_2 in H_2O und Sauerstoff. Die Hämoxxygenase oxidiert Hämoglobin zu Biliverdin (Zhang *et al.* 2002). Dabei entstehen Kohlenmonoxid (CO) und Eisen (Fe^{2+}).

Die durch Häm, Toxine und Oxidantien ausgelöste Induktion von HO-1 wird durch den Transkriptionsfaktor NF-E2-related factor 2 (Nrf2) vermittelt. Fallen Häm, Toxine und Oxidantien an, wird Nrf2 vom Zytoplasma in den Nukleus transloziert und bindet dort an sogenannte *antioxidant response elements* (ARE) im HO-1-Promoter, was eine vermehrte Transkription zur Folge hat (Min *et al.* 2006). Dies führt zu einer gesteigerten Expression der HO-1, was zu einer Verminderung von oxidativem Stress führt.

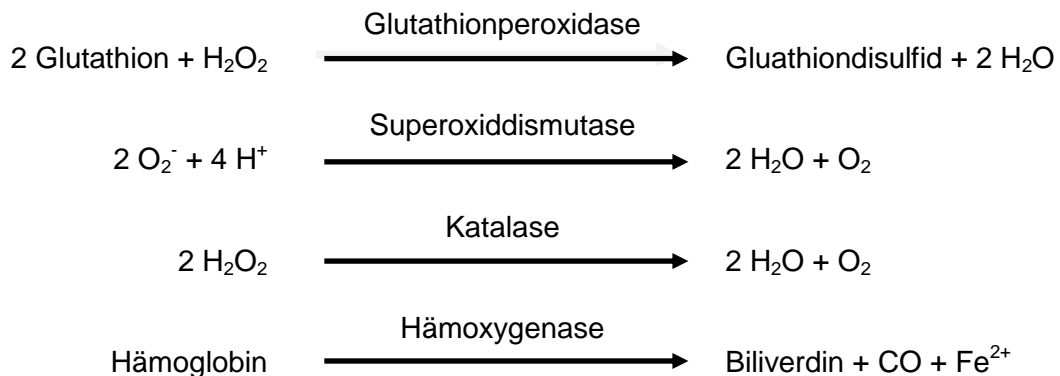


Abbildung 1: Die wichtigsten antioxidativen Enzymreaktionen der Zelle

1.3.2 Antioxidantien

Die Vitamine A, C und E sind wichtige exogen zugeführte biologische Antioxidantien. Sie sind ebenfalls Reduktionsmittel, übertragen also ein Elektron auf die ROS. Dies führt zu einer Herabsetzung der Reaktivität der ROS und ihrer schädigenden Wirkung. Die Fähigkeit, Elektronen aufzunehmen, ohne dabei selbst ein reaktives Molekül zu werden, wird als Scavengerfähigkeit von Antioxidantien bezeichnet (Diplock *et al.* 1998).

1.3.3 Signaltransduktion

Kommt es zu einer deutlich vermehrten Produktion von ROS, kann die Zelle sich nicht mehr ausreichend gegen diesen oxidativen Stress verteidigen (Sahnoun *et al.* 1997). Die Reaktion erfolgt abhängig vom Zelltyp mit Proliferation, Wachstumsstopp, Zellalterung oder Apoptose. Sie hängt von der Balance intrazellulärer Signalkaskaden ab, die im Falle des oxidativen Zellstress ablaufen. Signalkaskaden stellen eine Verbindung zwischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und Transkriptionsfaktoren im Nukleus her (Bost *et al.* 2005). Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über zwei Signaltransduktionskaskaden gegeben werden, die eine wichtige Rolle bei oxidativem Zellstress spielen.

1.3.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Einer der wichtigsten Signalwege läuft über die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Es handelt sich hierbei um Serin/Threoninkinasen, die in drei Untergruppen eingeteilt werden: ERK (für engl. *extracellular signal-regulated kinases*), JNK (für engl. *c-Jun N-terminal kinases*) und p38-Kinasen. Die beiden letzteren werden als JNK/SAPK (für engl. *stress-activated kinases*) zusammengefasst und durch ROS, UV-Strahlung, Hitzeschock-Proteine, zytotoxische Noxen und Zytokine aktiviert. Über mehrere Zwischenschritte bindet JNK an den Transkriptionsfaktor c-Jun und phosphoryliert diesen. Die p38-Kinase wird durch Zytokine, Endotoxine und osmotischen Stress aktiviert (Martindale *et al.* 2002).

Die ERK wird durch Rezeptorbindung verschiedener Wachstumsfaktoren (z. Bsp. EGF und PDGF) aktiviert. Es folgt eine kaskadenartige Aktivierung von RAS, RAF, MEK und schließlich der MAPK. Die phosphorylierten und aktivierten MAPK aktivieren ihrerseits Transkriptionsfaktoren (z. B. Fos, Jun, Myc), die die Expression der für die Zellteilung erforderlichen Gene veranlassen (Seeger *et al.* 1995).

1.3.3.2 Akt-Signalkaskade

Akt oder Proteinkinase B ist ebenfalls eine Serin/Threoninkinase und zentrales Element der antiapoptotischen Akt-Signalkaskade. Sie ist entscheidend für das Überleben der Zelle. Die Signalkaskade wird durch Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Signale und oxidativen Stress ausgelöst. Die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) phosphoryliert membrangebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂); es entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃). Akt wird an PIP₃ gebunden und kann nun durch PDK-1 (für engl. *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) phosphoryliert und aktiviert werden. Im aktivierten Zustand kann Akt proapoptotische Faktoren deaktivieren. Hierzu gehören z.B. BAD, Caspase-9 und Forkhead-Transkriptionsfaktoren (Datta *et al.* 1999).

1.4 Regionale Unterschiede in der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen

Die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen unterliegt großen regionalen Unterschieden. So konnte eine vergleichende Studie über die Unterschiede der Arterioskleroseentwicklung bei Japanern und Amerikanern zwischen 15 und 34 Lebensjahren, die zwischen 1987 und 1995 autopsiert wurden, zeigen, dass Japaner bis zur zweiten Le-

bensdekade subendotheliale Schaumzellablagerungen in den Arterien (sog. *fatty streaks*) entwickeln, dieser Prozess dann allerdings zum Stillstand kommt. Bei der amerikanischen Gruppe hingegen fand sich eine kontinuierliche Zunahme arteriosklerotischer Läsionen mit größerem Ausmaß und schnellerer Entwicklung (Takei *et al.* 2005). Eine Vergleichsstudie über Ernährungsgewohnheiten, Serumlipidwerte und Mortalität zwischen Japanern, Nordamerikanern und in Nordamerika lebenden Japanern erbrachte eine viermal höhere Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen in den USA als in Japan. US-Amerikaner und in den USA lebende Japaner zeigten vergleichbare arteriosklerotisch verdickte Media- und Intimaschichten der Aa. carotis. Der zunehmend dem Westen angepasste Lebensstil, der auch in Asien Einzug hält, könnte in Zukunft dort zu einer Zunahme der Inzidenz kardiovaskulärer Krankheiten führen (Egusa *et al.* 2004).

Als möglicher Grund für die verschiedenen Inzidenzraten kardiovaskulärer Erkrankungen wird der deutlich höhere Konsum grünen Tees in Asien diskutiert (Park *et al.* 2003).

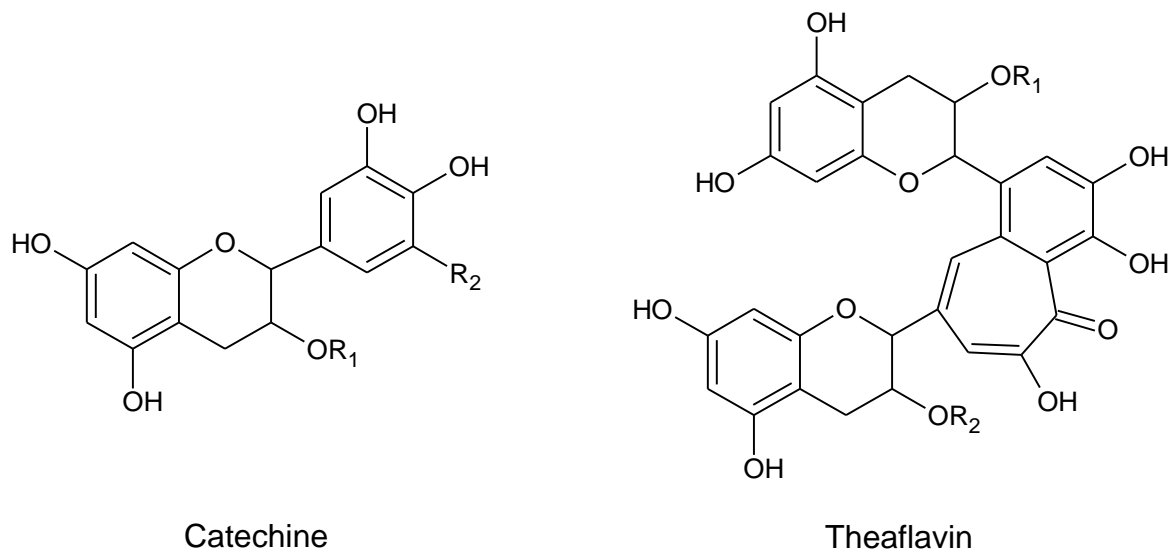
1.5 Grüner und schwarzer Tee – ein kurzer Überblick

Tee ist nach Wasser das am häufigsten konsumierte Getränk der Welt (Peters *et al.* 2001). Teesorten, die aus der Pflanze *Camellia sinensis* (Teepflanze) gewonnen werden, werden anhand ihrer Fermentationsgrade eingeteilt. Grüner Tee ist unfermentiert, Oolong Tee ist teilweise und schwarzer Tee vollständig fermentiert. In der westlichen Welt wird bevorzugt schwarzer Tee und in Asien hauptsächlich grüner Tee konsumiert (Park *et al.* 2003).

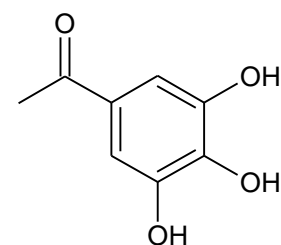
Bei der Trocknung werden die Teeblätter einem Oxidationsprozess, der sogenannten Fermentation, unterzogen. Um Fermentation zu vermeiden, werden die frisch gepflückten Blätter des grünen Tees bedampft. Grüner Tee enthält zahlreiche Catechine, welche innerhalb der Phytamine zur Gruppe der Polyphenole und darunter zu den Flavonoiden gehören. Die Catechine des grünen Tees sind Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) (Abbildung 2).

Die Blätter des schwarzen Tees hingegen werden getrocknet und gerollt, um den Fermentationsprozess in Gang zu setzen. Eine aktive Polyphenoloxidase in den Teeblättern katalysiert dabei die aerobe Oxidation der monomeren Catechine, die nun teilweise polymerisiert und zu Theaflavinen und Thearubiginen umgewandelt werden (Graham

1992). Schwarzer Tee enthält hauptsächlich die Theaflavine Theaflavin (TF1), Theaflavin-3-gallat (TF2a), Theaflavin-3'-gallat (TF2b) und Theaflavin-3,3'-digallat (TF3) (Lin *et al.* 2006) (Abbildung 2).



	R1	R2
Epicatechin (EC)	H	H
Epigallocatechin (EGC)	H	OH
Epicatechin-3-gallat (ECG)	G	H
Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)	G	OH
Theaflavin (TF1)	H	H
Theaflavin-3-gallat (TF2a)	H	G
Theaflavin-3'-gallat (TF2b)	G	H
Theaflavin-3,3'-digallat (TF3)	G	G



Gallatgruppe (G)

Abbildung 2: Strukturformeln der Teepolyphenole (Stangl *et al.* 2007)

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei regelmäßigem Teekonsum geringer ist (Imai *et al.* 1995; De Bacquer *et al.* 2006). Als Ursache hierfür wird die Aufnahme von Teepolyphenolen diskutiert. Allerdings gibt es auch Studien, die keine oder negative Effekte des Teekonsums nachwiesen (Rimm *et*

al. 1996). In einer Metaanalyse, die positive und negative Studien einschloss, wurde eine circa 11%ige Reduktion des Risikos, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu erkranken, bei einem täglichen Teekonsum von drei Tassen (711 ml/d) ermittelt (Peters *et al.* 2001). Um die Studien allerdings besser interpretieren zu können, ist es notwendig, auch andere Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, denen der Teekonsument ausgesetzt ist, mit einzubeziehen.

Das Interesse an der Wirkungsweise der Teepolyphenole hat enorm zugenommen. Besonders die Teepolyphenole EGCG aus dem grünen Tee und TF3 aus dem schwarzen Tee stehen im Mittelpunkt der Forschung, wobei ihre Wirksamkeit teilweise kontrovers diskutiert wird (Cheng 2006).

1.5.1 Wirkungsspektrum der Catechine

In Japan werden durchschnittlich 7 bis 8 Tassen (740 ml) grünen Tees pro Person und Tag konsumiert, was einer Menge von 413 mg Catechinen entspricht (Miura *et al.* 2001).

EGCG macht mit ungefähr 11% des Trockengewichts den größten Anteil an den Catechinen im grünen Tee aus (Dufresne *et al.* 2001). Es scheint auch das Catechin mit dem breitesten und effektivsten Wirkungsspektrum zu sein. Ihm werden zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. So wirkt es antioxidativ, antiinflammatorisch, antihyperton, antidiabetogen und antikanzerogen (Stangl *et al.* 2007).

Eine wichtige Eigenschaft des EGCG ist seine direkte antioxidative Wirkung als ROS-Scavenger. Die Reaktionsrate von EGCG mit Hydroxylradikalen hat sich als wesentlich höher herausgestellt als die anderer anerkannter Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure, reduziertes Glutathion und Cystein) (Shi *et al.* 2000).

Zu EGCG und seiner Rolle als ROS-Scavenger gibt es in der Literatur allerdings gegensätzliche Daten. Teepolyphenole können selbst oxidiert werden und dieser Prozess führt zur Bildung aktiver radikaler Sauerstoffmoleküle. Der pro-oxidative Prozess findet unter Standardbedingungen (pH 7,4; 100 µmol/l Teepolyphenole; 200 µmol/l O₂) hauptsächlich an der Gallat-Gruppe statt. Eine einstündige Inkubation grünen Tees bei einem pH-Wert von 7,5 unter aeroben Bedingungen führt aufgrund des Autooxidationsprozesses zu einem erheblichen Abfall des EGCG-Anteils (Roginsky *et al.* 2005).

Neben seiner Scavengerfähigkeit greift EGCG auch auf transkriptioneller Ebene in Zellprozesse ein. So zeigten Wu *et al.* die Induktion des antioxidativen Enzyms Hämoxxygenase-1 in Endothelzellen über die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt- und ERK-Signalkaskaden. EGCG induzierte zudem den antioxidativen Transkriptionsfaktor Nrf2 und somit Gene, deren Promotoren *antioxidant response elements* enthalten (Wu *et al.* 2006).

Auf oxidativ gestresste neuronale N18D3-Zellen zeigte EGCG in einer weiteren Studie ebenfalls eine zytoprotektive Wirkung, die durch Blockierung des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signalweg aufgehoben werden konnte (Koh *et al.* 2003).

In Experimenten mit Apoprotein E-defizienten Mäusen zeigte die Gabe von Teecatechinen einen positiven Einfluss auf die Entwicklung einer Arteriosklerose. Eine kontinuierliche Catechinaufnahme über 14 Wochen reduzierte die Ablagerung von Cholesterol und Triglyzeriden im Aortenbogen und verringerte atheromatöse Formationen in der Aorta, ohne dabei die Konzentration der Plasmalipide zu senken (Miura *et al.* 2001).

Die Endothelfunktion spielt bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle. Verschiedene Risikofaktoren, z. B. Dyslipidämie, Tabakkonsum, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, führen zu einer pathologischen Veränderung des Endothels, was zu einer Dysfunktion mit herabgesetzter Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion, Dysregulation von Fibrinolyse und inflammatorischen Prozessen führt. Als Folge erhöht sich das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Raij 2006).

In einer Vergleichsstudie zwischen gesunden Rauchern und Nichtrauchern wurde der Blutfluss nach einer künstlich erzeugten Minderdurchblutung des Oberarms gemessen. Raucher zeigten als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion eine signifikant geringere Perfusion während der Phase der reaktiven Hyperämie. Nach oraler Aufnahme von grünem Tee erhöhte sich der Blutfluss signifikant und die Ergebnisse sprechen dafür, dass Catechine die Endothelium-abhängige Vasodilatation bei Rauchern verbessert (Nagaya *et al.* 2004).

In unserem Labor konnte nachgewiesen werden, dass EGCG über eine Signalkaskade, die von der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, der cAMP-abhängige Proteinkinase und Akt abhängig ist, die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) aktiviert und somit die Stickstoffproduktion induziert, was zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen der Blutgefäße führt (Lorenz *et al.* 2004). Untersuchungen an aortalen glatten Gefäßmuskelzellen

der Ratte zeigten zudem, dass EGCG den *platelet-derived growth factor* (PDGF) induziert und in diesen Zellen eine Aktivierung der MAP Kinase inhibiert. Dies stellt eine weitere mögliche Erklärung für die antiarteriosklerotischen und antikarzinogenen Effekte des EGCG dar (Ahn *et al.* 1999). Der inhibierende Effekt von EGCG auf die MAP Kinasen wurde auch in einer Studie, die sich mit TNF α -induzierter Expression von Galactose- α 1,4-Galactose- β 1,4-Glucose-Ceramid humaner intestinaler Epithelzellen HT29 beschäftigt, gezeigt. EGCG verhinderte hier die Expression durch Inhibition der Signalwege der MAPK und NF κ B (Moon *et al.* 2005).

Ebenfalls konnte in einer umfangreichen Studie zum Thema Teekonsum und Bluthochdruckrisiko gezeigt werden, dass ein Teekonsum von 120 ml/d über ein Jahr das Risiko, einen Hypertonus zu entwickeln, senkt (Yang *et al.* 2004).

EGCG wurde auch auf antithrombotische Eigenschaften untersucht. Intraperitoneale Injektion von Catechinen in Ratten resultierte dabei in einer verlängerten Blutungszeit. Die Plättchenaggregation von Humanblut *ex vivo* zeigte sich unter dem Einfluss von EGCG inhibiert, wohingegen die Koagulationsparameter unbeeinflusst blieben (Kang *et al.* 1999).

Auch ein antidiabetogener Effekt von EGCG auf H4IIE Hepatomazellen der Ratten konnte experimentell nachgewiesen werden. EGCG unterdrückte die Genexpression von Phosphoenolpyruvatcarboxykinase und Glukose-6-Phosphatase – Enzymen der Glukoneogenese – durch Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). In der Folge verringerte sich die Glukoseproduktion der Zellen unter dem Einfluss von EGCG (Waltner-Law *et al.* 2002).

Die Glukosetoleranz gesunder Erwachsener verbessert sich nach Konsum gelösten grünen Tees und Gabe frischer Teeblätterextrakte. Untersuchungen an Streptocin-diabetischen ddY-Mäusen und diabetischen db+/db+ Mäusen zeigten, dass der Blutzuckerspiegel der Mäuse innerhalb von 2-6 Stunden nach oraler Aufnahme grünen Tees ohne Erhöhung des Seruminsulinspiegels signifikant gesenkt wurde. Der insulinunabhängige antidiabetogene Effekt wurde von den Autoren der Studie auf eine Verminderung des 4211(4212) Da Proteins zurückgeführt (Tsuneki *et al.* 2004).

Auch zeigte sich in zahlreichen Studien eine antikarzinogene und antimutagene Wirkung des grünen Tees. Dies hängt zum einen mit seiner Fähigkeit zusammen, direkt

antioxidativ zu wirken und der damit verbundenen Verminderung von oxidativem Stress. Zum anderen können Catechine, insbesondere EGCG, weitere Signalkaskaden der Zelle beeinflussen (Park *et al.* 2003).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die lokale Applikation von EGCG das Risiko einer UVB-induzierten Entwicklung von Hautkrebs bei haarlosen SKH-1-Mäusen signifikant senken kann und zu vermehrter Apoptose in Hauttumoren führt (Lu *et al.* 2002).

1.5.2 Wirkungsspektrum der Theaflavine

Theaflavin-3,3'-digallat (TF3) ist der Hauptvertreter der Theaflavine des schwarzen Tees und zeigt, ebenso wie EGCG, ein breites Wirkspektrum. Allerdings wurde den Theaflavinen bis dato weniger Aufmerksamkeit geschenkt als den Catechinen des grünen Tees. In diesem Kapitel werden einige Studien der letzten Jahre kurz dargestellt.

Auch die Theaflavine haben antioxidative Eigenschaften. Die Fähigkeit der einzelnen Theaflavine als Scavenger freier Radikaler, die Hemmung der Degradation von Desoxyribose durch Eisen und Kupfer-vermittelte Oxidation von LDL zu vermindern, wurde untersucht und miteinander verglichen. TF3 zeigte dabei die höchste antioxidative Wirksamkeit gefolgt von Theaflavin-2b, Theaflavin-2a und Theaflavin-1 (Miller *et al.* 1996). In einem direkten Vergleich der antioxidativen Fähigkeit grünen und schwarzen Tees anhand eines LDL-Oxidationsmodells zeigte TF3 von allen Teepolyphenolen, EGCG eingeschlossen, die höchste antioxidative Fähigkeit (Leung *et al.* 2001).

Der Konsum schwarzen Tees hat positive Auswirkungen auf die Endothelfunktion *in vivo*. Bei 50 Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde der Diameter der Arteria brachialis jeweils vor und nach einmaligem oder regelmäßigem Teekonsum mittels Ultraschall gemessen. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Tee-vermittelte Verbesserung der Endothelfunktion mit gesteigertem Blutfluss. Blutdruck, Serumglukosespiegel und Serumlipidspiegel blieben jedoch unverändert (Vita 2003). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Polyphenole des schwarzen Tees die Aktivität der eNOS in bovinen Endothelzellen erhöhen. Diese Erhöhung beruht auf einer Aktivierung der p38- und Akt-signal-kaskaden über einen Östrogenrezeptor-abhängigen Signaltransduktionsweg (Anter *et al.* 2005).

TF3 hat ebenfalls antikanzerogene Effekte. So führt es über die Hemmung von RAF-1 zu einer Verminderung von phosphoryliertem MEK1 und ERK1/2 in H-ras-

transformierten epidermalen Zellen der Maus. Dies hatte eine Unterbrechung der Signaltransduktion zwischen Zellplasma und Nukleus der entarteten Zellen zur Folge (Chung *et al.* 2001).

Die antiproliferative Wirkung von TF3 auf humane epidermale A431-Karzinomzellen und NIH3T3-Fibroblasten der Maus wurde in einer weiteren Studie auf eine Hemmung der Autophosphorylierung der *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptoren, wodurch EGF daran gehindert wird, an seinen Rezeptor zu binden, zurückgeführt. Im Vergleich von TF3 und EGCG zeigte sich TF3 potenter in der Hemmung als EGCG (Liang *et al.* 1999).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war zunächst die Etablierung eines oxidativen Stressmodells in Herzmuskelzellen. In diesem sollte anschließend untersucht werden, ob EGCG und TF3 – Polyphenole aus dem grünen und schwarzen Tee – in der Lage sind, Kardiomyozyten vor oxidativem Stress zu schützen. Zudem galt es der Frage nachzugehen, welche Mechanismen einer möglichen Polyphenol-vermittelten Kardioprotektion zugrunde liegen. Hierfür sollten mittels Western Blots und RT-PCR die Phosphorylierung antiapoptotischer Signalkaskaden und die Expression antioxidativer Enzyme untersucht werden. Zusätzlich sollten Inhibitoren, die verschiedene Verteidigungsmechanismen der Zellen gegen oxidativen Stress hemmen, verwendet werden. Den Einfluss der Polyphenole auf die intrazelluläre ROS-Konzentration sollte mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellpräparation und -kultur

2.1.1 Materialien

- CMF-HBSS, Hanks balancierte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium GibcoBRL Life Technologies
- L-15 (Leibovitz) Medium mit L-Glutamin und L-Aminosäuren GibcoBRL Life Technologies
- Medium M199 mit 1,25 g/l NaHCO₃, L-Glutamin und L-Aminosäuren GibcoBRL Life Technologies
- NBCS, Serum neugeborener Kälber, 30 min bei 56°C inaktiviert GibcoBRL Life Technologies
- Trypsin-EDTA in HBSS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ GibcoBRL Life Technologies
- Trypsin-Inhibitor (Sojabohne, 2 mg/ml in HBSS) Cell Systems
- Worthington Kollagenase Typ 2 (215 U/g), 70 mg in 50 ml L-15 Medium Cell Systems
- Fibronectin (10 µg/ml, gelöst in H₂O mit 0,2% Gelatine) Promocell
- Trypanblau, 0,4% in PBS ICN Biochemicals
- Zellsieb, 70 µm, Nylon Falcon
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml Falcon
- Zellkulturschale, 20 x 100 mm Falcon
- Zellkulturflasche, 750 ml, 175 cm² Falcon
- Zellkulturplatte, 6 Vertiefungen, Flachboden, 9,6 cm² Wachstumsfläche Falcon
- Wasserbad 1092 GFL
- Zentrifuge 5810R Eppendorf
- Laminarbox LaminAir HBB 2448 Heraeus Instruments

- Function line CO₂-Inkubator Heraeus Instruments
- Mikroskop Axiovert 25 Zeiss
- PBS, Phosphat-gepufferte Salzlösung:
 - 137 mmol/l NaCl
 - 2,7 mmol/l KCl
 - 4,3 mmol/l Na₂HPO₄
 - 1,4 mmol/l KH₂PO₄
 - pH 7,3 (HCl)

2.1.2 Durchführung

Sämtliche Zellkulturen wurden aus Kardiomyozyten 2-3 Tage alter Wistarratten angelegt. Als Standardmedium diente Medium M199 mit einem Zusatz von 0,1 mg/ml Penicillin-Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Um einer Kontamination vorzubeugen, wurde an einer Werkbank mit laminarer Luftströmung gearbeitet.

Die 2-3 Tage alten Wistarratten wurden durch zervikale Diskolation getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert und anschließend thorakotomiert. Nach Entnahme der Herzen wurden die großen Gefäße und Atrien entfernt. Die verbleibenden Ventrikel wurden in eiskaltem HBSS gewaschen und mit dem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten. Die Herzstücke wurden nun für 24 Stunden in HBSS und 50 µg/ml Trypsin (für eine Anzahl von 10 Herzen pro Zellkulturschale wurden 9 ml HBSS und 1 ml Trypsin-EDTA verwendet) bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde dem Trypsin NBCS in gleicher Menge hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen.

Des Weiteren wurden 5 ml Kollagenase pro 10 ml HBSS/Trypsin-EDTA hinzugefügt und nun das gesamte Volumen in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C gelagert.

Durch wiederholtes Auf- und Niederpipettieren der Lösung in einer 10 ml-Pipette wurden die Ventrikelstückchen weiter zerkleinert. Die so entstandene Zellsuspension wurde anschließend durch ein 70 µm-Zellsieb filtriert und für sechs Minuten bei 700 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und nochmals bei 800 U/min für neun Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Medium M199 mit 10% NBCS und Pe-

nicillin-Streptomycin resuspendiert. Nach dem zweiten Zentrifugendurchgang wurde das Zellpellet mit 10 ml Medium M199 mit 10% NBCS und Penicillin-Streptomycin ebenfalls resuspendiert. Die nun entstandene Lösung wurde auf 15 cm-Schalen verteilt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände in einer Zellkulturflasche vereint.

Nach Abnahme und Durchmischen des Überstands wurden die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt. Dafür wurde einem 10 µl Aliquot Zellsuspension Trypanblau im Verhältnis 1:1 zugesetzt, um lebende von toten Zellen, die den Farbstoff inkorporieren, unterscheiden zu können und die Zellen zu zählen. Daraufhin wurden die Zellen in Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen (sechs 35 mm-Vertiefungen, 9,6 cm² Wachstumsfläche) mit einer Dichte von ~1000 Zellen/mm² (ca. 10⁶/Well) ausplattiert. Die Fibronectinbeschichtung der Zellkulturschalen erhöht die Anzahl der anwachsenden Kardiomyozyten. Nach 24 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und auf Medium M199 mit einem NBCS-Anteil von 5% umgestellt.

2.2 Oxidatives Stressmodell und LDH-Assay

2.2.1 Materialien

- CytoTox-One Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit Promega
- EGCG (50 µmol/l in Medium M199) Sigma-Aldrich
- TF3 (20 µmol/l in Medium M199) freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch die Mitsui Norin Food Research Laboratories, Japan
- H₂O₂ (100 µmol/l in H₂O) Sigma-Aldrich
- Zinn Protoporphyrin IX, SnPPIX (10 µmol/l) Frontier Scientific
- α-Amanitin (5 µg/ml) Sigma-Aldrich
- Cycloheximid, CHX (1 µg/ml) Sigma-Aldrich
- Wortmannin (100 mmol/l) Calbiochem
- PD98059 (50 µmol/l) Calbiochem

- SB203580 (50 $\mu\text{mol/l}$) Calbiochem
- Fluoreszenz-Reader Gemini EM Molecular Devices
- schwarze Platte mit 96 Wellvertiefungen Falcon

2.2.2 Durchführung

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym des Glukosestoffwechsels, das auch in Kardiomyozyten vorkommt. Anhand der Freisetzung von LDH, die sich mit einem katalytischen Assay bestimmen lässt, kann man das Ausmaß von Gewebeschäden, die zum Beispiel durch oxidativen Stress entstehen, ermitteln. In dem H_2O_2 -vermittelten Stressmodell wurden die Kardiomyozyten in verschiedene Gruppen eingeteilt: Kontrollgruppe, EGCG-Gruppe und TF3-Gruppe. In Vorversuchen wurden die optimalen Wirkungs Dosen der Polyphenole ermittelt. Für EGCG war dies 50 $\mu\text{mol/l}$ und für TF3 20 $\mu\text{mol/l}$.

Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich Medium M199. Die EGCG-Gruppe wurde mit zusätzlich 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG und die TF3-Gruppe mit 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3, behandelt. Die Zellen wurden nun für eine, vier, acht und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde eine Hälfte der drei Gruppen mit 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 für 30 Minuten inkubiert, um oxidativen Stress zu erzeugen. Die übrigen Zellen dienten als Kontrolle und erhielten lediglich Medium M199. Danach verblieben alle Zellen für 24 Stunden bei 37°C im Inkubator (Abbildung 3)

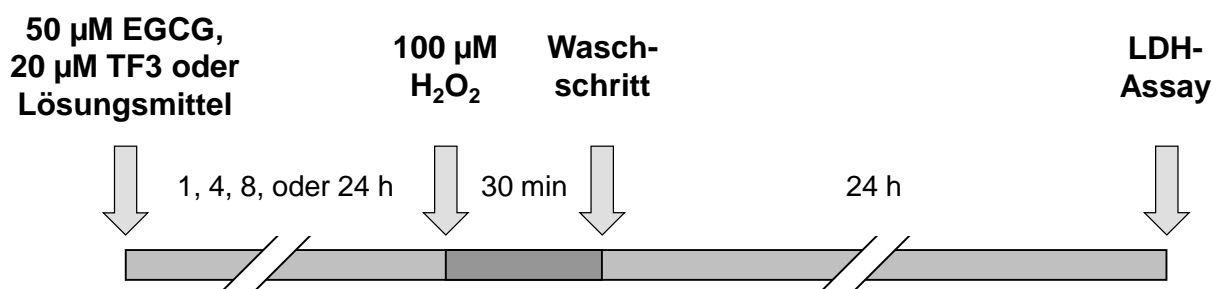


Abbildung 3: Oxidatives Stressmodell mit EGCG, TF3 und H_2O_2

Um die Bedeutung einer Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden und einer Induktion antioxidativer Enzyme zu untersuchen, wurde in Versuchsabläufen mit Inhibitoren der Hämoxigenase-1 (10 $\mu\text{mol/l}$ SnPPiX), der RNA Polymerase II (5 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin), der ribosomalen Proteinsynthese (1 $\mu\text{g/ml}$ CHX), der PI3K (100 nmol/l Wortmannin), der MEK 1 (50 $\mu\text{mol/l}$ PD98059) und p38 MAPK (50 $\mu\text{mol/l}$ SB203580) gearbeitet.

Die einzelnen Inhibitoren wurden als Vorbehandlung für 30 Minuten zu den Kardiomyozyten gegeben und in der Folge zusammen mit EGCG, TF3 und Medium M199 den Zellen nach jedem Waschschrift nochmals hinzugesetzt.

24 Stunden nach Entfernung des H_2O_2 wurden 100 μl Überstand des Zellmediums entnommen, in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert und 100 μl Substrat Mix aus dem CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity Kit zugesetzt. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 50 μl Stopplösung pro Well unterbrochen. Die LDH-Freisetzung wurde mit Hilfe des CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity Assay im Reader gemessen. Die Laktatdehydrogenase wandelt Laktat in Pyruvat um. Bei dieser Reaktion fällt NADH als Nebenprodukt an. Diese Tatsache macht man sich zunutze, indem man Resazurin und Diaphorase hinzugibt. NADH gibt H^+ an Resazurin ab, das daraufhin zu Resorufin wird, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Menge an fluoreszierendem Resorufin ist proportional der Menge an freigesetztem LDH.

2.3 Zellyse

2.3.1 Materialien

- Lysepuffer 2a (in 50 ml):
 - 1 ml 100 mmol/l NaCl
 - 1 ml 20 mmol/l Hepes
 - 5 ml 1% Triton X 100
 - 53 mg 4 mmol/l Natriumpyrophosphat
 - 1 ml 10 mmol/l EDTA
 - 10 μl 1 mmol/l Na_3VO_4
 - 10 μl 10 mmol/l NaF
 - 20 μl 50x Complete (Roche)
 - 1 μl 100 nmol/l Oxalacetat
 - 10 μl 1 mmol/l Pefablock

- M 199 Medium mit 1,25 g/l NaHCO₃, L-Glutamin und L-Aminosäuren mit 5% NBCS-Anteil GibcoBRL Life Technologies
- Trypsin EDTA GibcoBRL Life Technologies
- Zentrifugenröhrchen, 15 ml Falcon
- PBS, Phosphat-gepufferte Salzlösung
 - 137 mmol/l NaCl
 - 2,7 mmol/l KCl
 - 4,3 mmol/l Na₂HPO₄
 - 1,4 mmol/l KH₂PO₄
 - pH 7,3 (HCl)

2.3.2 Durchführung

Nachdem die LDH-Messungen abgeschlossen waren, wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen.

Im Anschluss wurden pro Vertiefung einer 6-Well-Platte 250 µl Trypsin hinzugefügt, damit sich möglichst alle Zellen vollständig von der Zellkulturschale ablösen, und die Schalen bei 37°C für fünf Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden 3 ml Medium M199 mit 5% NBCS-Anteil pro Schale zugesetzt. Die Flüssigkeit mit den abgelösten Zellen wurde vorsichtig in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei 1000 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und in 40 µl Lysepuffer 2a resuspendiert. Die Proben wurden nun bei -80°C eingefroren, um sie für die Proteinbestimmung weiterverwenden zu können.

2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.4.1 Materialien

- Coomassie Plus Protein Assay Pierce
- PS Microplatte 96 Well Greiner Labortechnik
- Bovines Serumalbumin (BSA) Sigma
- Photometer anthos htll anthos labtech instruments
- WinRead 2.0 anthos labtech instruments

2.4.2 Durchführung

Die Proteinkonzentrationen der Proben (Kontrollgruppe, EGCG-Gruppe, TF3-Gruppe) wurden nach der Methode von Bradford bestimmt. Nach Zentrifugation wurden die Überstände vorsichtig, ohne das Zellpellet zu beschädigen, abpipettiert. 2 µl Überstand wurden in 18 µl Aqua bidest. überführt und vermischt.

Von der neu entstandenen Lösung wurden 10 µl in Doppelwerten abgenommen und jeweils mit 200 µl Coomassie-Reagenz auf eine 96-Well Platte übertragen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben im Photoextinktiometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Protein und Coomassie-Reagenz bilden Komplexe, die konzentrationsabhängig zu einem Farbumschlag von dunkelgrün zu blau führen.

Eine Eichkurve wurde durch Messen von Proteinstandards aus bovinem Serumalbumin in einer Konzentration von 0,1-0,8 µg/µl ermittelt. Reines Coomassie diente als Blankwert. Mit Hilfe der Software WinRead 2.0 wurden die Proben gemessen und die Werte ermittelt.

2.5 Western Blots

2.5.1 Materialien

- Acrylamid (aus Acrylamid und Bisacrylamid), Rotiphorese Gel 29:1 (40%) Carl Roth GmbH &Co
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Serva Feinbiochemica
- TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Sigma
- APS, Ammoniumperoxydisulfat Sigma
- Proteinmarker, 6,5-175 kDa New England Biolabs
- Tischmixer Vortex-Genie 2 Scientific Industries
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorf
- Elektrophoresekammern Sigma-Aldrich Techware

- Elektrophorese Stromversorgungsgerät EPS 600 Pharmacia Biotech
- Roti-Block Carl Roth GmbH&Co.
- Blotkammer: Semi-Dry Transfer Cell Trans-Blot SD Bio-Rad
- Thermomixer 5437 Eppendorf
- Wippe Biometra WT12 Biometra
- Enhanced Chemiluminescence Lösung Amersham
- Film X-Omat Blue XB-1, 18 x 24 cm Kodak
- Entwicklermaschine Hyperprocessor Amersham
- Scanner ScanMaker 4 Mikrotek
- TBS, Tris-gepufferte Salzlösung:
 - 50 mmol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
 - 150 mmol/l NaCl
 - pH 7,4 HCl
- 5x SDS-Probenpuffer:
 - 60 mmol/l Tris pH 6,8
 - 25% Glycerol (Sigma)
 - 5% β -Mercaptoethanol (Serva)
 - 2% SDS
 - 0,1% Bromphenolblau (Serva)
- SDS-Laufpuffer:
 - 655 μ l 1 mol/l Tris-Cl
 - 1,13 ml 87% Glycerol
 - 2,3 ml 10% SDS
 - 500 μ l β -Mercaptoethanol
- Transferpuffer:
 - 20% Methanol
 - 2 mmol/l Tris
 - 15 mmol/l Glycin

- Waschpuffer: – 0,02% Tween 20 (Aldrich) in TBS
- Blockpuffer: – 5% Skim Milk (Difco)
– 0,01% Gelatine (Merck)
– 1% BSA (Sigma)
– 0,02% Tween 20 (Aldrich)
- Zweitantikörper: – anti-Maus und anti-Kaninchen Santa Cruz

2.5.2 Durchführung

Proteine lassen sich durch Western Blot-Analysen semiquantitativ nachweisen, indem sie auf eine Trägermembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern in Kontakt gebracht werden. Zu Beginn werden die Proteine durch Aufkochen denaturiert. Durch Zugabe von negativ geladenem Natriumdodezylsulfat (SDS), das sich proportional zum Molekulargewicht der Proteine an diese bindet, wird die Außenladung der Proteine ebenfalls negativ. Die Proteine können nun anhand ihrer Größe in einer Gelelektrophorese nach Laemmli durch Anlage eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Im Anschluss erfolgen die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) und der Nachweis mit spezifischen Antikörpern.

Die verwendete Acrylamidkonzentration wurde den Größen der nachzuweisenden Proteine angepasst, da sie den Vernetzungsgrad der Gele und damit auch die Laufeigenschaft der Proteine beeinflusst. Die Zusammensetzung der Gele zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

	10% Trenngel	Sammelgel
40% Acrylamid	1,6 ml	625 µl
1,5 mol/l Tris pH 8,8	1,95 ml	–
1 mol/l Tris pH 6,8	–	625 µl
H ₂ O	4,1 ml	3,65 ml
10% SDS	78,1 µl	50 µl
10% APS	62,5 µl	50 µl
TEMED	6,25 µl	5 µl

Die zu blottende Proteinmenge wurde in RIPA ad 20 µl gelöst. Im Anschluss wurden 5 µl 5x SDS-Probenpuffer hinzugegeben. Die Proben wurden im Thermocycler bei 95°C

fünf Minuten erhitzt und kurz zentrifugiert. Nach Abkühlen wurden sie in die Geltaschen pipettiert und pro Gel eine Spannung von 20 mA angelegt, um die Proben aufzutrennen. Im Anschluss wurden die Gele in Blotpuffer inkubiert und schließlich die aufgetrennten Gele auf eine Membran übertragen. Hierzu wurden eine PVDF-Membran und sechs Whatman-Papiere, die in ihrer Größe dem Gelformat angepasst wurden, verwendet. Die PVDF-Membran wurde eine Minute in Methanol, zwei Minuten in Aqua bidest. und fünf Minuten lang in Blotpuffer geschwenkt, um sie zu aktivieren. Die Whatman-Papiere wurden ebenfalls mit Blotpuffer benetzt. Die PVDF-Membran und das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurden auf jeder Seite zwischen jeweils drei Whatman-Papieren in die Blotkammer gelegt. Die auf dem Boden der Blotkammer liegenden Whatman-Papiere dienten als Anode, die oben liegenden Whatman-Papiere als Kathode. Dazwischen wurde ein elektrisches Feld mit einem konstanten Strom von 350 mA für anderthalb Stunden angelegt. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran bei 20°C für zwei Stunden in 10 ml Western Block-Puffer inkubiert. Der Block-Puffer enthält eine hohe Konzentration unspezifischer Proteine, die an freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran binden und somit eine unspezifische Bindung der Antikörper verhindern. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit den 1:500 in Blockpuffer gelösten Erstantikörpern (Tabelle 2) für 24 Stunden bei 4°C unter Schwenken inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran durch viermaligen Pufferwechsel in jeweils 10 ml Western Blot-Waschpuffer 40 Minuten lang gewaschen und anschließend eine Stunde lang auf einem Tischschüttler bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit viermaligem Pufferwechsel und einer Dauer von über einer Stunde wurden die Membranen für fünf Minuten in Enhanced Chemiluminescence Lösung (ECL) gelegt. Dabei wird das enthaltene Luminol durch die am Zweitantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidiert. Das Luminol wurde durch die Oxidation energetisch angeregt und fällt danach wieder in den Grundzustand zurück. Dies führt zu einer Lichtemission, die sich durch Auflage eines Films festhalten und abbilden lässt. Abschließend wurden die Membranen in einem zweiten Durchgang mit einem α -Actin-Antikörper inkubiert.

Tabelle 2: Verwendete Erstantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Proteingröße	Hersteller
phospho-ERK 1/2	- Thr202/Tyr204 - monoklonal - Maus	42/44 kDa	Cell Signaling
phospho-Akt	- Ser473 - monoklonal - Kaninchen	60 kDa	Cell Signaling
phospho-p38 MAPK	- Thr180/Tyr182 - monoklonal - Kaninchen	43 kDa	Cell Signaling

2.6 RNA-Präparation und RT-PCR-Analyse

2.6.1 Materialien

- Trizol Invitrogen
- DNase Ambion
- Moloney Murine Leukämie Reverse Transkriptase Sigma-Aldrich
- Sybr Green PCR Reagents:
 - AmpliTaq Gold DNA Polymerase 5 U/μl
 - AmpErase UNG
 - dNTP (je 2,5 mmol/l) Mix with dUTP (5 mmol/l) 10 x Sybr Green PCR Buffer
 - 25 mmol/l MgCl₂
- Oligonukleotide TIBMolbiol
- 5700 Sequence Detection System Applied Biosystems

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer (TIBMolbiol).

Primer	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz
GPx3	5'-TAC AAG AAG AAC TTG GGC CAT TTG-3'	5'-TCT CGC CTG GCT CCT GTT T-3'
HO-1	5'-CAA ACA GCT CTA TCG TGC TCG A-3'	5'-GTC TTA GCC TCT TCT GTC ACC CTG-3'
SOD1	5'-GGG AAC CAT CCA CTT CGA GC-3'	5'-TGG CCT TCA GTT AAT CCT GTA ATT TG-3'
HPRT	5'-TGA AGG AGA TGG GAG GCC A-3'	5'-AAT CCA GCA GGT CAG CAA AGA A-3'

2.6.2 Durchführung

Um den Einfluss der Polyphenolbehandlung auf die Expression der antioxidativen Enzyme in den Kardiomyozyten bestimmen zu können, wurde die RNA der Zellen präpariert und eine RT-PCR-Analyse durchgeführt.

Die Kardiomyozyten wurden mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 für eine Stunde vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine vierstündige Inkubation in Medium M199 bei 37°C. Zusätzlich wurde ein Teil der Kardiomyozyten mit 5 µmol/l α -Amanitin, einem Inhibitor der RNA-Polymerase II, 30 Minuten vor Polyphenolbehandlung behandelt. Bei jedem Mediumwechsel erhielten die Zellen für die Dauer des Experiments frisches α -Amanitin.

Die RNA wurde mit Trizol entsprechend der Empfehlungen des Herstellers extrahiert. 500 ng RNA wurden mit DNase verdaut und anschließend mit Hilfe der Moloney Leukämie Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Der cDNA wurden 25 µl SYBR Green Universal PCR Master Mix, der die Primer enthielt, zugesetzt. Anschließend wurde sie im 5700 Sequence Detection System amplifiziert. Die SYBR Green Methode wurde in der Real-Time PCR angewandt, um die cDNA quantitativ zu amplifizieren.

Als erster Schritt wurde ein Zyklus bei 50°C für 2 Minuten durchlaufen, in dem die AmpErase die Kontamination der DNA durch Produkte vorheriger PCR-Durchläufe verhinderte (sog. Carryover-Kontamination), und die Uracil-N-Glycosylase aktiviert wurde.

Es schloss sich eine Erhitzung auf 95°C für 10 Minuten an, wodurch die AmpErase inaktiviert und die Ausgangs-DNA denaturiert wurde.

Danach wurde die Temperatur auf 60°C gesenkt und es fanden die Annealing-Reaktion sowie die „Extension“ innerhalb einer Minute statt. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen.

Der Threshold Cycle (Ct) ist definiert als derjenige Zyklus, bei dem die Anzahl benötigter Zyklen erreicht ist, um ein Fluoreszenzsignal zu emittieren, welches die Detektionsschwelle übersteigt.

Die mRNA-Expression wurde durch das Hypoxanthinphoryribosyltransferase(HPRT)-Gen, das als sogenanntes Housekeeping-Gen festgelegt worden war, standardisiert. Die Expression des Zielgens in Relation zum Housekeeping-Gen, wurde anhand der Differenz zwischen den Schwellenwerten der beiden Gene ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) berechnet.

Es wurde die Expression von Katalase, Hämoxygenase-1, Superoxiddismutase-1 und Glutathionperoxidase-1 bestimmt.

2.7 Bestimmung der intrazellulären ROS mittels Durchflusszytometrie

2.7.1 Materialien

- PBS, Phosphat-gepufferte Salzlösung s.o.
- H₂DCFDA Invitrogen
- EGCG Sigma-Aldrich
- TF3 Mitsui Food Research Lab.
- H₂O₂ Sigma-Aldrich
- transparente 24-Well-Platte Falcon
- Trypsin EDTA GibcoBRL Life Technologies
- CyAn ADP FACS DakoCytomation

2.7.2 Durchführung

Die Zellen wurden mit 25 µmol/l 2',7'-Dihydrodichlorofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) behandelt. Intrazelluläre Esterasen der Kardiomyozyten spalten das H₂DCFDA zu 2',7'-Dichlorofluorescein (H₂DCF), welches durch intrazelluläre ROS zu Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert wird. Die oxidierte Form des Moleküls lässt sich mit Fluoreszenzmessungen quantitativ nachweisen.

Nach Absaugen des Zellmediums (Medium M199 mit 5% NBCS-Zusatz), erfolgten ein Waschschrift mit PBS und eine Beladung der Zellen mit 25 $\mu\text{mol/l}$ H₂DCFHDA für 30 Minuten bei 37°C. Daran schloss sich eine Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG, 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 oder Kontrollmedium für 60 Minuten bei 37°C an. Um die Teepolyphenole zu entfernen, erfolgten ein weiterer Waschschrift mit PBS und eine Stressbehandlung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ H₂O₂ (gelöst in PBS) für weitere 30 Minuten bei 37°C.

Die Kardiomyozyten wurden anschließend mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und die Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

2.8 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Signifikanz wurde als *t*-Test im Vergleich Behandlung versus Kontrolle (SPSS 11.0, Chicago, IL, USA) berechnet. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 EGCG und TF3 schützen vor oxidativem Stress

Um einen möglichen zytoprotektiven Effekt der Teepolyphenole nachzuweisen, etablierten wir ein oxidatives Stressmodell: nach Vorbehandlung mit Teepolyphenolen oder Lösungsmittel für eine, vier, acht oder 24 Stunden wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit 100 μM H_2O_2 inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen gewaschen, erhielten frisches Medium M199 und wurden für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Ausmaß der Zellschädigung durch Messung der ins Medium freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellkulturen, die nach gleicher Vorbehandlung nicht oxidativ gestresst wurden.

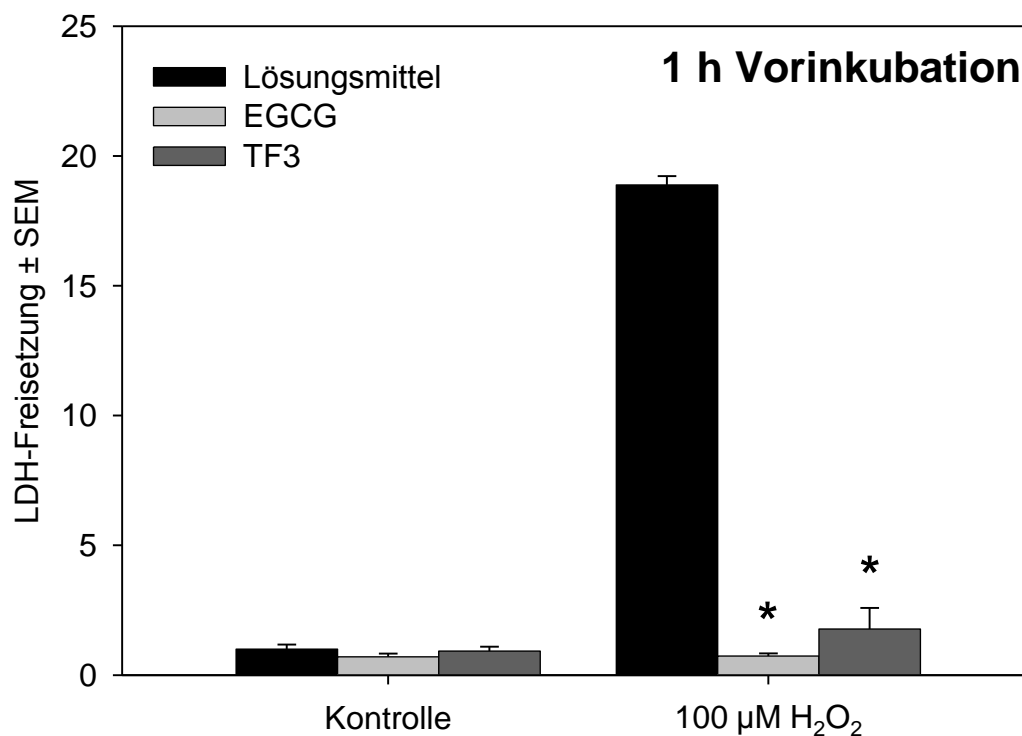


Abbildung 4: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit 50 μM EGCG oder 20 μM TF3 und anschließender Behandlung mit 100 μM H_2O_2 ($n = 3$, * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittel + H_2O_2).

Inkubation mit H_2O_2 führte bei den Zellen, die lediglich mit dem Lösungsmittel vorbehandelt wurden, zu einer deutlichen Zunahme der LDH-Freisetzung im Vergleich zu ungestressten Zellen um den Faktor 20. Kardiomyozyten, die eine Stunde vor Induktion oxidativen Stresses durch H_2O_2 mit EGCG oder TF3 behandelt wurden, zeigten eine LDH-Freisetzung auf dem Niveau der ungestressten Kontrollen (Abbildung 4).

Mit Zunahme der Dauer der Vorbehandlung zeigte sich ein Verlust der Teepolyphenol-vermittelten Zytoschutz. Eine vierstündige Vorinkubation der Zellen mit EGCG resultierte in einer ca. 80%igen Reduktion der LDH-Freisetzung im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Zellen. Vorbehandlung mit TF3 für vier Stunden führte zu einer nicht mehr signifikanten, ca. 40%igen Abnahme der LDH-Freisetzung im Vergleich zu den gestressten Kontrollzellen (Abbildung 5).

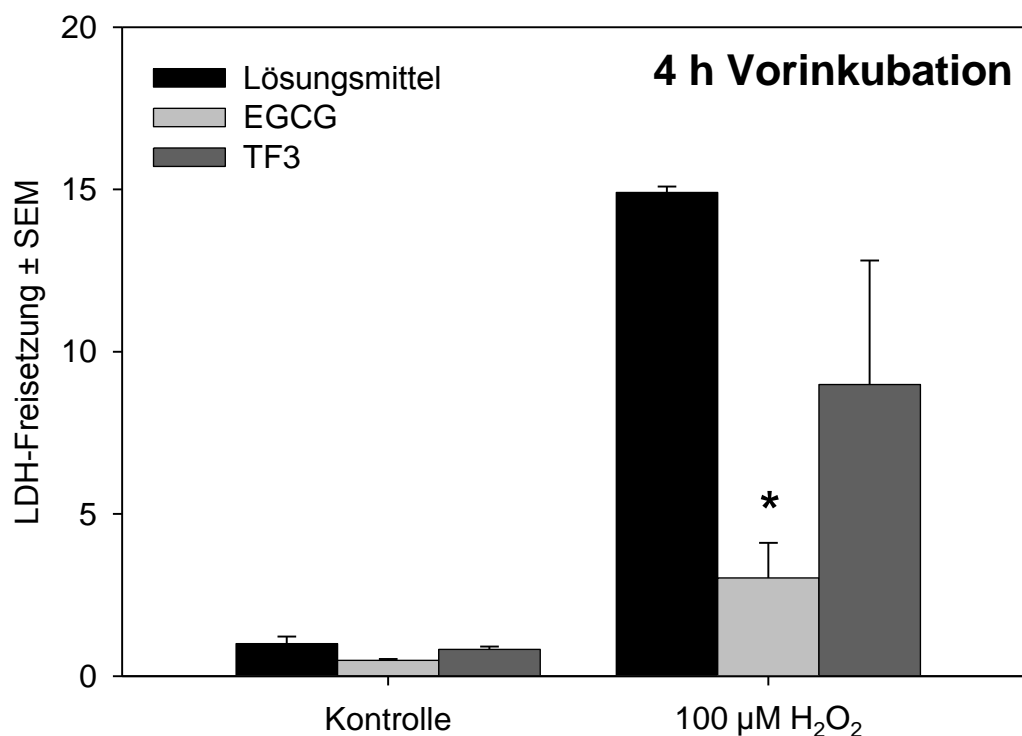


Abbildung 5: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach vierstündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H_2O_2 (n = 3, * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittel + H_2O_2).

Die kardioprotektive Wirkung war nach Verlängerung der Inkubationszeit auf acht Stunden weiter reduziert. Hier wurde nach der TF3-Behandlung das Niveau der gestressten Lösungsmittelgruppe erreicht. Vorbehandlung mit EGCG führte lediglich zu einer nicht mehr signifikanten Abnahme der LDH-Freisetzung um ca. 45% (Abbildung 6).

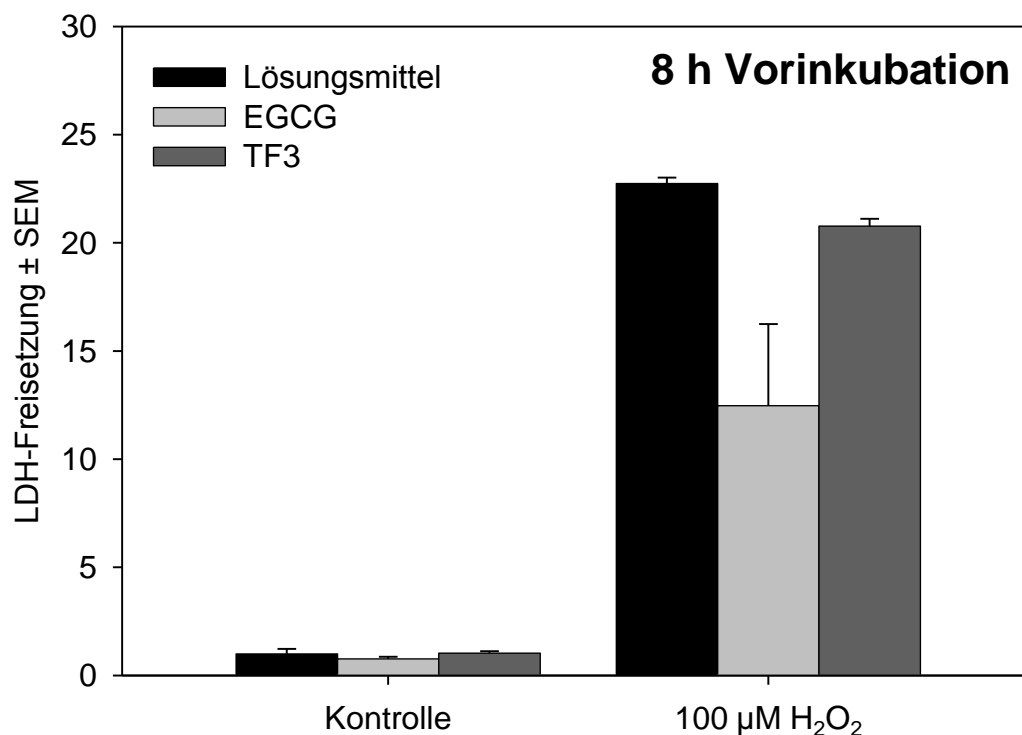


Abbildung 6: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach achtstündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H₂O₂ (n = 3, * p < 0,05 vs. Lösungsmittel + H₂O₂).

Nach 24 Stunden Vorinkubation hatte sich die LDH-Freisetzung in beiden Polyphenolgruppen der Lösungsmittelgruppe angeglichen (Abbildung 7).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass EGCG und TF3 eine schnell einsetzende und kurz wirksame Kardioprotektion gegen oxidativen Stress vermitteln.

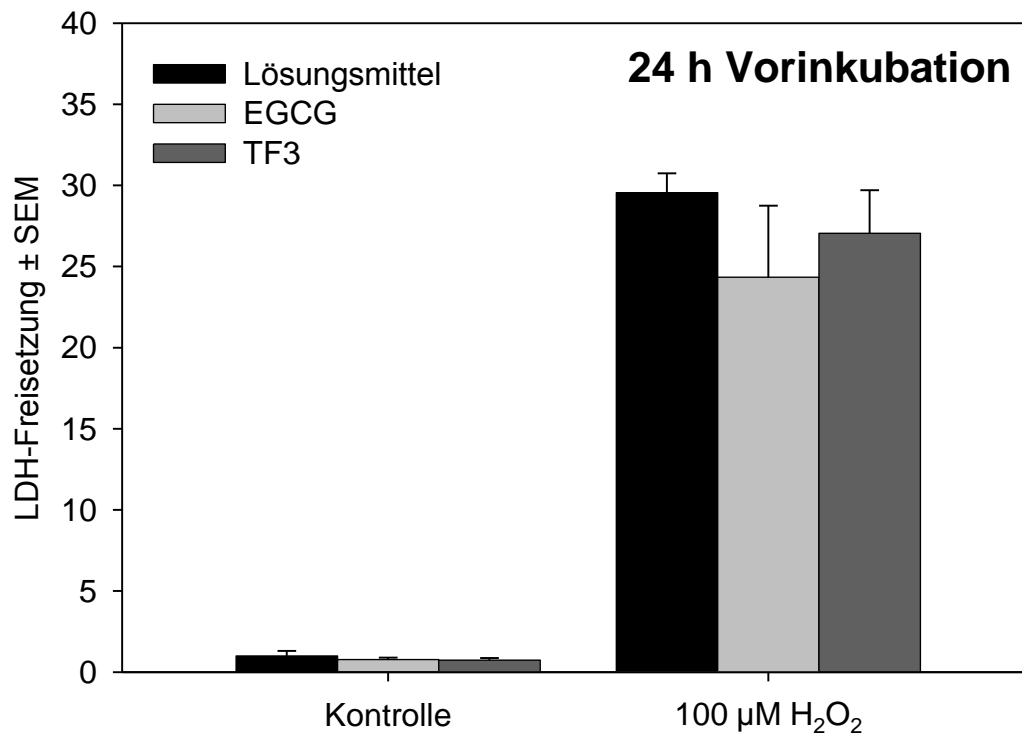


Abbildung 7: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach 24-stündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H₂O₂ (n = 3, * p < 0,05 vs. Lösungsmittel + H₂O₂).

3.2 Antioxidative Enzyme spielen keine Rolle in der Teepolyphenol-vermittelten Kardioprotektion

3.2.1 Expression antioxidativer Enzyme

Um zu klären, inwieweit eine Induktion antioxidativer Enzyme durch Polyphenole eine Rolle in deren kardioprotektiver Wirkung spielt, wurde die mRNA-Expression der Enzyme Superoxiddismutase-1 (SOD1), Glutathionperoxidase-3 (GPx3), Katalase und Hämoxygenase-1 (HO-1) in Kardiomyozyten nach einer einstündigen Behandlung mit 50 µmol/l EGCG bzw. 20 µmol/l TF3 und anschließender vierstündiger Inkubation bei 37°C in Medium M199 ohne Polyphenolzugabe gemessen.

Während die mRNA-Expression von SOD1, GPx3 und Katalase durch Polyphenolbehandlung nicht beeinflusst wurde (Abbildung 8), wurde eine deutliche Zunahme der mRNA-Expression von HO-1 um den Faktor 3,9 (Abbildung 9) nach einstündiger Be-

handlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG beobachtet. Interessanterweise zeigte die Inkubation mit TF3 keinen vergleichbaren Effekt auf die mRNA-Expression von HO-1. Die EGCG-vermittelte Induktion von HO-1 konnte durch Vorbehandlung mit α -Amanitin – einem Inhibitor der RNA Polymerase II – vollständig verhindert werden (Abbildung 9). Dies spricht für eine EGCG-abhängige *de novo*-Synthese der HO-1-mRNA.

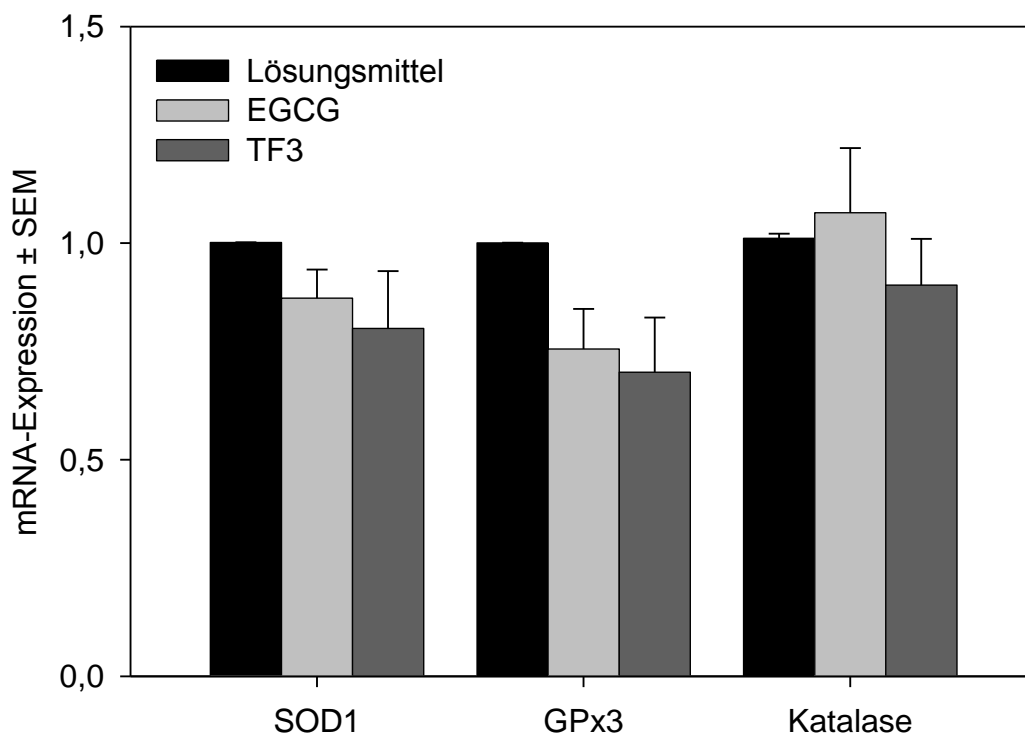


Abbildung 8: mRNA-Expression von Gluthathionperoxidase-3, Superoxiddismutase-1 und Katalase vier Stunden nach einstündiger Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG und 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 (n = 3).

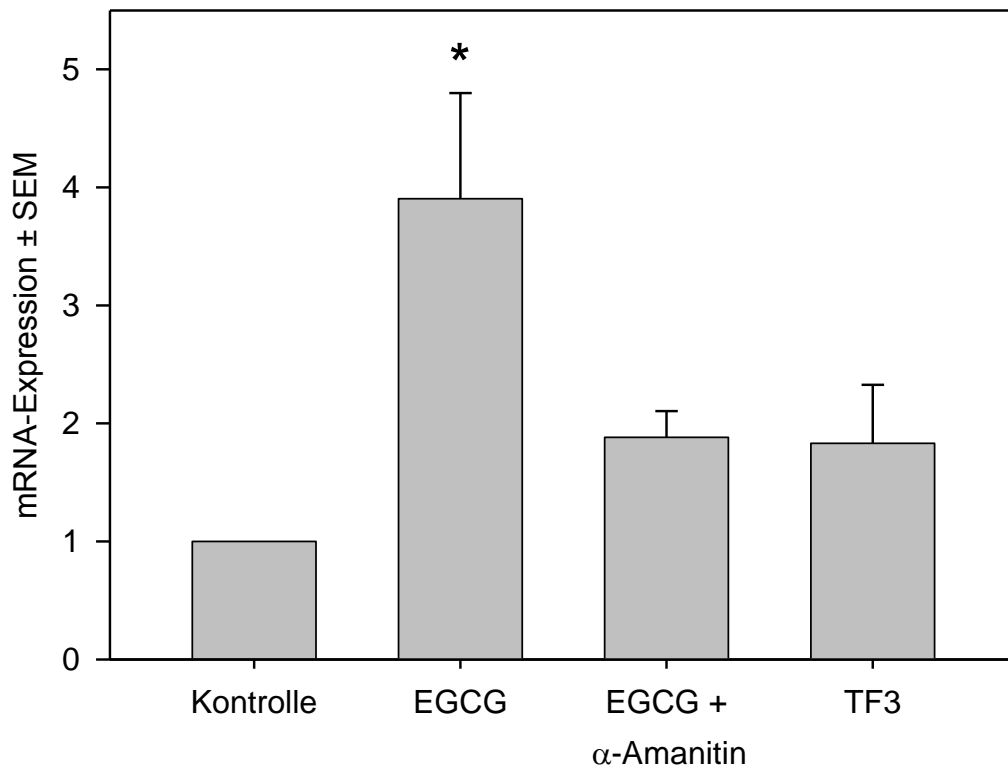


Abbildung 9: mRNA-Expression von Hämoxxygenase-1 (HO-1) nach einer einstündigen Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 und weiterer Inkubation für vier Stunden ($n = 3$, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Inhibition der RNA-Polymerase II durch zusätzliche 30-minütige Vorbehandlung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin.

3.2.2 Inhibition der RNA- und Proteinsynthese sowie von HO-1 hat keinen Einfluss auf die Teepolyphenol-vermittelte Kardioprotektion

3.2.2.1 Inhibition der Hämoxxygenase-1

Um zu überprüfen, inwieweit eine EGCG-vermittelte Induktion der HO-1 eine Rolle in der beobachteten Protektion spielt, wurden Kardiomyozyten für 30 Minuten mit 10 $\mu\text{mol/l}$ des HO-1 Inhibitors SnPPIX bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG und zusätzlicher Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ SnPPIX für eine Stunde. Danach wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgestellt und die LDH-Freisetzung nach 24

Stunden Inkubation bei 37°C gemessen. Trotz Inhibition der HO-1 zeigte sich kein Verlust der EGCG-abhängigen Zytoprotektion (Abbildung 10).

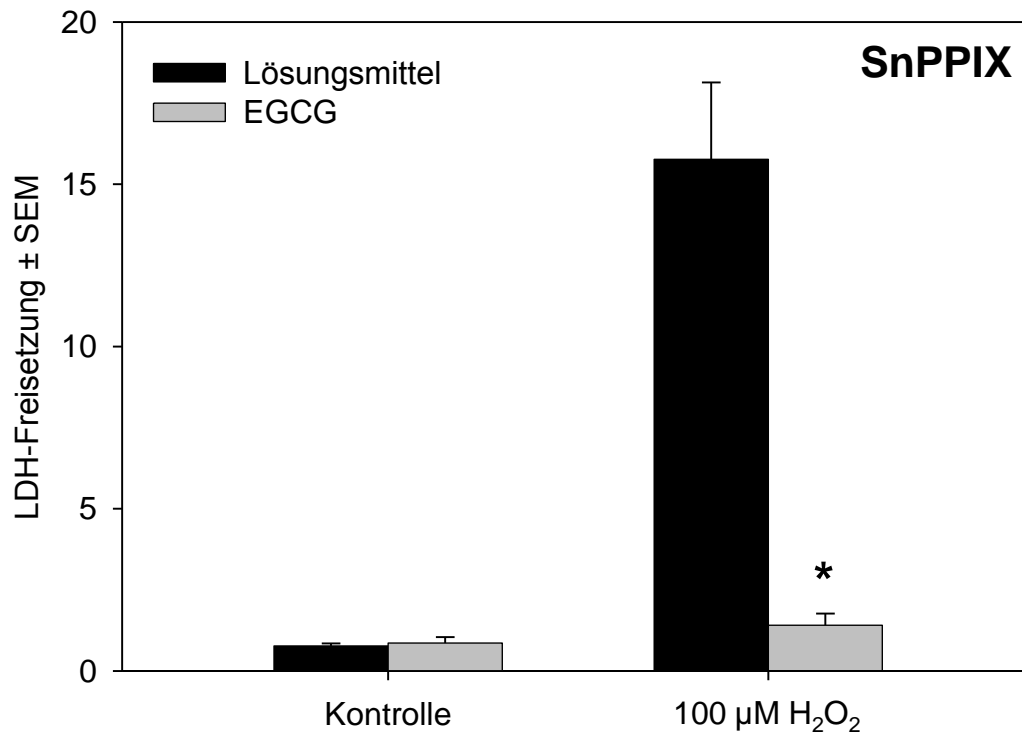


Abbildung 10: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H₂O₂ (n = 3, * p < 0,05 vs. Lösungsmittel + H₂O₂). Da TF3 keinen Einfluss auf die HO-1 mRNA-Expression zeigte, wurde hier ausschließlich EGCG verwendet. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 10 µmol/l SnPPIX behandelt. Nach jedem Waschschrift wurde dem Medium frisches SnPPIX zugesetzt.

3.2.2.2 Inhibition der RNA-Synthese

Um zu überprüfen, ob andere zelluläre antioxidative Schutzmechanismen jenseits der untersuchten antioxidativen Enzyme am Polyphenol-vermittelten Schutz vor oxidativem Stress beteiligt sind, wurde die RNA-Synthese in Kardiomyozyten durch Vorbehandlung mit 5 µg/ml α -Amanitin, einem Inhibitor der RNA-Polymerase II, inhibiert. Dazu wurden Kardiomyozyten 30 Minuten lang mit α -Amanitin vorbehandelt und anschließend mit 50

$\mu\text{mol/l}$ EGCG und $20 \mu\text{mol/l}$ TF3 für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Stressbehandlung mit $100 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 für 30 Minuten wurde nach weiteren 24 Stunden Inkubation die LDH-Freisetzung bestimmt. Behandlung mit α -Amanitin führte nicht zu einer signifikanten Abnahme der Polyphenol-vermittelten Protektion (Abbildung 11).

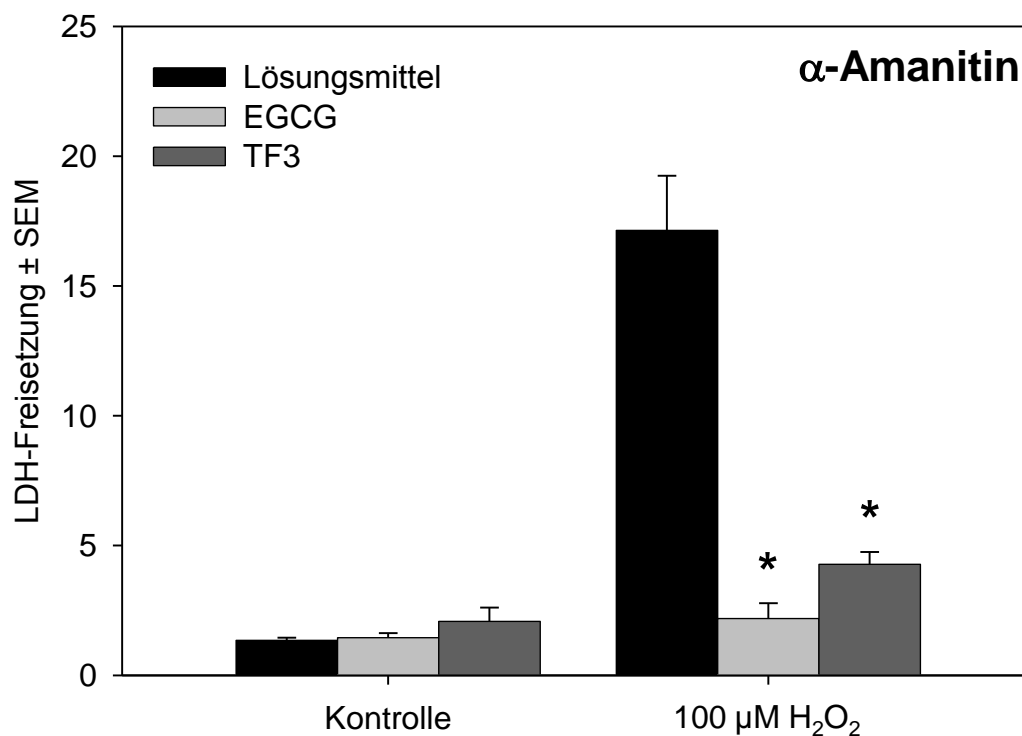


Abbildung 11: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit $50 \mu\text{mol/l}$ EGCG oder $20 \mu\text{mol/l}$ TF3 und anschließender Behandlung mit $100 \mu\text{mol/l}$ H_2O_2 ($n = 3$, * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittel + H_2O_2). 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit $5 \mu\text{g/ml}$ α -Amanitin behandelt. Nach jedem Waschschrift wurde dem Medium frisches α -Amanitin zugesetzt.

3.2.2.3 Inhibition der Proteinsynthese

Analog zur Inhibition der RNA-Synthese behandelten wir in einer weiteren Versuchsreihe Kardiomyozyten zur Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid. Die Kardiomyozyten wurden mit $1 \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid 30 Minuten vorbehandelt. Es erfolgte eine

einstündige Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 und nochmals zusätzlich eine Gabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die LDH-Menge im Medium bestimmt. Auch mit CHX behandelte Zellen wurden durch Behandlung mit Teepolyphenolen effektiv vor oxidativem Stress geschützt (Abbildung 12).

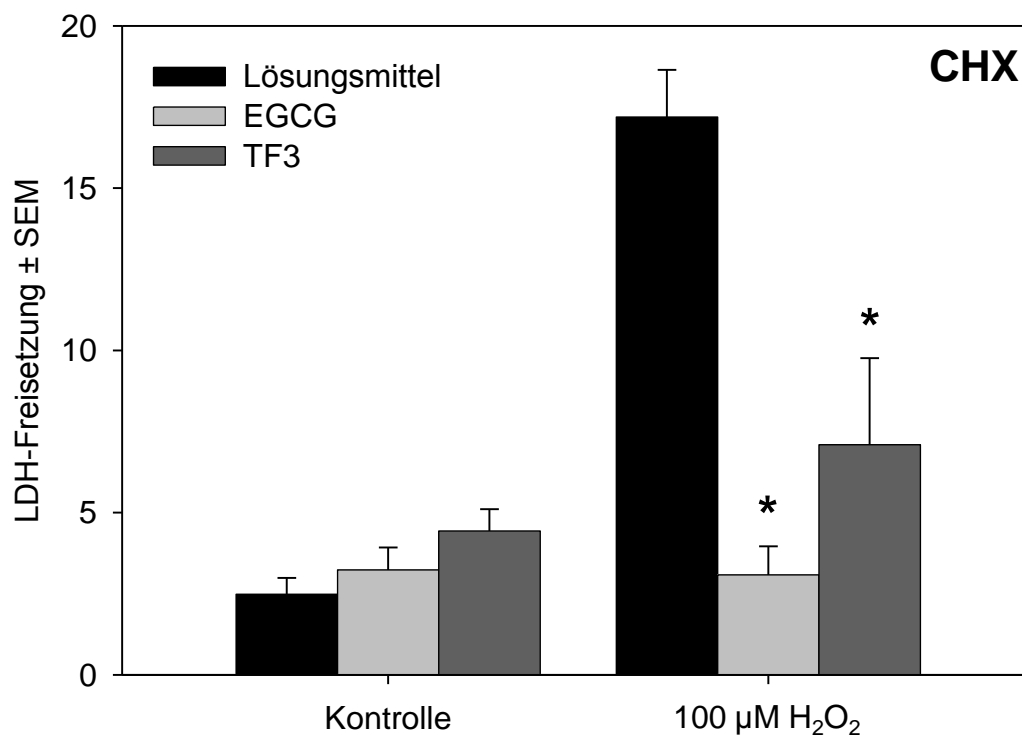


Abbildung 12: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 und anschließender Behandlung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 ($n = 3$, * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittel + H_2O_2). 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CHX behandelt. Nach jedem Waschschrift wurde dem Medium frisches CHX in gleicher Dosis zugesetzt.

3.2.2.4 Lösungsmittelkontrolle

Zum Ausschluss eines Effekts des Lösungsmittels der Inhibitoren, DMSO, wurden in einer parallelen Versuchsreihe Zellen ausschließlich mit DMSO und Teepolyphenolen

behandelt. Hierbei zeigte sich kein Einfluss des Lösungsmittels auf die Versuchsergebnisse (Abbildung 13).

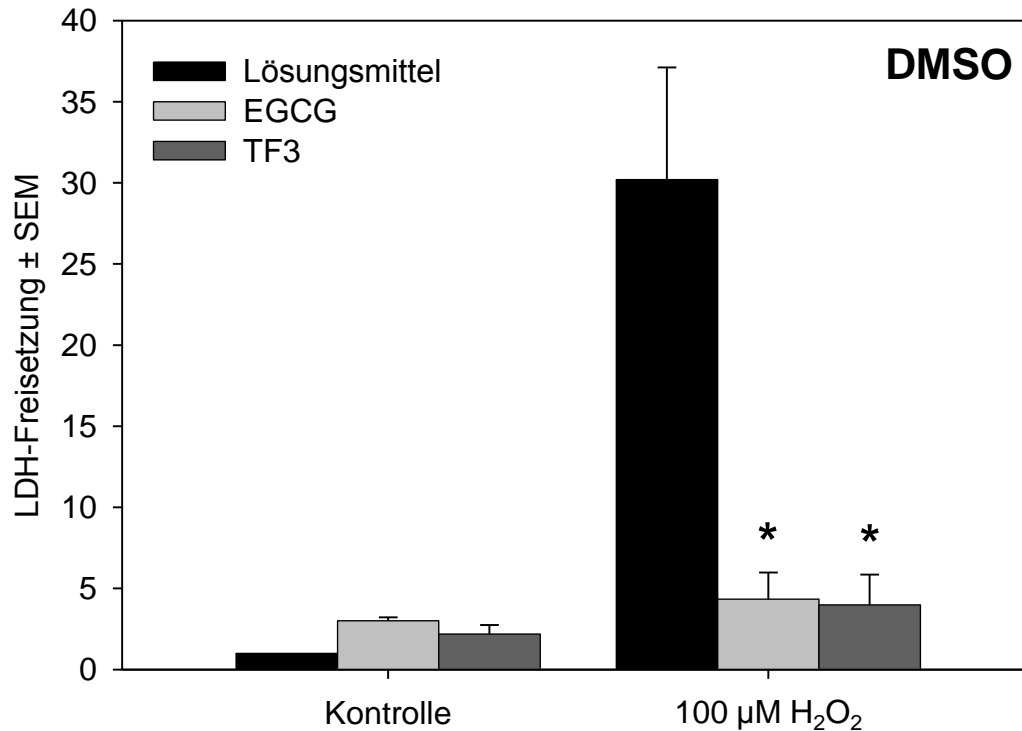


Abbildung 13: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H₂O₂ (n = 3, * p < 0,05 vs. Lösungsmittel + H₂O₂). 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Nach jedem Waschschrift wurde dem Medium frisches DMSO zugesetzt.

3.3 Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden durch EGCG und TF3

Eine weitere Möglichkeit, Zellen vor den Auswirkungen oxidativen Stresses zu bewahren, ist die Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden.

Western Blots mit phospho-spezifischen Antikörpern zeigten eine Phosphorylierung, d.h. Aktivierung, von Akt, ERK 1/2 und p38 MAPK nach einstündiger Behandlung mit EGCG und TF3 (Abbildung 14).

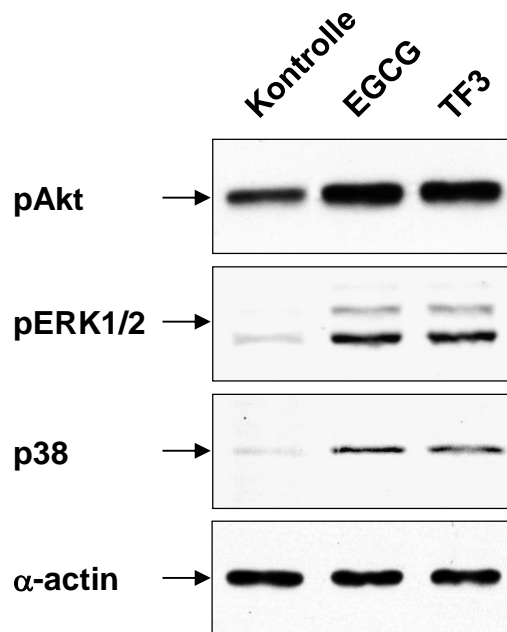


Abbildung 14: Nach einstündiger Inkubation mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 resultiert eine Phosphorylierung von Akt, ERK 1/2 und p38 MAPK. α -Actin diene als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen, ob diese Signalkaskaden eine Rolle in der Teepolyphenol-vermittelten Kardioprotektion spielen, wurden Kardiomyozyten mit Inhibitoren der Signalkaskaden PI3K/Akt (100 $\mu\text{mol/l}$ Wortmannin), MEK1/ERK1/2 (50 $\mu\text{mol/l}$ PD98059) und p38 MAPK (50 $\mu\text{mol/l}$ SB203580) vorbehandelt. Die Kardiomyozyten wurden 30 Minuten lang mit einem der Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 für eine Stunde behandelt. Keine der untersuchten Inhibitoren führte zu einem signifikanten Verlust der Polyphenol-vermittelten Protektion (Abbildungen 15-17).

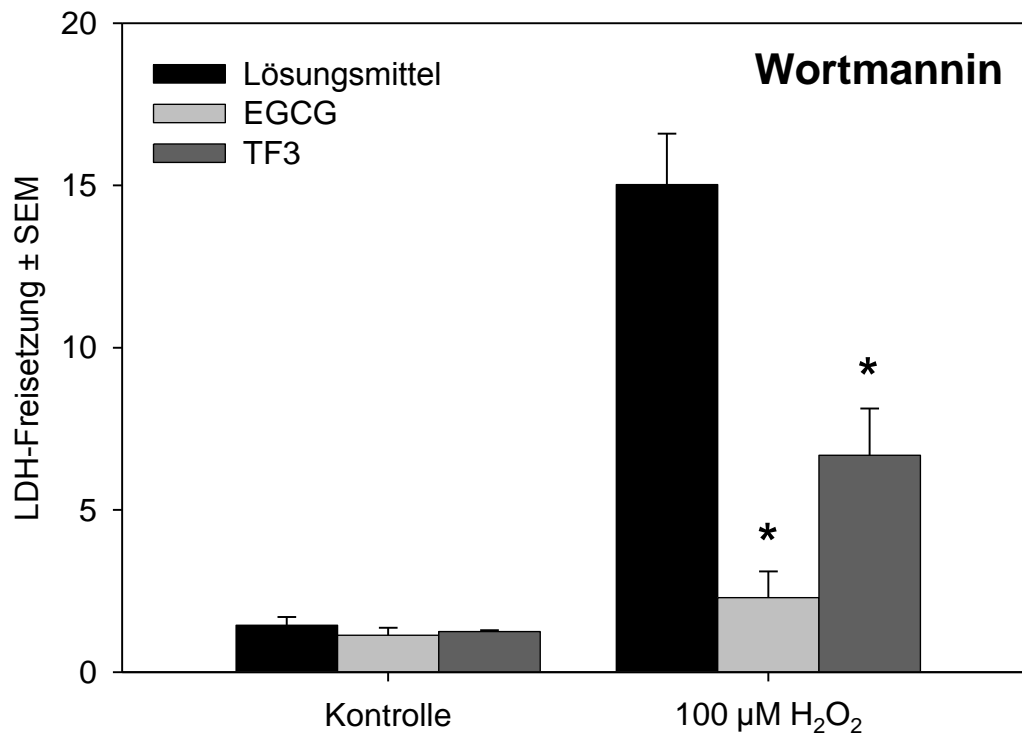


Abbildung 15: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H₂O₂ (n = 3, * p < 0,05 vs. Lösungsmittel + H₂O₂). 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 100 mmol/l Wortmannin behandelt. Nach jedem Waschschrift wurde dem Medium frisches Wortmannin zugesetzt.

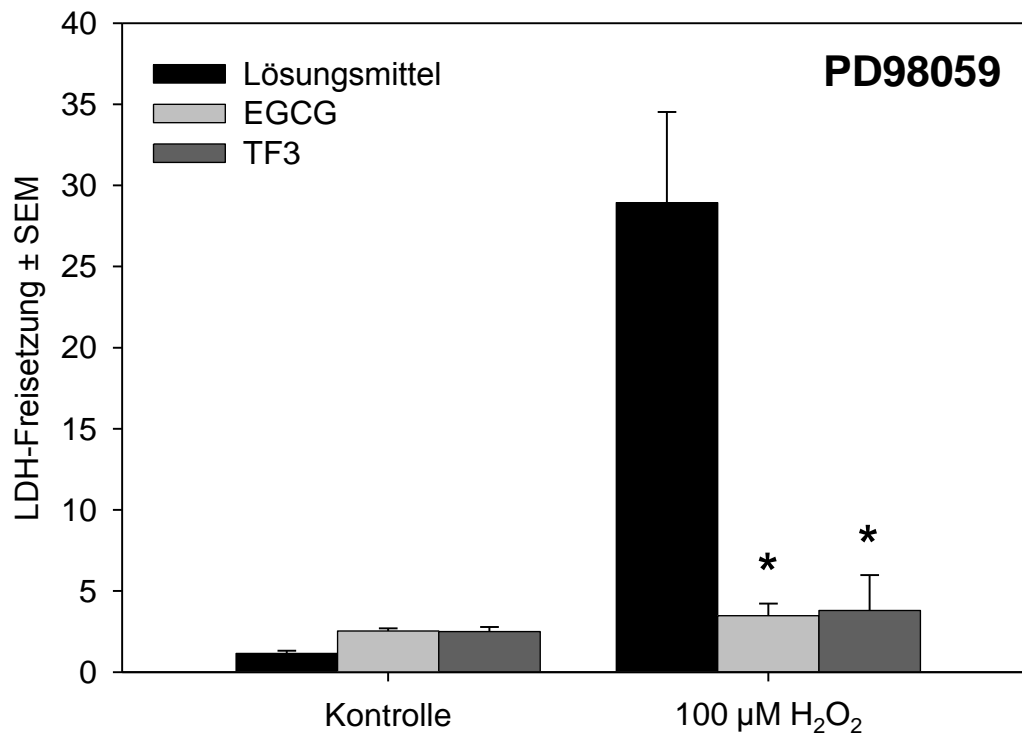


Abbildung 16: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H₂O₂ (n = 3, * p < 0,05 vs. Lösungsmittel + H₂O₂). 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 50 µmol/l PD98059 behandelt. Nach jedem Waschschrift wurde dem Medium frisches PD98059 zugesetzt.

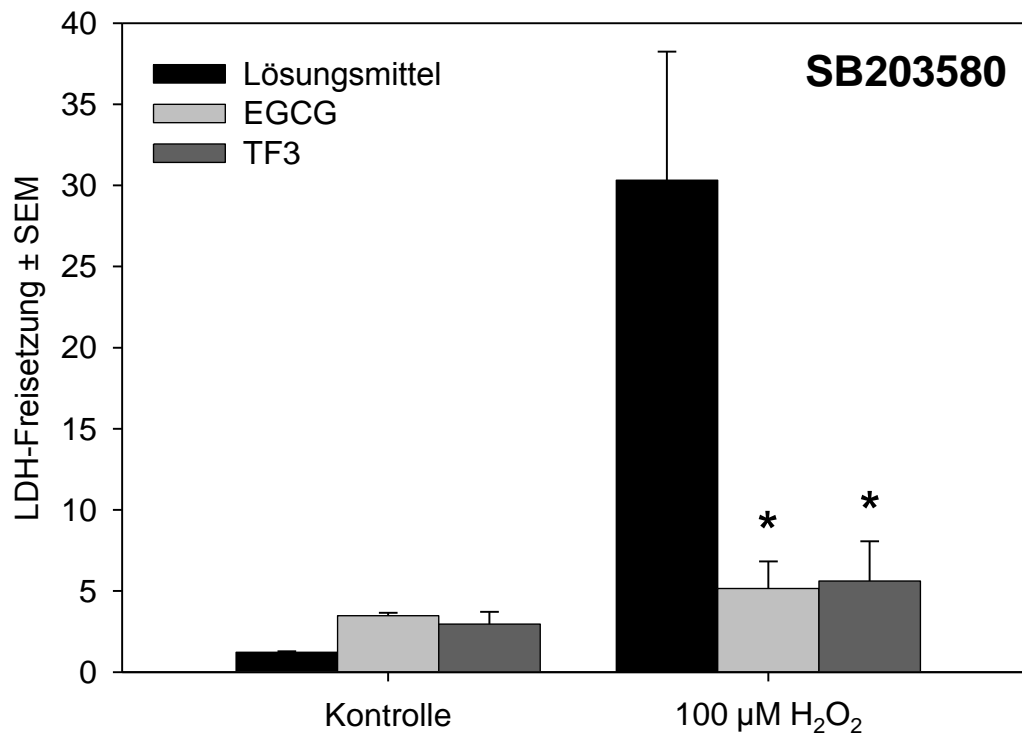


Abbildung 17: LDH-Freisetzung 24 Stunden nach einstündiger Vorinkubation mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 und anschließender Behandlung mit 100 µmol/l H₂O₂ (n = 3, * p < 0,05 vs. Lösungsmittel + H₂O₂). 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit 50 µmol/l SB203580 behandelt. Nach jedem Waschschrift wurde dem Medium frisches SB203580 zugesetzt.

3.4 Reduktion der intrazellulären ROS-Konzentration durch EGCG und TF3

Um eine direkte Elimination der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Scavengerfähigkeit der beiden Teepolyphenole zu untersuchen, wurden die Kardiomyozyten mit 2',7'-Dihydrodichlorofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) behandelt.

Intrazelluläre Esterasen spalten H₂DCFDA zu 2',7'-Dichlorofluorescein (H₂DCF). H₂DCF wird durch intrazelluläre ROS zu Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert, welches sich anhand von Fluoreszenzmessungen nachweisen lässt.

Kardiomyozyten wurden mit Teepolyphenolen eine Stunde lang vorbehandelt und mit 100 µmol/l H₂O₂ gestresst. Anschließend wurde die Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen.

Dabei zeigte sich als Ausdruck einer signifikant niedrigeren Konzentration intrazellulärer ROS eine geringere Lichtemission nach Vorbehandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 (Abbildung 18).

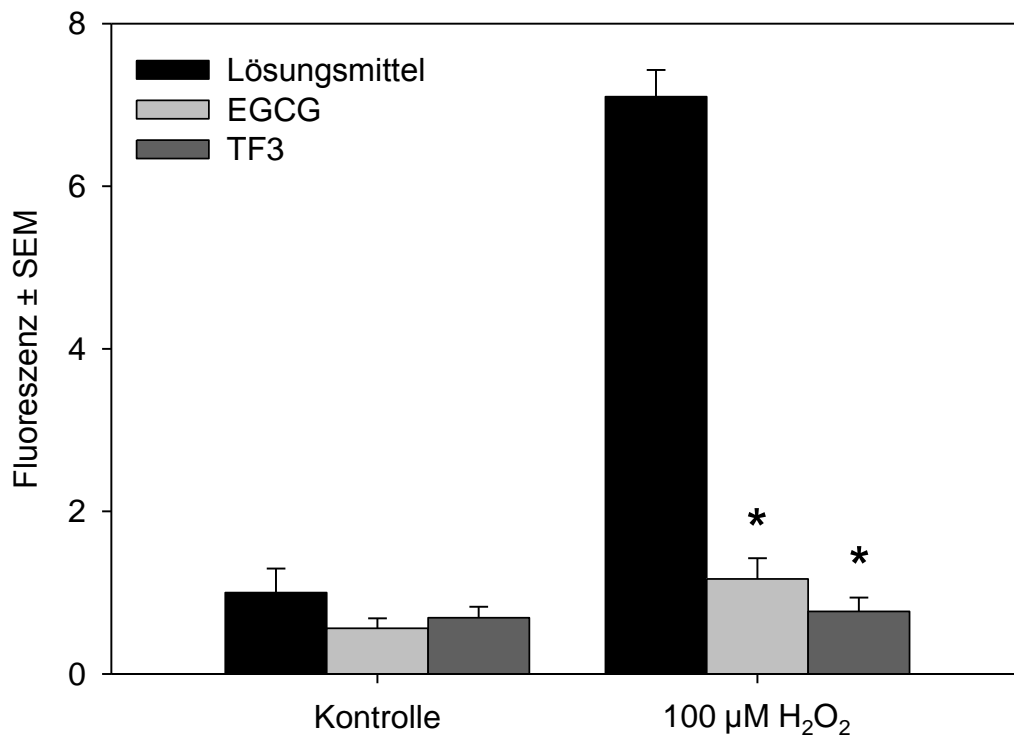


Abbildung 18: Fluoreszenzmessungen im Durchflusszytometer zum Nachweis intrazellulärer ROS nach 30-minütiger Inkubation mit H_2DCFDA , einstündiger Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3 und anschließender Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 für 30 Minuten ($n = 3$, * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittel + H_2O_2).

4 Diskussion

4.1 Polyphenole schützen Zellen vor oxidativem Stress

4.1.1 EGCG vermittelt Kardioprotektion

In der vorliegenden Arbeit wurden die kardioprotektiven Effekte des Catechins EGCG aus dem grünen Tee und des Theaflavins TF3 aus dem schwarzen Tee in einem oxidativen Stressmodell untersucht. Es erfolgte zunächst eine einstündige, vierstündige, achtstündige oder 24-stündige Vorbehandlung der Kardiomyozyten mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG oder 20 $\mu\text{mol/l}$ TF3. Daran schloss sich eine 30-minütige Stressbehandlung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 an. Die Zellkulturen erhielten nach einem weiteren Waschschrift serumfreies Medium M199 und wurden für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Ausdruck einer deutlichen Kardioprotektion zeigte sich hierbei im Vergleich zur Kontrollgruppe eine stark verminderte LDH-Freisetzung nach einer einstündigen Vorbehandlung mit Polyphenolen. Eine Verlängerung der Vorbehandlungszeit resultierte zunächst in einer Abnahme und letztlich in einem völligen Verlust der Kardioprotektion. Interessanterweise entspricht die Wirkdauer der Polyphenole ihrer in früheren Studien publizierten Halbwertszeit in Zellkulturmedien (Hong *et al.* 2002).

Ebenfalls eine Kardioprotektion durch EGCG-Behandlung im oxidativen Stressmodell konnten Sheng *et al.* nachweisen. Kardiomyozyten wurden 6-48 Stunden mit 12,5-200 mg/l EGCG vorbehandelt und anschließend mit H_2O_2 gestresst. Mit Hilfe eines 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays konnten die Autoren eine Verbesserung des Überlebens der Kardiomyozyten zeigen. Zusätzlich wurde ein antiapoptotischer Effekt des Catechins ermittelt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass EGCG *in vivo* Kardiomyozyten in einem Hypertrophie-Modell schützen kann. Die Hypertrophie wurde durch Druckerhöhung als Folge einer Konstriktion der Aorta induziert. Die orale Gabe von 50 bzw. 100 mg/kg Körpergewicht EGCG über einen Zeitraum von sechs Wochen resultierte in einer Reduktion von systolischem Blutdruck und Herzgewicht, sowie in einer erhöhten Aktivität der Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase in Serum und Myokardgewebe (Sheng *et al.* 2007).

Pagnotta *et al.* untersuchten die Auswirkungen von Hypoxie und Reoxigenisierung auf das Zytoskelett von Kardiomyozyten unter der Behandlung mit Catechinen. Zusätzlich wurden auch Versuche mit dem Antioxidans α -Tocopherol durchgeführt und die Wir-

kungen verglichen. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit wurde nicht die Einzelsubstanz EGCG untersucht, sondern mit Extrakten aus grünem Tee gearbeitet. Kultivierte Rattenkardiomyozyten wurden mit 50 µg/ml Teeextrakt oder 20 µmol/l α -Tocopherol 24 Stunden vor Induktion einer Hypoxie inkubiert. Der hypoxische Zustand wurde zwei Stunden lang aufrecht erhalten. Anschließend wurden die Kardiomyozyten eine Stunde lang reoxygeniert. Das Überleben der Zellen wurde mit Hilfe von MTT-Assays ermittelt und die antioxidative Aktivität wurde anhand der Reduktion von ABTS und Absorption bei 740 nm gemessen. Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Teeextrakt führte zu einem Überleben der Kardiomyozyten, welches mit dem der normoxischen Kontrollgruppe vergleichbar war. α -Tocopherol steigerte ebenfalls das Überleben der Zellen, allerdings in geringerem Maße. Auch die antioxidative Aktivität der Teeextrakte war stärker als die von α -Tocopherol. Im Rahmen von Hypoxigenierung und Reoxygenierung kam es zu Veränderungen des Zytoskeletts, Veränderungen der Kernmorphologie und Apoptose der unbehandelten Zellen, sowie der Zellen, die α -Tocopherol erhalten hatten. Gabe des Extrakt des grünen Tees resultierte in signifikantem Schutz von Zytoskelettintegrität und Kernmorphologie. Antioxidative Aktivität, Schutz der Zellarchitektur und die Überlebensfähigkeit der Kardiomyozyten verbesserten sich (Pagnotta *et al.* 2006).

Die beschriebene Kardioprotektion deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Auch in den Experimenten, die in unserem Labor durchgeführt wurden, wurden mikroskopische Veränderungen der Zellstruktur beobachtet, die aufgrund des H₂O₂-induzierten Stresses entstanden waren. Bei einer Vorbehandlung mit EGCG zeigten die Kardiomyozyten auf mikroskopischer Ebene nur geringe bis gar keine Veränderungen der Zellstrukturen. Dies korrelierte mit einer verminderten LDH-Freisetzung aus mit EGCG vorbehandelten Zellen und spricht ebenfalls für einen zytoprotektiven Effekt des Catechins.

4.1.2 Einfluss von EGCG auf andere Zelltypen

Eine Vorbehandlung mit EGCG übt sich jedoch nicht nur auf Kardiomyozyten positiv aus. In der Literatur finden sich zahlreiche weitere Studien, die dem Catechin positive Wirkungen auch auf andere Zelltypen zuschreiben. So erfahren auch neuronale Zellen,

die durch einen Glutamatüberschuss mit oxidativem Stress konfrontiert sind, Schutz durch eine Behandlung mit EGCG (Fu *et al.* 2006).

Jung *et al.* induzierten Apoptose in Phäochromozytom-PC-12-Zellen der Ratte. Auch hier zeigte eine Behandlung mit EGCG Zellprotektion. Die Zellen wurden CoCl_2 ausgesetzt, was in den Kontrollgruppen zu Produktion von ROS und Induktion von Apoptose und DNA-Brüchen führte. EGCG steigerte das Überleben der Zellen und verhinderte DNA-Fragmentation (Jung *et al.* 2007).

Demgegenüber stehen Arbeiten, die negative Effekte einer EGCG-Behandlung dokumentieren konnten. Elbing *et al.* untersuchten die Wirkung von 0,1-200 $\mu\text{mol/l}$ EGCG auf nonmaligne RAW 264.7-Zellen (Monozyten/Makrophagen-Zellreihe) und maligne humane promyelotische, leukämische HL60-Zellen und konnten nachweisen, dass EGCG hier keine antioxidativen, sondern prooxidative Effekte ausübt. Im Gegensatz zu den oben genannten Arbeiten war eine Behandlung mit EGCG hier nicht zytoprotektiv, sondern führte zu einer verstärkten Zellschädigung nach Induktion von oxidativem Stress durch Inkubation mit H_2O_2 (Elbing *et al.* 2005).

4.1.3 TF3 vermittelt Zytoprotektion vor oxidativem Stress

Im Gegensatz zu EGCG finden sich für TF3 deutlich weniger publizierte Studien. In der hier vorliegenden Arbeit war die effektive Konzentration von TF3 (20 $\mu\text{mol/l}$) in allen Experimenten niedriger als EGCG (50 $\mu\text{mol/l}$), zeigte aber eine vergleichbare zytoprotektive Wirkung.

4.2 Expression antioxidativer Enzyme

4.2.1 EGCG induziert die Hämoxigenase-1

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, spielen antioxidative Enzyme eine Schlüsselrolle in der zellulären Verteidigung gegen oxidativen Stress. Unsere Untersuchungen der Expression verschiedener antioxidativer Enzyme zeigte keine Induktion von Superoxid-dismutase-1, Glutathionperoxidase-3 und Katalase vier Stunden nach einer einstündigen Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ EGCG. Allerdings erfolgte eine erhöhte Expression der Hämoxigenase-1. Durch eine Vorbehandlung mit α -Amanitin, einem Inhibitor der RNA Polymerase II, konnte die Induktion der Hämoxigenase-1 verhindert werden, was auf eine *de novo*-Synthese der RNA, d.h. auf eine transkriptionelle Aktivierung durch

EGCG, schließen lässt. Inhibition der Hämoxygenase-1 resultierte in unserem Stressmodell allerdings nicht in einem Verlust der kardioprotektiven Wirkung von EGCG. Das Enzym stellt also nicht den Hauptmechanismus der Kardioprotektion dar.

Auch Wu und Hsu konnten eine Induktion der Hämoxygenase-1 durch EGCG in Endothelzellen nachweisen. Diese ließ sich mit Aktinomycin D und Cycloheximid hemmen, was ebenfalls für eine *de novo*-Synthese des Enzyms spricht (Wu *et al.* 2006).

4.2.2 Einfluss von TF3 auf die Expression antioxidativer Enzyme

Khan untersuchte die schützende Wirkung von Polyphenolen des schwarzen Tees auf Pestizid-induzierte Leberschäden bei Mäusen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Behandlung mit Theaflavinen die Lipidperoxidation reduzierte und die Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase stimulierte. Da allerdings mit einem Extrakt des schwarzen Tees gearbeitet wurde und nicht mit der Reinsubstanz TF3, ist nicht nachvollziehbar, ob dieser Effekt auf die Wirkung eines Theaflavins oder auf die Kombination aus verschiedenen Theaflavinen zurückzuführen ist (Khan 2006).

Eine umfangreichere Studie führten Kalra *et al.* an Albinomäusen durch. Orale Gabe von schwarzem Tee über sieben Tage und Erzeugung von oxidativem Stress durch 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen führte zu erhöhter Aktivität der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathion-S-Transferase, sowie zur Hemmung der Lipidperoxidation in Leber, Niere und Prostata. Aber auch hier muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass nicht Einzelsubstanzen des schwarzen Tees untersucht wurden, und sich somit keine endgültigen Rückschlüsse auf die Wirkung von TF3 auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme ziehen lässt (Kalra *et al.* 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von TF3 auf die Expression von Superoxiddismutase-1, Glutathionperoxidase-3, Katalase und Hämoxygenase-1 in Kardiomyozyten untersucht. Die Zellen wurden einer einstündigen Vorbehandlung mit 20 µmol/l TF3 unterzogen. Nach einer sich daran anschließenden vierstündigen Inkubation in Medium bei 37°C wurde die mRNA-Expression der Enzyme bestimmt. Im Gegensatz zu den oben dargestellten Studien resultierte keine Zunahme der Enzymexpression. Interessant wäre ein direkter Vergleich der Wirkung von lediglich TF3 auf Leber-, Niere-, und

Prostatazellen, um zu sehen, ob der induzierende Effekt zellspezifisch ist oder ob andere Bestandteile des schwarzen Tees für eine erhöhte Enzyminduktion und -aktivität verantwortlich sind.

4.3 EGCG und TF3 aktivieren Signalkaskaden

Ein weiterer denkbarer Mechanismus der Polyphenol-vermittelten Zytoprotektion ist die Aktivierung antiapoptotischer Signaltransduktionskaskaden. Eine Aktivierung von Akt, ERK1/2 und p38 MAPK durch Polyphenolbehandlung wurde mit Western Blot-Analysen untersucht. Hierbei konnte eine Induktion der Phosphorylierung durch Teepolyphenole nachgewiesen werden.

In der oben bereits dargestellten Forschungsarbeit von Wu und Hsu wurde eine durch EGCG-induzierte Hochregulierung der Hämoxxygenase-1 in Kardiomyozyten beschrieben, welche sich durch Inhibition von Akt und ERK 1/2 unterdrücken ließ und somit über diese Signalkaskaden vermittelt wurde (Wu *et al.* 2006).

In einer Arbeit aus unserem Labor von Lorenz *et al.* resultierte eine EGCG-Behandlung ebenfalls in einer Aktivierung von Akt und ERK 1/2 in Endothelzellen. Dies führte zu einer Zunahme der Aktivität der endothelialen NO-Synthetase mit konsekutiver Vasodilatation (Lorenz *et al.* 2004). Kim *et al.* konnten zeigen, dass EGCG durch Bildung von ROS und Aktivierung von Fyn eine Zunahme der NO-Produktion in Endothelzellen bewirkt. Daraufhin folgte eine Aktivierung von PI3K/Akt und der endothelialen NO-Synthetase (Kim *et al.* 2007).

Koh *et al.* untersuchten den zytoprotektiven Einfluss von EGCG auf die neuronale Zellreihe N18D3 der Ratte im Rahmen von oxidativem Stress. Es zeigte sich ein verbessertes Überleben der Zellen, die mit EGCG vorbehandelt und anschließend mit H₂O₂ oxidativ gestresst worden waren. Zusätzlich konnten eine Aktivierung von PI3K und Akt nachgewiesen werden (Koh *et al.* 2004).

Auch in Untersuchungen an Phäochromozytom-PC12-Zellen resultierte eine EGCG-Behandlung in einer Phosphorylierung von Akt und der Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3). Die behandelten Zellen zeigten eine erhöhte Überlebensrate nach H₂O₂-induziertem oxidativen Zellstress (Koh *et al.* 2003).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt, ERK 1/2 und p38 MAPK gezeigt werden.

Neben EGCG wurden diese Signalkaskaden auch durch TF3 phosphoryliert. In der Literatur finden sich hauptsächlich Untersuchungen von TF3 in Hinblick auf Hemmung von Zellabläufen der Kanzerogenese. Interessanterweise gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, die von einer Akt-Inhibition durch TF3 berichten. Dabei ist allerdings immer zu bedenken, dass es sich in den Versuchen um maligne entartete Zellen handelt, die Abläufe auf Zellebene also nicht mit denen einer gesunden Zelle vergleichbar sind und es somit zu Veränderung der Wirkungen von TF3 kommen kann.

Siddiqui *et al.* untersuchten den Einfluss von Theaflavinen und EGCG auf zwei Prostatakarzinom-Zelllinien. Dabei berichteten sie von einer Verminderung der PI3K-Proteinmenge und einer Inhibition der Akt-Aktivierung durch EGCG und TF3 (Siddiqui *et al.* 2004).

Diese Beobachtung konnten auch Yeh und Chen an malignen menschlichen MCF-7 Mammakarzinomzellen bestätigen. TF3 und EGCG hemmten die Aktivierung von Akt (Yeh *et al.* 2003).

Es ist interessant zu beobachten, dass TF3 – ebenso wie EGCG – unterschiedliche Wirkungen in Abhängigkeit von der Dignität der Zellen zeigt. Der Hintergrund für die Variabilität der Wirkung der Teepolyphenole ist noch nicht näher erforscht.

4.4 Induktion der Expression antioxidativer Enzyme und Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden spielen keine wesentliche Rolle in der Polyphenol-vermittelten Kardioprotektion

Um mögliche Wirkmechanismen der Teepolyphenole zu identifizieren, wurden Kardiomyozyten mit einer Reihe verschiedener Inhibitoren behandelt. Hierbei zeigte die Inhibition der Transkription durch α -Amanitin sowie der Translation durch Cycloheximid keinerlei Einfluss auf die Polyphenol-vermittelte Kardioprotektion. Dies erlaubt den Schluss, dass die Wirkung der Polyphenole nicht durch eine Induktion der Synthese endogener Antioxidantien verursacht wird. Dies gilt auch für HO-1: während sich in der RT-PCR eine Induktion der mRNA-Expression durch EGCG zeigte, bewirkte die Behandlung mit dem HO-1-Inhibitor Zinn Protoporphyrin IX (SnPPIX) keinen Verlust der EGCG-medierten Zytoprotektion. Gegen eine wesentliche Rolle endogener Antioxidantien spricht zudem die kurze Wirkdauer der Teepolyphenole, die ihrer Halbwertszeit im Medium entspricht. Es ist anzunehmen, dass eine relevante Neusynthese antioxidativer

Enzyme zum einen mehr Zeit in Anspruch nehmen würde als eine Stunde und zum anderen einen länger anhaltenden Schutz verleihen würde.

Behandlung mit Inhibitoren der antiapoptotischen Signalkaskaden Akt, ERK 1/2 und p38 resultierte ebenfalls nicht in einem Verlust der Polyphenol-vermittelten Protektion. Bei der Aktivierung antiapoptotischer Signalkaskaden durch EGCG und TF3 handelt es sich also ebenfalls nicht um einen essentiellen Wirkmechanismus der untersuchten Polyphenole.

4.5 EGCG und TF3 reduzieren intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies

Um den Einfluss von EGCG und TF3 auf die Spiegel intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten mit 2',7'-Dichlorofluorescein vorbehandelt. Die durchflusszytometrische Fluoreszenz-Analyse zeigte eine deutliche Reduktion der ROS-vermittelten Fluoreszenz in den mit Polyphenolen vorbehandelten Zellen. Dies spricht für einen früh einsetzenden Schutzmechanismus der Teepolyphenole. Die Ergebnisse der Versuche mit Inhibitoren verschiedener Zellabläufe, die analog zu ihrer Halbwertszeit rasch abnehmende Wirksamkeit der Polyphenole, sowie die unmittelbaren antioxidativen Effekte in der Fluoreszenz-Analyse sprechen für eine direkte Wirkung der Teepolyphenole über ihre Fähigkeiten als Scavenger von ROS.

Wei *et al.* untersuchten und verglichen ebenfalls die antioxidative Fähigkeit von grünem und schwarzem Tee. Sowohl grüner als auch schwarzer Tee zeigte die Fähigkeit, H₂O₂ dosisabhängig zu eliminieren. Hierbei war schwarzer Tee potenter als grüner Tee (Wei *et al.* 1999). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte TF3 (20 µmol/l) in deutlich geringerer Konzentration als EGCG (50 µmol/l) eine gleich gute Scavengerfähigkeit gegenüber H₂O₂.

Guo *et al.* untersuchten die antioxidativen Eigenschaften der Teepolyphenole EGCG, Epigallocatechin (EGC) und Epicatechin (EC) und ihrer korrespondierenden Epimere Gallocatechingallat (GCG), Gallocatechin (GC) und Catechin (C) an verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies [Superoxidanionen, Sauerstoffanionen, 2'-Azobis(2-Amidinopropan)Hydrochlorid und 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl]. Die Teepolyphenole EGCG und GCG, die beide Gallatgruppen tragen, zeigten stärkere Scavengerwirkungen auf die ROS, als die Catechine ohne Gallatgruppe. Die Gallatgruppe und die Hyd-

roxygruppe am B-Ring stellten sich als hauptverantwortlich für die antioxidative Wirkung heraus (Guo *et al.* 1999).

Dies deckt sich mit einer Studie von Leung *et al.* In einem LDL-Oxidationsmodell wurden hier antioxidative Eigenschaften der Polyphenole aus grünem und schwarzem Tee verglichen. Bei jeweils einer Konzentration von 5 µmol/l war TF3 das potenteste Antioxidans; EGCG lag nach ECG an dritter Stelle (Leung *et al.* 2001).

In vitro-Studien konnten zeigen, dass oxidiertes Low-Density-Lipoprotein (LDL) eine größere Rolle in der Entstehung von Arteriosklerose spielt als natives LDL.

Eine Modifikation von LDL durch Oxidation resultiert in einer Strukturveränderung und Aufnahme in Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Dies wiederum führt zur Formation von lipidhaltigen Schaumzellen, die in der Pathogenese der Arteriosklerose eine Schlüsselrolle spielen (Naderi *et al.* 2003).

In einer Studie von Yang *et al.* wurde die Fähigkeit des grünen Tees untersucht, die LDL-Oxidation in Nabelschnur-Endothelzellen zu verringern. Es zeigte sich, dass der Tee die LDL-Oxidation signifikant verringerte. Dieser Effekt wurde jedoch ausschließlich in der Gegenwart von Teecatechinen beobachtet; Entzug der Catechine führte zu einem vollständigen Wirkungsverlust. Die Forscher zogen daraus den Schluss, dass der Tee das Risiko der Arterioskleroseentwicklung, und folglich das einer koronaren Herzerkrankung, senken kann (Yang *et al.* 2000).

Ishikawa *et al.* untersuchen ebenfalls den Einfluss von Teepolyphenolen auf die Oxidation von LDL. In einer *in vitro*-Studie wurde humanem Plasma Theaflavine und Teecatechine zugesetzt und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die LDL-Fraktion separiert und die Oxidation von LDL gemessen. Catechine, vor allem EGCG, führten zu einer signifikanten Verzögerung der LDL-Oxidation. Auch die Behandlung mit Theaflavinen resultierte in einer starken Inhibition der LDL-Oxidation. Ergänzend führte die gleiche Arbeitsgruppe eine *in vivo*-Studie mit 14 gesunden Probanden durch. Der durchschnittliche Konsum von 750 ml schwarzem Tee pro Tag resultierte in einer signifikanten Verzögerung der LDL-Oxidation im Plasma (Ishikawa *et al.* 1997).

In einer anderen Studie verglichen Vinson *et al.* die Wirksamkeit von grünem und schwarzem Tee in einem Arteriosklerosemodell mit Hamstern. Arteriosklerose wurde durch beide Teesorten im gleichen Maße dosisabhängig inhibiert. Teekonsum zeigte – neben lipidsenkenden und antifibrinolytischen Wirkungen – auch antioxidative Effekte.

In dieser Studie wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die Oxidation von LDL bei Teeaufnahme reduziert wurde. Beide Teesorten, grüner und schwarzer Tee, zeigten dieselbe Wirksamkeit bei gleicher Dosierung (Vinson *et al.* 2004).

4.6 Antioxidative Eigenschaften der Teepolyphenole *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Teepolyphenole *in vitro* eine antioxidative, zellprotektive Wirkung besitzen. Inwieweit dieser Effekt auch *in vivo* besteht, bleibt noch zu klären.

Um die Frage der Aufnahme von Teecatechinen zu klären, untersuchten Yang *et al.* Catechinkonzentrationen in Blut und Urin von 18 gesunden Probanden nach oraler Aufnahme verschiedener Mengen grünen Tees. Nach einer Aufnahme von 1,5 g, 3 g oder 4,5 g grünen Tees wurde eine Maximalkonzentration von 326 µg/l im Blutplasma gemessen. Die Konzentration wurde ein, zwei und vier Stunden nach Aufnahme gemessen. Die Forscher konnten zeigen, dass die Halbwertszeit von EGCG im Blutplasma 5-5,5 Stunden beträgt und dass EGCG nicht mit dem Urin über die Nieren ausgeschieden wird (Yang *et al.* 1998).

Van Amelsvoort *et al.* verabreichten zehn gesunden Probanden eine Dosis von 1,5 mmol/l EGCG und weitere Catechine. Die Konzentration der Teecatechine wurde im Blutplasma und im 24-Stunden-Sammelurin mittels HPLC bestimmt. Die antioxidativen Eigenschaften wurden anhand der Fähigkeit zur Reduktion von Eisen ermittelt. Die Plasmakonzentrationen der Teecatechine unterschieden sich signifikant, wobei EGCG langsam anstieg und die Eliminationshalbwertszeit 3,9 Stunden betrug. Die Maximalkonzentration von EGCG lag mit 1,3 µmol/l deutlich unter der hier verwendeten Konzentration. Auch in dieser Studie fand sich keine renale Elimination von EGCG. Interessanterweise bewirkte EGCG keine Zunahme der antioxidativen Aktivität im Plasma, was möglicherweise auf die niedrige Endkonzentration zurückzuführen ist. Eine Zunahme der antioxidativen Kapazität wurde lediglich bei EGC und Epicatechingallat (ECG) beobachtet (Van Amelsvoort *et al.* 2001). Ohmori *et al.* untersuchten die Plasmacatechinkonzentrationen und die LDL-Oxidation bei 10 gesunden Probanden nach einmaliger Gabe von 5 g grünem Tee. Hier ließen sich zwei Stunden nach der Gabe von Tee signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von EGCG und ECG und eine Inhibition der LDL-Oxidation feststellen (Ohmori *et al.* 2005).

4.7 Ausblick

Oxidativer Stress ist eine große Belastung für die Zellen des Organismus und spielt eine entscheidende Rolle in der Genese vieler Erkrankungen.

Zahlreiche epidemiologische Studien suggerieren, dass Teepolyphenole nach oraler Aufnahme einen schützenden Effekt auf das Herz-Kreislauf-System ausüben.

Teepolyphenole sind jedoch komplexe Substanzen, deren Untersuchung immer wieder zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt hat. Im Großen und Ganzen überwiegen allerdings die Ergebnisse, die grünem und schwarzem Tee gesundheitsfördernde Wirkungen bescheinigen.

Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass viele *in vitro*-Studien – auch unsere – mit Konzentrationen durchgeführt wurden, die nach oraler Aufnahme alltäglicher Mengen Tee nicht erreicht werden. Dennoch geben diese Studien wertvolle Hinweise auf mögliche Mechanismen, die es in *in vivo*-Studien weiter zu untersuchen gilt.

Als Ausblick ist die Überlegung interessant, ob die Substanzen EGCG und TF3 pharmakologisch als Prophylaxe vor der Reperfusion im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts einsetzbar wären. Hierdurch könnte ein Ischämie/Reperfusionsschaden, bei dem ROS in großen Mengen anfallen und gesunde Herzzellen schädigen, verringert oder verhindert werden.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören weltweit zu den führenden Todesursachen. In ihrer Pathogenese spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle.

Epidemiologische Studien zeigen eine geringere Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen im asiatischen Raum. Als mögliche Erklärung hierfür wird unter anderem der weit verbreitete Konsum grünen Tees diskutiert. In der Tat konnten zahlreiche Studien verschiedene gesundheitsfördernde Wirkungen des grünen Tees nachweisen.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) aus dem grünen Tee als auch Theaflavin-3,3'-digallat (TF3) aus dem schwarzen Tee Kardiomyozyten vor oxidativem Stress schützen: einstündige Vorbehandlung mit 50 µmol/l EGCG oder 20 µmol/l TF3 resultierte in einer deutlich verringerten LDH-Freisetzung aus Kardiomyozyten nach Induktion oxidativen Stresses durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Eine Verlängerung der Vorbehandlungsdauer führte zu einem raschen Verlust der Polyphenol-vermittelten Zytoprotektion.

Auf der Suche nach den zugrunde liegenden Mechanismen zeigte sich mittels RT-PCR eine transkriptionelle Induktion der Hämoxxygenase-1 durch EGCG – jedoch nicht durch TF3. Weitere untersuchte antioxidative Enzyme – Glutathionperoxidase 3, Katalase und Superoxiddismutase 1 – blieben in ihrer Expression durch eine Behandlung mit Teepolyphenolen unbeeinflusst.

In Western Blots ließ sich eine Aktivierung der antiapoptotischen Signalkaskaden ERK 1/2, Akt und p38 MAPK nach Behandlung mit EGCG bzw. TF3 nachweisen.

Interessanterweise führte die Inhibition dieser möglichen Mechanismen durch Vor- bzw. parallele Behandlung mit Inhibitoren der Hämoxxygenase-1, der Protein- und RNA-Synthese sowie der o.g. Signalkaskaden nicht zu einem Verlust der zytoprotektiven Eigenschaften der Teepolyphenole. Dagegen zeigten Fluoreszenzmessungen von mit H₂DCFDA – einem Marker für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) – inkubierten Kardiomyozyten deutlich verringerte Konzentrationen intrazellulärer ROS nach Vorbehandlung mit Teepolyphenolen und anschließender Behandlung mit Wasserstoffperoxid.

Vor dem Hintergrund der engen zeitlichen Korrelation zwischen der Wirksamkeit der Polyphenole und ihrer Halbwertszeit im Zellkulturmedium sprechen unsere Befunde für

einen direkten ROS-„Scavenger“-Effekt der Teepolyphenole als Ursache der von ihnen vermittelten Kardioprotektion.

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxydisulfat
ARE	antioxidant response elements
CVD	Cardiovascular disease
DCF	Dichlorfluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
EGF	epidermal growth factor
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
ERK	extracellular signal-regulated kinases
GC	Gallocatechin
GCG	Gallocatechingallat
GPx3	Glutathionperoxidase 3
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
H ₂ DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
H ₂ DCFDA	2',7'-Dihydrodichlorfluoresceindiacetat
HBSS	Hank's buffered salt solution
HO-1	Hämoxygenase-1
HPCL	High Performance Liquid Chromatographie
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KHK	koronare Herzkrankheit
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
NBCS	Serum neugeborener Kälber
Nrf2	NF-E2-related factor 2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	platelet-derived growth factor

PDK-1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PTCA	perkutane transluminare Koronarangioplastie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodezylsulfat
SnPPIX	Zinn Protoporphyrin IX
SOD1	Superoxiddismutase 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TF1	Theaflavin
TF2a	Theaflavin-3-gallat
TF2b	Theaflavin-3'-gallat
TF3	Theaflavin-3,3'-digallat

Literaturverzeichnis

1. Agewall A., Löwbeer C. The new definition of myocardial infarction-can we use it? *Clin Cardiol.* 2005 Feb;28(2):77-80
2. Ahn H.-Y., Hadizadeh K.-R., Seul C., Yun Y.P., Vetter H., Sachinidis A. Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol Biol Cell.* 1999 Apr;10(4):1093-1104
3. Anter E., Chen K. Shapira O.M., Karas R.H, Keaney J.F. p38 mitogen-activated protein kinase activates eNOS in endothelial cells by an estrogen receptor alpha-dependent pathway in response to black tea polyphenols. *Circ Res.* 2005 May 27;96(10):1072-1078
4. Becker L. B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):461-470
5. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1991 Mar;5 Suppl 2:249-268
6. Bost F., Aouadi M., Caron L. Binétruy L. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie.* 2005 Jan;87(1):51-56
7. Buja, L.M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol.* 2005 Jul-Aug;14(4):170-175
8. Burlacu A., Jinga V. Gafenu A.V. Simionescu M. Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. *Cell Tissue Res.* 2001 Dec;306 (3):409-416

9. Byrne J. A., Grieve D.J., Cave A.C., Shah A.M. Oxidative Stress and heart failure. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2003 Mar;96 (3):214-221
10. Cheng, T.O., All teas are not created equal: the Chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol.* 2006 Apr 14;108(3):301-308
11. Chung J.Y., Park J.O., Phyu H., Dong Z. Yang C.S. Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate. *FASEB J.* 2001 Sep;15(11):2022-2024
12. Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.* 1999 Nov 15;13(22):2905-2927
13. Davies K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* 1995; 61:1-31
14. Dean R.T., Hunt J.V., Grant A. J., Yamamoto Y., Niki E. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(2):161-168
15. De Bacquer D., Clays E., Delanghe J., De Backer G. Epidemiological evidence for an association between habitual tea consumption and markers of chronic inflammation. *Atherosclerosis.* 2006, Dec;189(2):428-435
16. De Koning L., Merchant A.T., Pogue J., Anand S.S. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J.* 2007 Apr;28(7):850-856
17. Diplock A.T., Charleux J.L., Crozier-Willi G., Kok F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Vina-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr.* 1998 Aug;80 Suppl 1:77-112

18. Dufresne, C.J., Farnworth E.R. A review of the latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem*. 2001 Jul;12(7):404-421
19. Egusa G., Yamane K. Lifestyle, serum lipids and coronary artery disease: comparison of Japan with the United States. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11(6):304-312
20. Elbing L., Weiss R.M., Teufelhofer O. Uhl M., Knasmueller S., Schulte-Hermann R., Berger W., Mischke M. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J*. 2005 May;19(7):807-809
21. Fenton D., Stahmer S. Myocardial Infarction. *Emedicine* 2006 (www.emedicine.com/EMERG/topic327.htm)
22. Fu Y., Koo M.W. EGCG protects HT-22 cells against glutamate-induced oxidative stress. *Neurotox Res*. 2006 Aug;10(1):23-30
23. Graham H.N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*. 1992 May;21(3):334-350
24. Guo Q., Zhao B., Shen S., Hou J., Hu J., Xin W. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Mar 14;1427(1):13-23
25. Hong J., Lu H., Meng X., Ryu J.H., Hara Y., Yang C.S. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2002 Dec 15;62(24):7241-7246

26. Imai K., Nakachi K. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *BMJ* 1995;310(6981):693-696
27. Ishikawa T., Suzukawa M., Ito T. Yoshida H., Ayaori M., Nishiwaki M., Yonemura A., Hara Y., Nakamura H. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr.* 1997 Aug;66(2):261-266
28. Jung J.Y., Mo H.C., Yang K.H., Jeong Y.J., Yoo H.G., Choi N.K., Oh W.M., Oh H.K., Kim S.H., Lee J.H., Kim H.J., Kim W.J. Inhibition by epigallocatechin gallate of CoCl₂-induced apoptosis in rat PC12 cells. *Life Sci.* 2007 Mar 20;80(15):1355-1363
29. Kalra N., Prasad S., Shukla Y. Antioxidant potential of black tea against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2005, 24(2):105-114
30. Kang W.S, Lim I.H. Yuk D.Y., Chung K.H., Park J.B., Yoo H.S., Yun Y.P. Antithrombotic Activities of Green Tea Catechins and (-)-Epigallocatechin Gallate. *Thromb Res.* 1999 Nov 1;96(3):229-237
31. Khan S.M. Protective effect of black tea extract on the levels of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in liver of mice with pesticide-induced liver injury. *Cell Biochem Funct.* 2006 Jul-Aug;24(4):327-332
32. Keeley E. C., Boura J.A., Grines C.L. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet.* 2003 Jan 4;361(9351):13-20
33. Kim J.A., Formoso G., Li Y., Potenza M.A., Marasciulo F.L., Montagnani M., Quon M.J. Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requir-

- ing reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem.* 2007 May 4;282(18):13736-13745
34. Koh S.H., Kim S.H., Kwon H., Kim J.G., Kim J.H., Yang K.H., Kim J., Kim S.U., Yu H.J., Do B.R., Kim K.S., Jung H.K. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3 mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal-differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology.* 2004 Sep; 25(5):793-802
 35. Koh S.H., Kim S.H., Kwon H., Park Y., Kim K.S., Song C.W., Kim J., Kim M.H., Yu H.J., Henkel J.S., Jung H.K. Epigallocatechin gallate protects nerve growth factor differentiated PC12 cells from oxidative-radical-stress-induced apoptosis through its effect on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Oct 21;118(1-2):72-81
 36. Lafont A.M., Chai Y.C., Cornhill J.F., Whitlow P.L., Howe P.H., Chisolm G.M. Effect of alpha-tocopherol on restenosis after angioplasty in a model of experimental atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1995 Mar;95(3):1018-1025
 37. Lee Y. J., Daida H., Yokoi H., Miyano H., Takaya J., Sakurai H., Mokuno H., Yamaguchi H. Effectiveness of probucol in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Jpn Heart J.* 1996 May;37(3):327-332
 38. Lee Y.M., Hsiao G., Chen H.R., Chen Y.C., Sheu J.R., Yen M.H. Magnolol reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil inhibition in rats. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jun 22;422 (1-3):159-167
 39. Leung L.K., Su Y., Chen R., Zhang Z., Huang Y., Chen Z.Y. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr.* 2001 Sep;131(9):2248-2251

40. Liang Y.C., Chen Y.C., Lin Y.L., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'digallate. *Carcinogenesis*. 1999 Apr;20:733-736
41. Lin J.K., Lin-Shoei, S.Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effect of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50:1-7
42. Lorenz M., Wessler S., Follmann E., Michaelis W., Düsterhöft T., Baumann G., Stangl K., Stangl V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):6190-6195
43. Lu Y.P., Lou Y.R., Xie J.G., Peng Q.Y., Liao J., Yang C.S., Huang M.T., Conney A.H. Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 17;99(19):12455-12460
44. Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. Oxidative Stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jan;25(1):29-38
45. Martindale J.L., Holbrook N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002 Jul;192(1):1-15
46. Maulik N., Yoshida T., Das D.K. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 1998 Mar 15;24(5):869-875
47. Miller N., Castelluccio C., Tijburg L., Rice-Evans C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators? *FEBS Lett*. 1996;392(1):40-44

48. Miura Y., Chiba T., Tomita I., Koizumi H., Miura S., Umegaki K., Hara Y., Ikeda M., Tomita T. Tea Catechins prevent the development of arteriosclerosis in apo-protein E-deficient mice. *J Nutr.* 2001 Jan;131(1):27-32
49. Min K.J., Yang M.S., Kim S.U., Jou I., Joe E.H. Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci.* 2006 Feb 8;26(6):1880-1887
50. Moon D.O., Choi S.R., Lee C.M., Kim G.Y., Lee H.J., Park Y.M. Epigallocatechin-3-gallate supresses galactose-alpha1,4-galactose-1beta,4-glucose ceramide expression in TNF-alpha stimulated human intestinal Epithelial Cells Through Inhibition of MAPKs and NF-kappaB. *J Korean Med Sci.* 2005 Aug;20(4):548-554
51. Naderi G.A., Asgary S., Sarraf-Zadegan N., Shirvany H. Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. *Mol Cell Biochem.* 2003 Apr;246(1-2):193-196
52. Nagaya N., Yamamoto H. Uematsu M., Itoh T., Nakagawa K., Miyazawa T., Kangawa K., Miyatake K. Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Heart.* 2004;90(12):1485-1486
53. Nojiri H., Shimizu T., Funakoshi M., Yamaguchi O., Zhou H., Kawakami S., Ohta Y., Sami M., Tachibana T., Ishikawa H., Kurosawa H., Kahn R.C., Otsu K., Shirasawa T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* 2006 Nov 3;281 (44):33789-33801
54. Ohmori R., Iwamoto T., Tago M., Takeo T., Unno T., Itakura H., Kondo K. Anti-oxidant activity of various teas against free radicals and LDL oxidation. *Lipids.* 2005 Aug;40(8):849-853

55. Pagnotta E., Calonghi N., Hrelia S. Masotti L., Biagi P., Angeloni C. Green tea protects cytoskeleton from oxidative injury in cardiomyocytes. *J Agric Food Chem.* 2006 Dec 27;54(26):10159-10163
56. Park A.M., Dong Z. Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. *J Biochem Mol Biol.* 2003,Jan 31;36(1):66-77
57. Peters U., Poole C., Arab L. Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2001 Sep 15;154(6):495-503
58. Qin F., Yan C., Patel R., Liu W., Dong E. Vitamins C and E attenuate apoptosis, beta-adrenergic receptor desensitization, and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase downregulation after myocardial infarction. *Free Radic Biol Med.* 2006 May 15;40(10):1827-1842
59. Rahman Al-Nuaim A. High prevalence of metabolic risk factors for cardiovascular disease among Saudi population, aged 30-64 years. *Int J Cardiol.* 1997 Dec 19;62(3):227-235
60. Raij L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2006 Dec;8(12 Suppl 4):30-39
61. Rajagopalan S., Meng X.P., Ramasamy S., Harrison D.G., Galis Z.S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996 Dec 1;98(11):2572-2579
62. Rimm E.B., Katan M.B., Ascherio A., Stampfer M.J., Willett W.C. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med.* 1996 Sep 1;125(5):384-389

63. Roa G.N., Berk B.C. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992 Mar;70(3):593-599
64. Roginsky, V., Alegria, A.E. Oxidation of tea extracts and tea catechines by molecular oxygen. *J Agric Food Chem.* 2005 Jun 1;53(11):4529-4535
65. Sahnoun Z., Jamoussi K., Zeghal K.M. Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects. *Therapie.* 1997 Jul-Aug; 52(4):251-270
66. Seger R., Krebs E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995 Jun;9(9):726-735
67. Sheng R., Gu Z.L., Xie, M.L., Zhou W.X., Guo C.Y. EGCG inhibits cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy and protects cardiomyocytes from oxidative stress in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2007 Feb; 28(2):191-201
68. Shi X., Ye J., Leonard S.S., Ding M., Vallyathan V., Castranova V., Rojanasakul Y, Dong Z. Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibitory effects of Cr(VI)-induced DNA damage and Cr(IV)-or TPA-stimulated NF-kB activation. *Mol Cell Biochem.* 2000 Mar;206(1-2):125-132
69. Siddiqui I.A., Adhami V.M., Afaq F., Ahmad N., Mukhtar H. Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 1;91(2):232-242
70. Statistisches Bundesamt, Gesundheitswesen 2004
(www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php)

71. Stangl V., Dreger H., Stangl K., Lorenz M. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2007 Jan 15;73(2):348-358
72. Szasz T., Thakali K., Fink G.D., Watts S.W. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007Jan;232(1):27-37
73. Takei H., Strong J.P., Yutani C., Malcom G.T. Comparison of coronary and aortic atherosclerosis in youth from Japan and the USA. *Atherosclerosis.* 2005 May;180(1):171-179
74. Tavazzi B., Di Pierro D., Bartolini M., Marino M., Distefano S., Galvano M., Villani C., Giardina B., Lazzarino G. Lipid peroxidation, tissue necrosis, and metabolic and mechanical recovery of isolated reperfused rat heart as a function of increasing ischemia. *Free Radic Res.* 1998 Jan;28(1):25-37
75. Tsuneki H., Ishizuka M., Terasawa M., Wu J.B., Sasaoka T., Kimura I. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol.* 2004 Aug 26;4:18
76. Tsutsui H. Mitochondrial Oxidative Stress and Heart Failure. *Intern Med.* 2006;45(13):809-813
77. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10; 160 (1):1-40
78. Van Amelsvoort J.M., Van Hof K.H., Mathot J.N., Mulder T.P., Wiersma A., Tjibburg L.B. Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica.* 2001 Dec;31(12):891-901

79. Vinson J.A., Teufel K., Wu N. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *J Agric Food Chem.* 2004 Jun 2;52(11):3661-3665
80. Vita J. Tea consumption and cardiovascular disease: effects on endothelial function. *J Nutr.* 2003 Oct;133(10):3293-3297
81. Waltner-Law M.E., Wang X. L., Law B.K., Hall R.K., Nawano M., Granner D.K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):34933-34940
82. Wei H., Zhang X., Zhao J.F., Wang Z.Y., Bickers D., Lebwohl M. Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extracts from green and black teas. *Free Radic Biol Med.* 1999 Jun;26(11-12):1427-1435
83. World Health Report 2003 (www.who.int/whr/2003/en/)
84. World Health Organisation, Cardiovascular Disease: Prevention and Control (www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/)
85. Wu C.C., Hsu M.C., Hsieh C.W., Lin J.B., Lai P.H., Wung B.S. Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. *Life Sci.* 2006 May 15;78(25):2889-2997
86. Yang C.S., Chen L., Lee M.J., Balentine D., Kuo M.C., Schantz S.P. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Apr;7(4):351-354
87. Yang T.T., Koo M.W. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis.* 2000 Jan;148(1):67-73

88. Yang Y.C., Lu F.H., Wu J.S., Wu C.H., Chang C.J. The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Arch Intern Med* 2004 Jul 26;164(14):1534-1540
89. Yeh C.W., Chen W.J., Chiang C.T., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. Suppression of fatty acid synthase in MCF-7 breast cancer cells by tea and tea polyphenols: a possible mechanism for their hypolipidemic effects. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(5):267-76
90. Zhang M., Zhang B. H., Chen L. An W. Overexpression of heme oxygenase-1 protects smooth muscle cells against oxidative injury and inhibits cell proliferation. *Cell Res*. 2002 Jun,12(2):123-132

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl, für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und ihre umfassende Unterstützung.

Weiterhin danke ich dem Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Kardiologie und Angiologie, Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann, für die Möglichkeit der Promotion im kardiologischen Forschungslabor.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Henryk Dreger für seine herausragende Betreuung. Er war mir stets ein kompetenter und verlässlicher Ansprechpartner, der mich geduldig durch die Doktorarbeit begleitet hat, und auf dessen Unterstützung ich immer zählen konnte.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Mario Lorenz für seine Geduld, alle meine Fragen zu beantworten, und die Korrekturlesung meiner Doktorarbeit.

Darüber hinaus danke ich Wanda Michaelis und Mino Moobed sowie den übrigen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, die mir alle stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich stets unterstützt und motiviert haben.

Im Besonderen danke ich Daniel und Hannah, meiner kleinen Familie, die immer für mich da sind und mich auch in turbulenten Zeiten immer wieder aufgefangen und unterstützt haben.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Dreger H., Lorenz M., Kehrer A., Baumann G., Stangl K., Stangl V. Characteristics of Catechin- and Theaflavin-Mediated Cardioprotection. *Experimental Biology and Medicine* 233:427-433 (2008)

Abstract

Catechins and theaflavins—the main polyphenolic substances of green and black tea, respectively—exert a plethora of beneficial effects on the cardiovascular system. In a model of H₂O₂-mediated oxidative stress, we investigated the effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and theaflavin-3,3'-digallate (TF3) on neonatal rat cardiomyocytes. Pretreatment with EGCG or TF3 1 hr prior to induction of oxidative stress by H₂O₂ effectively protected cardiac myocytes as determined by measuring release of lactate dehydrogenase after 24 hrs. Longer pre-incubation times resulted in significant loss of protection. To enable further mechanistic insight, we investigated expression of anti-oxidative enzymes and activation of prosurvival signaling cascades. Whereas mRNA levels of glutathione peroxidase 3, superoxide dismutase 1, and catalase were not influenced by both polyphenols, heme oxygenase (HO-1) was selectively upregulated by EGCG—but not by TF3. However, inhibition of HO-1 did not diminish polyphenol-mediated cardioprotection. While EGCG and TF3 activated Akt, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase, inhibition of these kinases did not attenuate polyphenol-mediated protection. Loading of cardiomyocytes with dichlorofluorescein revealed that intracellular levels of reactive oxygen species were significantly reduced after treatment with EGCG or TF3 as early as 30 mins after induction of oxidative stress. In conclusion, activation of prosurvival signaling kinases and upregulation of antioxidative enzymes do not play a major role in tea polyphenol-mediated cardioprotection.

Key Words: oxidative stress • cardiac myocytes • epigallocatechin-3-gallate • theaflavin-3,3'-digallate • heme oxygenase 1

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Alexandra Kehrer, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Kardioprotektive Eigenschaften der Teepolyphenole Epigallocatechin-3-gallat und Theaflavin-3,3'-digallat“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 23. Juli 2009 Alexandra Kehrer