



Modulation Insulin-responsiver Signalwege durch Flavonoide

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

André Bartholome

aus Dortmund

Düsseldorf, März 2010

aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH
Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz
Korreferent: Prof. Dr. Andreas Paul M. Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2010

Für meine Eltern

...concordia regna

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 GRÜNER TEE ALS QUELLE FÜR POLYPHENOLE	1
1.1.1 <i>Catechine aus grünem Tee</i>	2
1.1.2 <i>Physiologische Wirkung von Flavonoiden</i>	4
1.1.3 <i>Einfluss von EGCG auf zelluläre Signalkaskaden</i>	6
1.2 ZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION	9
1.2.1 <i>Insulin-responsive Signaltransduktion über den PI3K/Akt-Signalweg</i>	9
1.2.2 <i>Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf den PI3K/Akt Signalweg</i>	13
1.2.3 <i>Bildung von ROS in der Zellkultur bei der Arbeit mit EGCG</i>	13
1.3 FOXO-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	14
1.3.1 <i>Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch die Akt</i>	14
1.3.2 <i>Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch weitere Faktoren</i>	16
1.3.3 <i>FoxO-Zielgene und deren Bedeutung</i>	17
1.4 DER ZU PI3K/AKT/FOXO HOMOLOGE SIGNALWEG IN <i>C.ELEGANS</i>	19
1.5 ZIELSETZUNG	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
PLASMIDE UND REAGENZIEN	23
2.1 ZELLKULTUR.....	23
2.1.1 <i>Anzucht von Zellen</i>	23
2.1.2 <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	24
2.1.3 <i>MTT-Test zur Viabilitätsbestimmung</i>	25
2.1.4 <i>Neutralrot-Test zur Viabilitätsbestimmung</i>	26
2.1.5 <i>Behandlung von Zellen mit Flavonoiden und anderen Komponenten</i>	26
2.1.6 <i>Behandlung von Zellen unter Verwendung von Inhibitoren</i>	27
2.1.7 <i>Transiente Transfektion</i>	27
<i>Midi/Maxi-Präparation von Plasmid-DNA</i>	27
<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	28
2.2 PROTEINANALYTIK	28
2.2.1 <i>Protein-Quantifizierung nach Bradford (Bradford 1976)</i>	28
2.2.2 <i>Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951)</i>	28

2.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.2.4 Elektro-Transfer von Proteinen auf PVDF- oder Nitrocellulose-Membranen (Western-Blot)	30
2.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen	31
2.2.6 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)	33
2.2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie	33
2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie	34
2.2.9 DNA-Bindung durch FoxO	35
2.3 RNA-ANALYTIK	36
2.3.1 RNA-Isolierung	36
2.3.2 Quantifizierung von RNA	36
2.3.3 Reverse Transkription	36
2.3.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR)	36
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.4 CAENORHABDITIS ELEGANS	39
2.4.1 Anzucht von <i>C. elegans</i>	39
2.4.2 Behandlung von <i>C. elegans</i> mit EGCG	40
2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie	41
2.5 MESSUNG VON WASSERSTOFFPEROXID (H ₂ O ₂)	41
2.6 DENSITOMETRIE	42
3. ERGEBNISSE	43
3.1 VIABILITÄT VON HFFF2-ZELLEN NACH EGCG-BEHANDLUNG	43
3.2 EINFLUSS VON GRÜNTÉE-CATECHINEN AUF DEN PI3K/AKT/FOXO-SIGNALWEG	45
3.2.1 Insulin-mimetische Stimulierung der Akt-Phosphorylierung durch EGCG	45
3.2.2 FoxO-Phosphorylierung in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit Grüntee- Catechinen	49
3.2.3 Nachweis für PI3K-Abhängigkeit der Insulin-mimetischen Aktivierung des Akt/FoxO Signalwegs durch EGCG	50
3.3 DIE ROLLE VON WASSERSTOFFPEROXID IN DER AKTIVIERUNG DES PI3K/AKT/FOXO- SIGNALWEGS DURCH EGCG	52
3.3.1 Bildung von Wasserstoffperoxid durch EGCG in Zellkulturmedium	52
3.3.2 Aktivierung von Akt durch EGCG über Wasserstoffperoxid	56
3.4 MODULATION VON FOXO-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	57

3.4.1 Modulation der subzellulären Lokalisation sowie der Aktivität von FoxO- Transkriptionsfaktoren.....	58
3.5 UNTERSUCHUNG DER INSULIN-ANTAGONISTISCHEN WIRKUNG VON EGCG	76
3.5.1 Einfluss von Grüntee-Catechinen auf die c-Jun N-terminale Kinase (JNK)	76
3.5.2 Einfluss von EGCG auf die Aktivierung von Akt über den EGF-Rezeptor	78
3.5.3 Stimulierung der Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Harmin	79
4. DISKUSSION	82
4.1 EINFLUSS VON GRÜNTEE-CATECHINEN AUF DEN INSULIN-RESPONSIVEN PI3K/AKT/FOXO- SIGNALWEG.....	82
4.2 DIE BILDUNG VON H ₂ O ₂ DURCH EGCG UND DIE AKTIVIERUNG DER PI3K/AKT/FOXO- SIGNALKASKADE.....	84
4.3 DIE PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DER BILDUNG VON H ₂ O ₂ DURCH EGCG.....	86
4.4 MODULATION VON FOXO-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DURCH FLAVONOIDE.....	88
4.5 MODULATION DER FOXO-ZIELGENEXPRESSSION DURCH EGCG.....	91
4.6 INSULIN-ANTAGONISTISCHE WIRKUNG VON EGCG.....	92
5. ZUSAMMENFASSUNG	96
Summary.....	97
6. LITERATURVERZEICHNIS	98
Danksagung.....	110

Abkürzungsverzeichnis

AGE-1	AGEing alteration family member
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivatorprotein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAD	Bcl2 antagonist of cell death
Bcl2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaare
bdest.	bdestilliert
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CDK	Cyclinabhängige Kinase (cyclin-dependentkinase)
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CK1	casein kinase 1
DAF	dauer formation
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBE	DAF-16-Bindeelement
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DYRK	Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
ECL	enhanced chemiluminescence

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGC	Epigallocatechin
EGC	Epigallocatechingallat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazellulär regulierte Kinasen
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor
Fox	Forkhead Box
FoxO	Forkhead Box Gruppe O
G6Pase	Glukose 6-Phosphatase
GADD	growth arrest and DNA damage response
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK3	Glycogensynthasekinase-3
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HNF	hepatischer nukleärer Faktor
IC ₅₀	Konzentration der Substanz, die zu einer 50 %-igen Hemmung des jeweiligen Effektes führt
IGF	Insulin-like growth factor (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IKat	Inaktivierte Katalase
IκB	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase
IRE	Insulin-responsives Element
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase

Kan	Kanamycin
Kat	Katalase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIP	Kinase-Inhibitor Protein
Konz.	Konzentration
Ktrl.	Kontrolle
Lsg.	Lösung
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MAPK	mitogen activated protein kinase
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
NES	Kernexportsequenz (nuclear export sequence)
NFκB	nuclear factor κB
NGM	nematode growth media
NLS	Kernlokalisationssequenz (nuclear localisation sequence)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PGC-1α	PPARγ Coactivator-1α
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphoinositid 3'-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat
PTEN	phosphatase and tensin homolog

PTP(asen)	Proteintyrosinphosphat(asen)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfat)
SDS- Gel	SDS-Gel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SGK	Serum and glucocorticoid-inducible kinase
SH2-Domäne	Src-homology 2-Domäne
SHIP	Src-homology inositol phosphatase
SIRT	silent information regulator 2
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS + Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	units (Enzymeinheiten)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Grüner Tee als Quelle für Polyphenole

Bei den Polyphenolen handelt es sich um aromatische Verbindungen, die zwei oder mehr an den aromatischen Ring gebundene Hydroxylgruppen enthalten (Wan et al., 2005). Sie fungieren in Pflanzen als Farbstoffe (Flavonoide, Anthocyane), Geschmacksstoffe (Schutz vor Prädatoren) und Tannine, als Grundbausteine wichtiger Biopolymere wie Lignin und Suberin und zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen.

In der Nahrung gibt es viele Quellen für Polyphenole, die weiten Teilen der Weltbevölkerung zugänglich sind (Chen et al., 2008). Zu den Polyphenolen gehört die Gruppe der Flavonoide, die in rotem Traubensaft und Rotwein, Kakao und Schokolade, diversen Obstarten und Fruchtsäften, grünen Pflanzenteilen und Zwiebeln sowie grünem und schwarzem Tee zu finden sind. Speziell Tee ist nach Wasser das meist konsumierte Getränk der Welt. In Deutschland liegt der jährliche Pro-Kopf-Konsum bei etwa 25 L. Weltweit werden jährlich etwa 3,5 Mio. Tonnen Tee produziert (Körner M. 2007). Der Anteil des konsumierten grünen Tees im asiatischen Raum ist wesentlich größer als der von schwarzem Tee, im europäischen Raum und damit auch Deutschland ist dies umgekehrt (Graham 1992). Der Unterschied zwischen grünem und schwarzem Tee ergibt sich erst durch die Herstellung, denn obwohl beide Teesorten unterschiedliche Polyphenolverbindungen beinhalten, stammen sie aus derselben Pflanze, *Camellia sinensis*, die bereits vor 2000 Jahren im alten China und Südostasien kultiviert wurde (Balentine et al., 1997; Graham 1992).

1.1.1 Catechine aus grünem Tee

Die Catechine, eine Untergruppe der Flavonoide, bleiben in grünem Tee in ihrer ursprünglichen Form erhalten. Es gibt mit Flavonen, Flavanonen, Isoflavonen, Flavonolen, Flavanolen und Anthocyaninen insgesamt sechs Untergruppen der Flavonoide, wobei die Catechine zu den Flavanolen gehören (Ternes W et al., 2005). Zu dieser Gruppe gehören die vier Hauptcatechine des grünen Tees, Epicatechin (EC), Epicatechin-3-gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-gallat (EGCG). In Abbildung 1.1A sind die Strukturformeln dieser vier Flavonoide zusammenfassend dargestellt. Der Unterschied zwischen Epicatechin und Catechin liegt in ihrer Konformation. Bei den Epicatechin-Abkömmlingen stehen die Hydroxyl- bzw. Gallat-Gruppen am C3 zu dem B-Ring an C2 in cis-Stellung, bei den Catechin-Derivaten in trans-Stellung (Ternes W et al., 2005).

Zur Gewinnung grünen Tees werden die frisch geernteten Blätter nicht fermentiert, sondern vor dem Trocknen bedampft, was eine Inaktivierung der Polyphenol-Oxidase zur Folge hat. Bei der Herstellung von schwarzem Tee jedoch wird die Polyphenol-Oxidase in den Teeblättern durch den Fermentationsvorgang aktiviert. Dabei polymerisieren die Polyphenole zu Verbindungen wie Thearubigenen und Theaflavinen (Lorenz et al., 2004; Menet et al., 2004). So ist die Gruppe der Catechine in schwarzem Tee nur noch mit etwa 20% am Flavonoidanteil vertreten. In grünem Tee macht diese Gruppe etwa 80% der Flavonoide aus (Balentine et al., 1997). Der jeweilige Anteil der vier verschiedenen Catechine an den im Tee enthaltenen Flavonoiden ist in Abbildung 1.1B dargestellt.

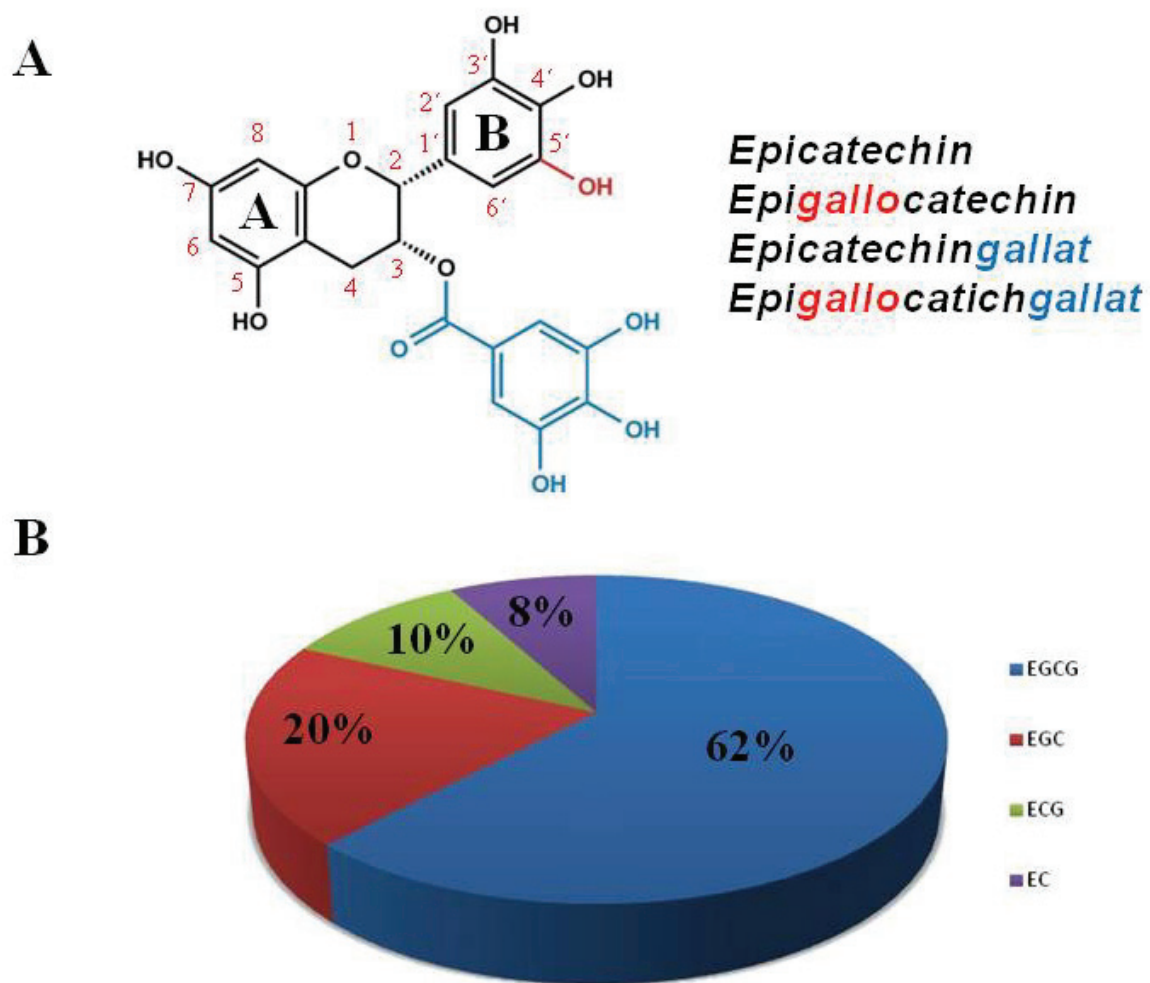


Abb.1.1: Flavonoide aus grünem Tee

A) Strukturformeln der vier Grüntee-Catechine; Epicatechin (EC), Epicatechin-3-gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-gallat (EGCG). B) Anteil der vier Grüntee-Catechine am Gesamtflavonoidanteil in chinesischem Longjing Tee. (Li et al., 2007).

Der Polyphenolanteil macht 30-40% der Trockenmasse des grünen Tees aus (Lambert & Yang 2003; Yang et al., 2006). So kommt es, dass in heiß gebrühtem Tee Flavonoidkonzentrationen von 541-692 µg/ml (Hakim et al., 2000) zu finden sind. Im Blut (Gesamtblut) von Vielteetrinkern werden Konzentrationen von bis zu 1 µM EGCG, dem prominentesten Catechin aus grünem Tee, gefunden (Yang 1997).

1.1.2 Physiologische Wirkung von Flavonoiden

Auf die im grünen Tee enthaltenen Flavonoide werden zahlreiche für den grünen Tee beobachtete positive physiologische Wirkungen zurückgeführt.

So zeigte eine Kohortenstudie mit 8000 japanischen Teilnehmerinnen, dass die tägliche Aufnahme von mindestens zehn Tassen grünen Tees das Risiko des Auftretens von Brustkrebs zu reduzieren scheint. Weiterhin hatten japanische Brustkrebspatientinnen, die mehr als fünf Tassen grünen Tees pro Tag tranken, eine geringere Rückfallrate und eine längere krankheitsfreie Zeitspanne als diejenigen, die weniger als vier Tassen tranken (Fujiki 1999). Bei dieser Studie ist allerdings zu berücksichtigen, dass diese Ergebnisse nicht zwangsläufig auf die westliche Bevölkerung übertragbar sind, da Brustkrebs in Japan seltener auftritt. Weiter könnten regional bedingte Unterschiede in den Beobachtungsbedingungen wie ernährungsbedingte Risikofaktoren (z. B. Verzehr von Fett und rotem Fleisch) zwischen westlichen Ländern und Japan das Ergebnis beeinflussen. Doch in Studien in Europa konnte eine antikanzerogene Wirkung von Tee beobachtet werden. Eine 15 Jahre dauernde, prospektive Studie aus Stockholm mit 61.057 Frauen berichtet über eine signifikante inverse Assoziation zwischen dem Auftreten von Ovarialkarzinomen und Teekonsum (Larsson & Wolk 2005). In diesem Zeitraum wurde bei 301 Teilnehmerinnen invasiver Ovarialkrebs diagnostiziert. Bei Konsum von Tee nahm die Anzahl der Neuerkrankungen signifikant und dosisabhängig ab. Der Konsum von einer Tasse Tee pro Tag führte zu einem um 18% verringerten Risiko, an Ovarialkrebs zu erkranken.

Erhöhter Teekonsum wird auch mit geringerer Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. In einer Studie an 1900 Patienten, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten, war bei Patienten, die im Jahr vor dem Ereignis bis zu 14 Tassen Tee pro Woche getrunken hatten, die Mortalität um 20% gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt. Hatten sie mehr als 14 Tassen pro Woche konsumiert, verminderte sich die Mortalität sogar um die Hälfte im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Mukamal et al., 2002). In einer umfangreichen, prospektiven Kohorten-Studie mit 40530 Teilnehmern ohne kardiogene oder kanzerogene Vorerkrankungen über sieben Jahre aus Japan wurde beobachtet, dass der Konsum

von Tee, speziell von grünem Tee, die Verringerung der kardiovaskulären Mortalität und der Gesamtmortalität gegenüber den Kontrollgruppen verursachen konnte (Kuriyama et al., 2006).

In der Zutphen Elderly Study wurden 805 Männer in einem Alter zwischen 65 und 84 Jahren über einen Zeitraum von fünf Jahren beobachtet. Anhand von Analysen des Gehalts an Flavonoiden in verschiedenen Lebensmitteln wurde ermittelt, dass die Probanden über die Nahrung durchschnittlich 25,9 mg Flavonoide pro Tag einnahmen, wobei Tee (61%), Äpfel (10%) und Zwiebeln (13%) die Hauptlieferanten darstellten. Die Studie konnte zeigen, dass ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Einnahme von Flavonoiden und der Mortalitätsrate durch koronare Erkrankungen vorliegt (Hertog et al., 1993).

Eine Reihe weiterer Studien berichten ebenfalls von schützenden Effekten vor KHK oder dem Schlaganfall (Arts et al., 2001; Hertog et al., 1997; Kuriyama et al., 2006; Nakachi et al., 2000; Sesso et al., 1999; Stangl et al., 2006).

In der Literatur sind eine Vielzahl weiterer Humanstudien zu finden, in denen die beobachteten Effekte auf Flavonoide zurückgeführt wurden. Untersuchungen mit isolierten Flavonoiden wurden in der Vergangenheit vornehmlich an Tiermodellen vorgenommen

So führte in einer Studie mit einem transgenen Mausmodell für Prostatakarzinome die orale Zufuhr von 0,1% Flavonoiden aus grünem Tee zu einer Verringerung der Inzidenz von Karzinomen um 65%. Tiere aus der Kontrollgruppe, die nur Wasserplacebo verabreicht bekommen hatten, wiesen mit 25-95% eine hohe Rate an metastasierten Individuen auf. Biochemische und histologische Analysen wiesen eine signifikante Verringerung der Proliferation und eine um das 10-fache gesteigerte Apoptose von Tumorzellen nach (Gupta et al., 2001) .

In einer Studie, in der EGCG topisch auf die Haut von Mäusen des Stamms SKH-1 appliziert wurde, die zuvor 20 Wochen lang zweimal wöchentlich UVB-Bestrahlungen ausgesetzt wurden, traten Tumore der Haut in 55-66% Fällen weniger auf als in der Kontrolle. Zusätzlich wurde über immunohistochemische Messungen für Caspase-3 positive Zellen eine Steigerung des Apoptose-Index für Tumore um 56–92% nachgewiesen (Lu et al., 2002).

Huang *et al.* untersuchten den Einfluss der aus grünem Tee gewonnenen Catechine EGCG, EGC, EC und ECG, auf die Kontraktion von Mesenterialarterien der Ratte. Sie beobachteten, dass alle vier Substanzen eine durch Phenylephrin-induzierte Kontraktion dosisabhängig abschwächten, wobei EGCG die Kontraktion am wirksamsten unterdrückte (Huang *et al.*, 1998). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass aufgereinigte Catechine, insbesondere EGCG, eine endothelabhängige Vasodilatation in vorkontrahierten Rattenaorten induzieren (Lorenz *et al.*, 2004). Vermittelt wurde dieser Effekt über eine schnelle Aktivierung der endothelialen NO-Synthase durch EGCG. Es konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung posttranslational über eine Phosphatidylinositol-3-kinase-, Proteinkinase A- und Akt-abhängige Phosphorylierung der eNOS geschieht. Der eNOS-Proteingehalt wurde dabei durch EGCG nicht beeinflusst (Lorenz *et al.*, 2004).

Außerdem ist EGCG dazu in der Lage, unter sonst letalen, oxidativen Stress-Bedingungen positiv auf das Überleben des *in vivo*-Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) zu wirken. Durch eine 48-stündige Behandlung mit 220 µM EGCG konnte die Überlebensrate des Wildtypstamms N2 unter letalem oxidativen Stress (24-stündige Behandlung mit 80 µM Juglon) um 65,05% erhöht werden. Durch die tägliche Behandlung mit ebenfalls 220 µM EGCG wurde die mittlere Lebensspanne von *C.elegans* um 10,14% erhöht (Abbas & Wink 2009).

Die intraperitoneale Injektion von EGCG, jedoch nicht die von anderen Catechin-Derivaten, führte in Ratten (15mg/Individuum) nach 7 Tagen zu einer signifikanten Senkung des Blutglukose- und Insulinspiegels (Kao *et al.*, 2000). Hierzu ergänzend ist eine andere Studie zu erwähnen, in der gezeigt werden konnte, dass ein Extrakt aus grünem Tee den Glukosemetabolismus in Adipocyten der Ratte steigert (Broadhurst *et al.*, 2000).

1.1.3 Einfluss von EGCG auf zelluläre Signalkaskaden

Wie beschrieben weisen die Catechine aus grünem Tee eine Vielzahl positiver physiologischer Wirkungen auf. EGCG stellt in verschiedenen Studien das wirksamste Catechin dar oder ist als einziges der Catechinderivate wirksam. EGCG

ist in der Lage, auf verschiedene zelluläre Signalkaskaden und daran beteiligte Biomoleküle direkt Einfluss zu nehmen und so die im Kapitel 1.1.2 beschriebenen Effekte zu bewirken. Im Folgenden werden einige Beispiele für den Einfluss von EGCG auf zelluläre Signalkaskaden besprochen.

Katiyar *et al.* zeigten, dass 40 µM EGCG die Bildung von H₂O₂ in UVB-behandelten NHEK (normal human epidermal keratinocytes) um 66–80% verringert. Diese antioxidative Aktivität korrelierte mit einer Inhibierung der UVB-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2, JNK (jun **N**-terminal kinase) und p38 (Katiyar *et al.*, 2001). Auch in einer Studie mit epidermalen Zellen der Maus (JB6) wurde für eine Behandlung mit EGCG in einer Konzentration von 5-20 µM eine Reduzierung der JNK-Aktivität nachgewiesen, die in einer Inhibierung der Bindung von AP-1 an seine Ziel-DNA-Sequenz resultierte (Dong 2000). Ebenfalls in dieser Studie zeigte sich bei der topischen Applikation von EGCG auf die Haut von transgenen Mäusen (B6D2), die ein die AP1-Bindesequenz tragendes Luciferasereporter-Konstrukt exprimierten, eine Reduktion der UVB-induzierten Transkription des Reportergens um 60% (Dong 2000).

Für EGCG wurde desweiteren eine Inhibierung der Aktivität der IκB (Inhibitor von NF-**κ**B) Kinase in TNFα (tumor necrosis factor **α**)-stimulierten intestinalen Epithelzellen (IEC-6) und in Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten murinen Makrophagen (RAW 264.7) gezeigt (Pan *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). In beiden Fällen wurde die Degradation von IκB sowie die Aktivität von NFκB als Antwort auf die Stimulation mit EGCG verringert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Ahmad *et al.*. Sie wiesen in TNFα- und LPS-stimulierten humanen Karzinomzellen der Epidermis (A431) nach, dass die Behandlung mit EGCG die Aktivität von NFκB inhibiert (Ahmad *et al.*, 2000). Dieser Effekt wurde auch hier durch die Inhibierung der IκB-Phosphorylierung und Degradation vermittelt.

Die Überexpression von Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie des EGF (epidermal **g**rowth **f**actor)/EGF-Rezeptors oder PDGF (platelet-derived **g**rowth **f**actor)/PDGF-Rezeptors führt zu einer verstärkten Proliferation von Tumorzellen (Masuda *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass die Blockade der Wachstumsfaktor-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion durch kompetitive Hemmung mit Liganden oder der Inhibierung beteiligter Kinasen

das Wachstum von humanen HNSCC-Zellen (head and neck squamous cell carcinoma) inhibiert und zur Apoptose führt. Masuda *et al.* wiesen nach, dass die Behandlung von HNSCC-Zellen mit 20 μM EGCG zu einer Inhibierung der TGF α -vermittelten EGF-R, ERK und Stat-3 Phosphorylierung führt. Dadurch kam es zu einer Blockade des Zellzyklus während der G0/G1-Phase und einer Induktion von Apoptose (Masuda et al., 2001). Mittels eines *in-vitro* Kinase-Assays demonstrierten Liang *et al.*, dass EGCG in humanen A431-Zellen (Epidermiskarzinomzellen) mit einem IC50-Wert von 1-2 μM die Kinaseaktivität des EGF-, des PDGF- und des Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptors hemmt (Liang et al., 1997).

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass EGCG ein wirksamer Inhibitor der DYRK1a (**d**ual-specificity **tyrosine** phosphorylation-regulated **k**inase **1**) ist, welche unter anderem FoxO-Transkriptionsfaktoren (siehe Kapitel 1.3.2) als Substrat hat (Bain et al., 2003b).

Weiter wirkt EGCG wie Insulin inhibierend auf die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) und die Glukose 6-Phosphatase (G6Pase), bei denen es sich um Schlüsselenzyme der Glukoneogenese handelt. Es wurde gezeigt, dass EGCG die Expression von PEPCK und G6Pase sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene inhibiert. Dieser inhibierende Effekt war in seiner Dauer vergleichbar mit dem von Insulin. Weiter konnte die Inhibierung der PEPCK- und G6Pase-Expression durch EGCG, wie auch durch Insulin unter Verwendung von Inhibitoren der Phosphoinositid 3'-Kinase (PI3K) komplett aufgehoben werden (Waltner-Law et al., 2002).

Es wurde auch gezeigt, dass EGCG die Wirkung von Insulin auf molekularer Ebene imitiert. Es ist mittlerweile bekannt, dass die Insulin-Signalkaskade über die Phosphoinositid-3'-Kinase (PI3K) durch EGCG stimuliert wird, was zu der Phosphorylierung von FoxO- (**f**orkhead **box**, class **O**) Transkriptionsfaktoren führt (Anton et al., 2007).

1.2 Zelluläre Signaltransduktion

Zellen sind dazu in der Lage, auf hormonelle Signale entfernter Gewebe sowie direkt benachbarter Zellen zu reagieren. Diese extrazellulären Signale werden über die Zellmembran in die Zelle transferiert. Das wird durch membranständige Rezeptorproteine mit extra- und intrazellulären Domänen ermöglicht, welche durch extrazelluläre Liganden wie Hormone aktiviert werden. So aktiviert, geben die Rezeptorproteine das Signal intrazellulär, häufig durch Phosphorylierung von spezifischen Proteinen, weiter. Die Phosphorylierung erfolgt reversibel an Threonin-, Tyrosin- oder Serinresten der Zielproteine. Durch die Phosphorylierung können Ladungs- oder Konformationsänderungen der Zielproteine auftreten. Dadurch kann die Aktivität der betroffenen Proteine entweder gesteigert oder bis zur völligen Inaktivierung vermindert werden. Auch die subzelluläre Lokalisierung kann verändert werden. Welche der beschriebenen Auswirkungen auftreten, hängt von den jeweils betroffenen Proteinen ab.

Wird auf diesem Weg die Aktivität von Enzymen beeinflusst, verlaufen die Auswirkungen auf den Metabolismus meist schnell. Außerdem können die Auswirkungen auf den Metabolismus sehr kurzfristig sein, wenn das für die Aktivitätsveränderung verantwortliche Signal wieder ausbleibt. Werden jedoch Transkriptionsfaktoren beeinflusst, kann es zu Veränderungen von Expressionsprofilen verschiedenster Proteine kommen, was längerfristige Wirkungen nach sich zieht.

1.2.1 Insulin-responsive Signaltransduktion über den PI3K/Akt-Signalweg

Die Phosphoinositid 3'-Kinase (PI3K), eine Lipidkinase, kann nach dem beschriebenen Prinzip (Kap. 1.2) durch verschiedenste Stimuli, darunter auch Insulin, über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktiviert werden.

Bei Säugern wird Insulin in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet, welche sich in den Langerhansschen Inseln befinden. Es handelt sich hierbei um ein

Peptidhormon, dessen Name sich ursprünglich von eben diesen Inseln ableitet. Die wichtigste Funktion von Insulin, die von keinem anderen Hormon ausgeübt wird ist die Fähigkeit, den Blutzuckerspiegel zu senken. Ein bedeutender Antagonist des Insulins ist das Glucagon, das maßgeblich für die Steigerung des Blutzuckerspiegels verantwortlich ist. Aber auch Adrenalin, Kortisol und Schilddrüsenhormone sind dazu in der Lage, den Blutzuckerspiegel anzuheben.

Neben der Wirkung der Blutzuckerspiegelsenkung hat Insulin Einfluss auf den Fett- und Aminosäurestoffwechsel, auf den Kaliumhaushalt, sowie auf die Regulation von Zellwachstum und Proliferation.

Die Aktivierung der PI3K durch Insulin oder andere Wachstumsfaktoren erfolgt über vorgeschaltete Rezeptortyrosinkinasen (RTK) (Cantley 2002; Liang & Slingerland 2003).

Es existieren mehrere PI3K-Isoformen. Im Falle der durch Wachstumsfaktoren induzierten Bildung von Phosphatidylinositol-3',4',5'-trisphosphat (PIP₃) handelt es sich um Kinasen der Klasse IA (Fruman et al., 1998). Die PI3K selbst wird durch aktivierte RTK oder Adapterproteine (z.B. Insulinrezeptorsubstrat-1, IRS-1) aktiviert und katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf das C3-Atom des Inositolrings des Phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphats (PIP₂), wodurch PIP₃ generiert wird (Cantley 2002; Datta et al., 1999). Wird PIP₃ durch das Phosphatase- und Tensin-Homolog PTEN oder die Lipidphosphatase SHIP dephosphoryliert, bleibt die Aktivierung der weiteren Signalkaskaden aus (Carracedo & Pandolfi 2008).

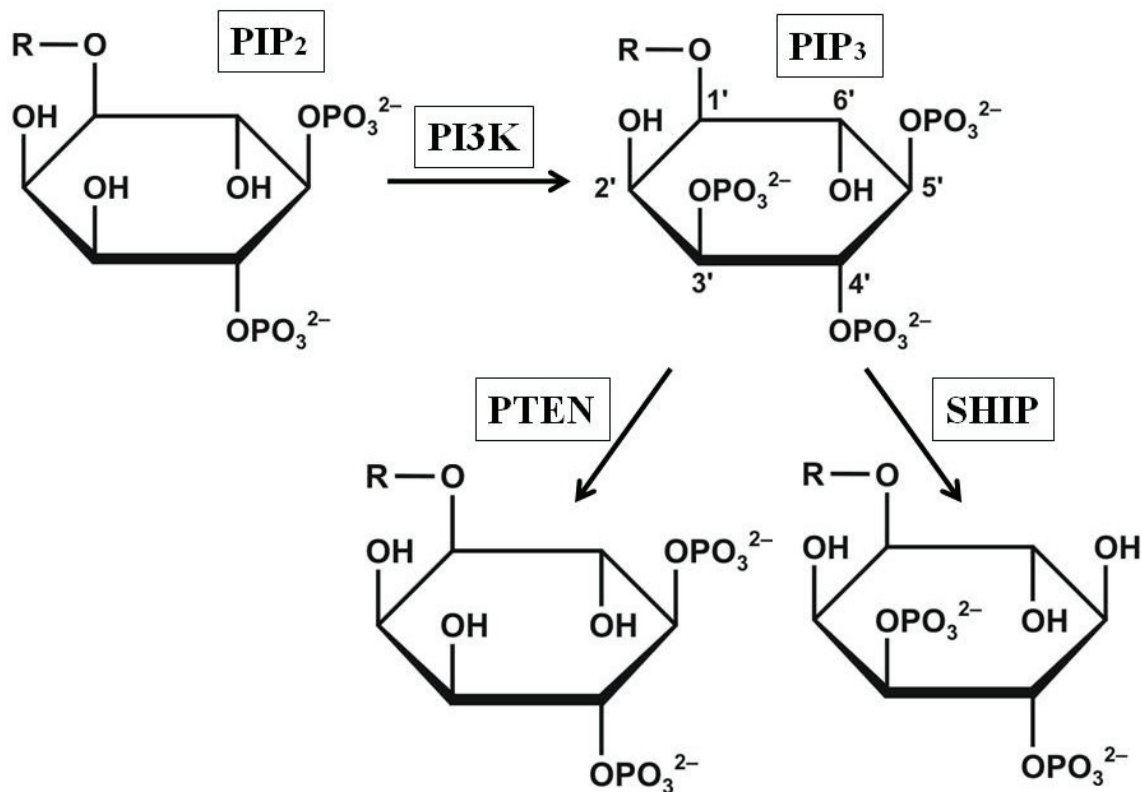


Abb.1.3: PI3K-induzierte Bildung und der Abbau von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃)

Die PI3K phosphoryliert PIP₂ und aktiviert es somit zu PIP₃. Durch PTEN und SHIP kann PIP₃ wieder dephosphoryliert werden.

Die Kinase Akt

Akt, oder Proteinkinase B (PKB), wurde nach dem Namen des zugehörigen Gens benannt. Dieses Gen wurde 1991 als onkogenes, virales Gegenstück zu der eukaryotischen Serin/Threonin-Kinase im Retrovirus AKT8 entdeckt (Bellacosa et al., 1991; Staal et al., 1977). Über den PI3K/Akt Signalweg ist Akt unter anderem an der Regulation von Apoptose, Proliferation und Stoffwechsel beteiligt (Datta et al., 1999; Liang & Slingerland 2003). Die Aktivierung von Akt erfolgt initial durch die Bindung ihrer PH-Domäne an PIP₃ (Datta et al., 1995). Dadurch wird sie an die Zellmembran rekrutiert, wo sie von anderen Kinasen wie PDK1 und mTORC2 an den Aminosäuren Serin(473) und Threonin(308) phosphoryliert und somit aktiviert wird (Alessi et al.,

1996; Balendran et al., 1999). So aktiviert, kann Akt von der Zellmembran in andere Zellkompartimente wie den Zellkern translozieren und Zielproteine an Serin- oder Threoninresten phosphorylieren. Abhängig von dem Zielprotein führt dies zu einer Aktivierung oder Inaktivierung. Beispiele für direkte Substrate von Akt sind die GSK3 (**G**lycogen**s**ynthase**k**inase-**3**), welche unter anderem beteiligt ist an der Regulation der Zellproliferation, oder Proteine, die verantwortlich sind für die Regulation der Apoptose, wie Bad oder die Caspase 9. Auch IKK (**I**kB **K**inase), welches über IκB an der Regulation von NF-κB beteiligt ist, oder auch die Mitglieder der FoxO-Familie, die an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind, sind direkte Substrate der Akt (Cardone et al., 1998; Cross et al., 1995; Datta et al., 1997; Ogg et al., 1997; Ozes et al., 1999; Wang et al., 1999) (siehe Abbildung 1.4).

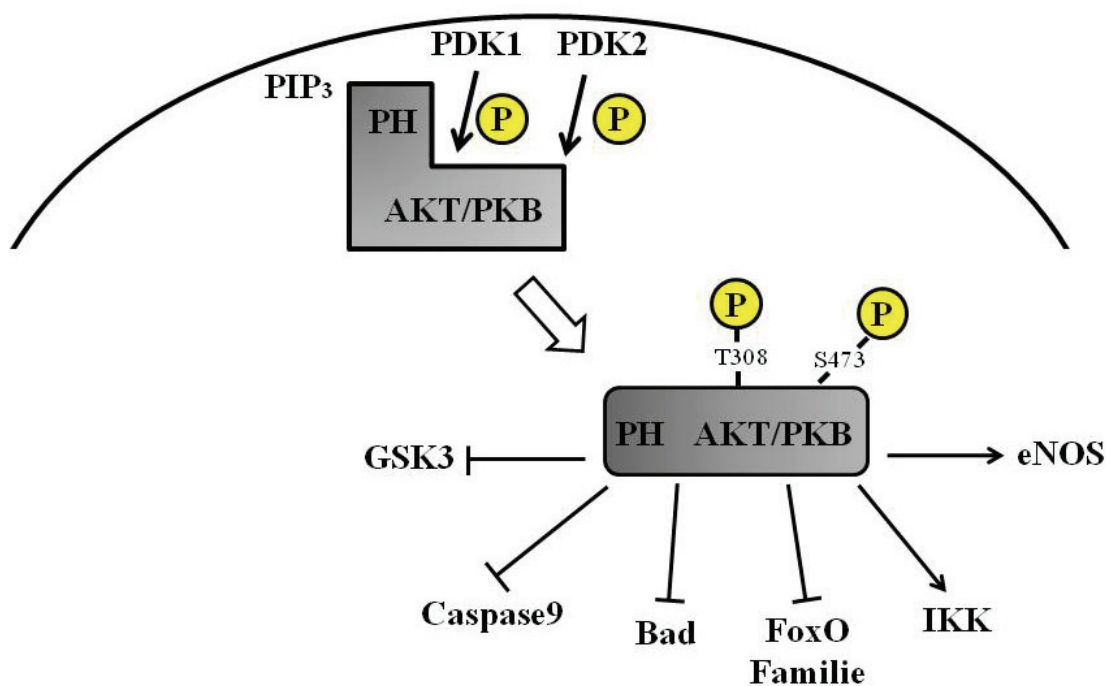


Abb. 1.4: Aktivierung von Akt und seine Substrate

Akt bindet mit seiner PH-Domäne an PIP₃ an der Zellmembran. Durch PDKs wird die Akt an Thr-308 und Ser-473 phosphoryliert und aktiviert. Aktive Akt-Kinase kann von der Zellmembran in andere Zellkompartimente translozieren und phosphoryliert ihrerseits andere Proteine wie die GSK3, Caspase9, Bad, Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie, IKK oder eNOS. Diese Phosphorylierung kann abhängig vom Zielprotein entweder aktivierende oder inhibierende Wirkung haben.

1.2.2 Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf den PI3K/Akt Signalweg

Wie Insulin sind auch ROS in moderater Menge in der Lage, den PI3K/Akt Signalweg zu aktivieren. Große Mengen an ROS hingegen führen zur Inhibition des PI3K/Akt Signalwegs und zum Zelltod (Leslie 2006). Auch PTEN ist redoxsensitiv. Es wurde beschrieben, dass PTEN durch ROS inhibiert werden kann, wodurch die Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs stimuliert wird (Lee et al., 1998; Yu et al., 2005). So ist auch Wasserstoffperoxid als ein starker Aktivator der Akt beschrieben (Barthel & Klotz 2005). Akt kann oxidiert werden, was zu einer Inaktivierung der Kinase führt (Murata et al., 2003).

1.2.3 Bildung von ROS in der Zellkultur bei der Arbeit mit EGCG

In der Literatur existieren mehrere Verweise auf die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei dem Einsatz von phenolischen Komponenten wie EGCG bei Zellkulturarbeiten (Lapidot et al., 2002; Long et al., 2000). Vor allem bei der Verwendung des weit verbreiteten Zellkulturmediums DMEM (**D**ulbecco's **m**odified **E**agle's **m**edium) scheint dieser Effekt aufzutreten (Halliwell 2003; Long et al., 2007). Im Fall von EGCG gibt es unter den verschiedenen Chargen Unterschiede, was die Fähigkeit H_2O_2 zu generieren angeht (diese Arbeit). Es ist bekannt, dass auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Chargen des Zellkulturmediums zu unterschiedlich starker Bildung von H_2O_2 aus den zugefügten Komponenten führen können (Clement et al., 2001; Long et al., 2000). Durch die Oxidation von EGCG kann Wasserstoffperoxid entstehen, das durch Pyruvat abgefangen werden kann (Long & Halliwell 2009). Metallionen, besonders Eisen, scheinen bei der Entstehung von H_2O_2 eine wichtige Rolle zu spielen, da sie in der Lage sind, mit phenolischen Komponenten zu interagieren und Redox-Reaktionen zu katalysieren (Halliwell & Gutteridge 1992; Wee et al., 2003).

1.3 FoxO-Transkriptionsfaktoren

Bei den Proteinen der FoxO (**F**orkhead-**B**ox Class **O**)-Familie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Sie stellen bei den Säugern eine von neunzehn Klassen (A bis S) dar, welche alle die namensgebende DNA-Bindedomäne, die Forkhead-Box besitzen (Kaestner et al., 2000). Über diese Domäne binden die FoxO-Transkriptionsfaktoren an die Konsensussequenz TT(G/A)TTTAC, was essentiell für die transkriptionelle Aktivierung der FoxO-Zielgene ist (Tsai et al., 2007). Die Konsensussequenz wird auch FRE (**F**oxO-**r**esponsive **e**lement) oder DBE (**D**AF-16-**b**inding **e**lement) genannt (Furuyama et al., 2000).

Innerhalb der FoxO-Familie gibt es 4 Isoformen; FoxO1a (Nakae et al., 1999; Rena et al., 1999), FoxO3a (Brunet et al., 1999), FoxO4 (Kops et al., 1999) und FoxO6 (Jacobs et al., 2003). Bei Säugern werden FoxO1a (FKHR), FoxO3a (FKHRL1) und FoxO4 (AFX) ubiquitär in allen Geweben exprimiert, FoxO6 jedoch maßgeblich in neuronalen Gewebestrukturen (Anderson et al., 1998; Jacobs et al., 2003).

1.3.1 Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch die Akt

FoxO-Transkriptionsfaktoren sind direkte Substrate von Akt. Ist der PI3K/Akt Signalweg aktiv, z.B. stimuliert durch Wachstumsfaktoren wie Insulin, werden die Transkriptionsfaktoren durch die Akt phosphoryliert. FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 besitzen jeweils drei Akt-Phosphorylierungsstellen, die unter den Isoformen konserviert sind (Arden 2006). Es wird beschrieben, dass die Phosphorylierung der FoxOs an diesen Stellen zu der Bindung an 14-3-3 Proteine führt. Weiter wurde gezeigt, dass diese Interaktion zu einer Konformationsänderung der FoxO-Proteine führt, wodurch eine Kernexportsequenz (NES) im C-Terminus exponiert werden soll (Brunet et al., 2002). Vermutlich durch die Bindung der 14-3-3 Proteine wird zusätzlich eine Kernimportsequenz (NLS) maskiert, wodurch der Re-Import in den Zellkern verhindert wird (Rena et al., 2001). Die Phosphorylierung der FoxOs durch

Akt resultiert also in einer Translokation der Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern hinaus und somit auch in einer Inaktivierung. Im Cytoplasma können die FoxOs dann durch das Proteasom abgebaut werden (Hermeking & Benzinger 2006).

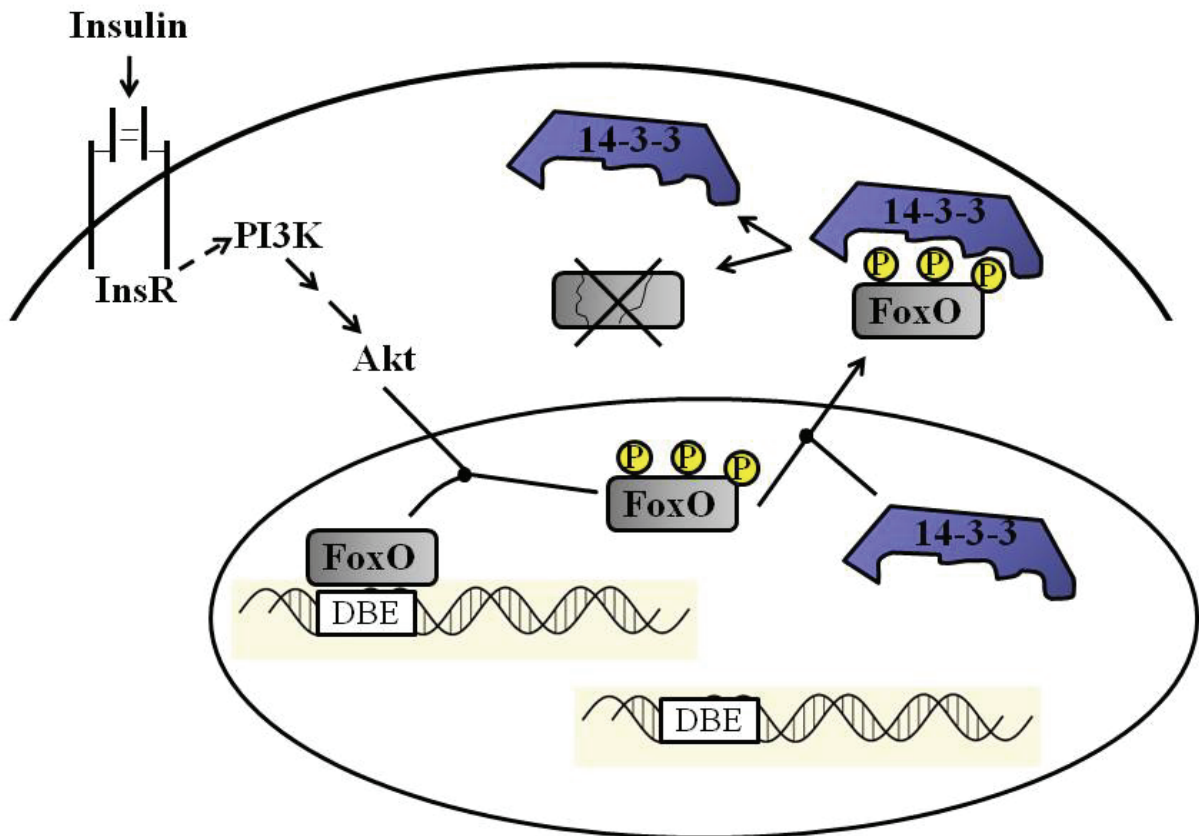


Abbildung 1.5: Die Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch den Insulin/PI3K/Akt-Signalweg.

Induziert durch Bindung von Insulin an seinen Rezeptor (InsR) erfolgt die Aktivierung der PI3K und der Akt. Akt phosphoryliert FoxO, welches daraufhin von 14-3-3 gebunden und aus dem Zellkern transferiert wird. Im Cytoplasma kann FoxO dann durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden.

FoxO6 bildet auch hier eine Ausnahme und besitzt lediglich zwei Aminosäurereste, die durch Akt phosphoryliert werden (Jacobs et al., 2003). Durch das Fehlen der dritten, C-terminalen Phosphorylierungsstelle führt die Phosphorylierung von FoxO6 durch Akt nicht zu der Bindung von 14-3-3 Protein. Somit ist FoxO6 konstitutiv im

Kern lokalisiert, wird jedoch durch die Phosphorylierung der zwei vorhandenen Stellen durch Akt inaktiviert (Van Der Heide et al., 2005).

1.3.2 Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch weitere Faktoren

Änderungen des Acetylierungsstatus und des Ubiquitinylierungsstatus spielen neben der Phosphorylierung bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität von FoxO Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Am Beispiel von im Kern lokalisiertem FoxO3a wurde gezeigt, dass die Stimulation mit H₂O₂ zu einer Deacetylierung durch Sirtuine (SIRT) führt, wodurch die Expression antioxidativer Zielgene gesteigert, die von proapoptotischen Zielgenen verringert wird (Brunet et al., 2004; Imai et al., 2000). Demgegenüber führt die Polyubiquitinylierung von FoxO1a durch SKP2 zu dessen Abbau, die Monoubiquitinylierung von unphosphorylierten cytoplasmatischen FoxOs zur Aktivierung und zur Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern (Huang et al., 2005; van der Horst et al., 2006).

Die Modulation der transkriptionellen Aktivität von FoxOs durch deren Phosphorylierung erfolgt nicht nur an den bereits beschriebenen Aminosäureresten. So ist im Fall von FoxO1a die DYRK1 (**d**ual-specificity **tyrosine** phosphorylation-regulated **k**inase **1**) in der Lage, den Transkriptionsfaktor an Ser-329 zu phosphorylieren. In Folge dessen phosphoryliert die Caseinkinase 1 (CK1) FoxO1a an Ser-322 und Ser-325, wodurch die Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Zellkern in das Cytoplasma stimuliert wird (Rena et al., 2002). Besonders sei neben weiteren Kinasen wie der SGK (**s**erum and **g**lucocorticoid inducible **k**inase), deren Phosphorylierungsstellen an den FoxOs teilweise mit denen der Akt übereinstimmen, und der IKK β (Inhibitor of NF- κ B kinase β) die JNK (**J**un **N**-terminal **k**inase) genannt (Brunet et al., 2001; Greer & Brunet 2005). Die MAP-Kinase JNK kann durch Stimuli wie oxidativen Stress aktiviert werden und phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie an unter den Isoformen nicht konservierten Stellen (Essers et al., 2004). Durch diese Phosphorylierung wird die Kernlokalisierung von FoxOs stimuliert.

Wachstumsfaktoren induzieren somit über diverse Wege die inaktivierende Translokation aus dem Zellkern der FoxO Proteine, was in einer verringerten

Expression von FoxO-Zielgenen resultiert. Stress-Stimuli wirken ebenfalls über verschiedenste Wege auf FoxOs. Sie können jedoch die Kernlokalisation und die Expression von FoxO-Zielgenen stimulieren und sind sogar in der Lage, der Wirkung von Wachstumsfaktoren entgegenzuwirken (Frescas et al., 2005; Sunayama et al., 2005; Tsuruta et al., 2004).

1.3.3 FoxO-Zielgene und deren Bedeutung

FoxO Transkriptionsfaktoren wirken auf eine Vielzahl von Genen (siehe Abbildung 1.6) überwiegend induzierend und in einigen Fällen auch reprimierend (Ramaswamy et al., 2002). Im Folgenden wird besonders auf Gene eingegangen, deren Funktion im Bereich des Metabolismus und der Vermittlung von Stressresistenz liegen.

Die Expression der antioxidativen Enzyme Katalase und MnSOD (**Mangan-superoxid-dismutase**) kann durch FoxO Proteine induziert werden (Kops et al., 2002b; Kops et al., 2002a; Miyamoto et al., 2007; Yanase et al., 2002). ROS entstehen u.a. als Nebenprodukt bei der Energiegewinnung in aerob lebenden Zellen und können auf molekularer Ebene Schäden hervorrufen, so auch besonders kritische Schäden der DNA (Sies 1986). Gadd45 α (**G**rowth **a**rrest-and **D**N **A** damage-inducible gene **45 α**) kann durch solche Schädigungen der DNA über FoxO Proteine induziert werden und ist in der Lage, den Zellzyklus zu stoppen (Tran et al., 2002). So bleibt der Zelle mehr Zeit für die DNA-Reparatur und der Entsorgung oxidierter Moleküle, damit keine fehlerhafte DNA reproduziert wird. Daher wird auch *gadd45 α* zu den Stressresistenz vermittelnden Genen gezählt.

FoxO Transkriptionsfaktoren sind desweiteren an der Regulation von Schlüsselproteinen des Glukosestoffwechsels beteiligt. Die G6Pase (**G**lukose-**6-P**hosphatase) und auch die PEPCK (**P**hosphoenolpyruvat-**C**arboxykinase) sind solche Proteine und katalysieren wichtige Reaktionsschritte der Glukoneogenese (Hall et al., 2000; Matsumoto et al., 2007; Schmolli et al., 2000). Auch IGFBP-1 (**I**nsulin-like **g**rowth **f**actor **b**inding **p**rotein **1**) wird durch FoxOs induziert. Dieses Protein ist in der Lage, die kurzfristige Bioverfügbarkeit von IGF (**I**nsulin-like **g**rowth **f**actor) zu beeinflussen und spielt somit ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des Glukosestoffwechsels (Guo et al., 1999; Matsumoto et al., 2007). Insulin wirkt inhibierend auf die Glukoneogenese, was mit der inhibierenden Wirkung auf FoxO Transkriptionsfaktoren und somit der verminderten Expression von die Glukoneogenese betreffenden Zielgenen über den PI3K/Akt Signalweg zu erklären ist.

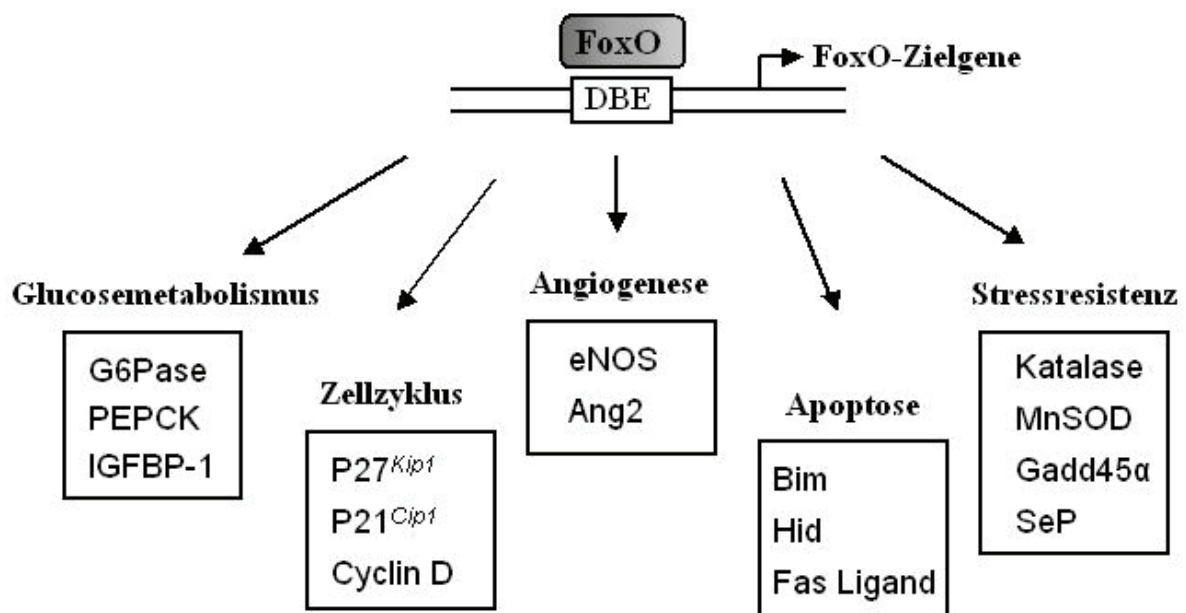


Abb. 1.6: Zielgene von FoxO-Transkriptionsfaktoren

An spezifische Sequenzen (DBEs) in den Promotoren ihrer Zielgene gebunden, induzieren FoxO-Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedenster Zielgene. Die entsprechenden Proteine sind an der Regulation des Glukosemetabolismus, des Zellzyklus, der Angiogenese, der Apoptose oder der Vermittlung von Stressresistenz beteiligt.

Damit sind nur einige Zielgene und deren Wirkung beschrieben. Weitere wichtige Gene sind an der Regulation der Proliferation, Angiogenese oder der Apoptose beteiligt und werden zusammen mit den bereits besprochenen Genen in Abbildung 1.6 dargestellt (Brunet et al., 1999; Gomis et al., 2006; Luo et al., 2007; Miyamoto et al., 2007; Potente et al., 2005; Shinoda et al., 2004; Walter et al., 2008).

Viele der dargestellten Gene vermitteln als positiv erachtete Effekte, die auffälligerweise mit beschriebenen positiven Effekten von Polyphenolen aus grünem Tee übereinstimmen. Somit stellen die FoxO-Transkriptionsfaktoren selbst auch viel versprechende Ansatzpunkte für Untersuchungen mit dem Ziel der Intervention im Hinblick auf altersbegleitende Krankheitsbilder dar.

1.4 Der zu PI3K/Akt/FoxO homologe Signalweg in *C.elegans*

Der Nematode *C.elegans* wird für die Untersuchung von verschiedensten Fragestellungen aus der zellulären und molekularen Biologie genutzt, da sich viele Gene zu Schlüsselproteinen der Vertebraten auch bei ihm wiederfinden und er auf vielen Feldern als *in vivo*-Modell anerkannt ist (Brenner 1974). Auch die am PI3K/Akt Signalweg beteiligten Proteine und Gene finden sich in *C.elegans* in homologer Form wieder. Vor allem bei Untersuchungen des Dauerstadiums in *C.elegans*, welches durch eine verlängerte Lebensspanne bei niedriger metabolischer Aktivität als Antwort auf widrige Umweltbedingungen, wie ein sehr geringes Nahrungsangebot, charakterisiert ist, wurden mehrere der angesprochenen Orthologe, wie DAF-2 oder AGE-1 gefunden (Ogg et al., 1997).

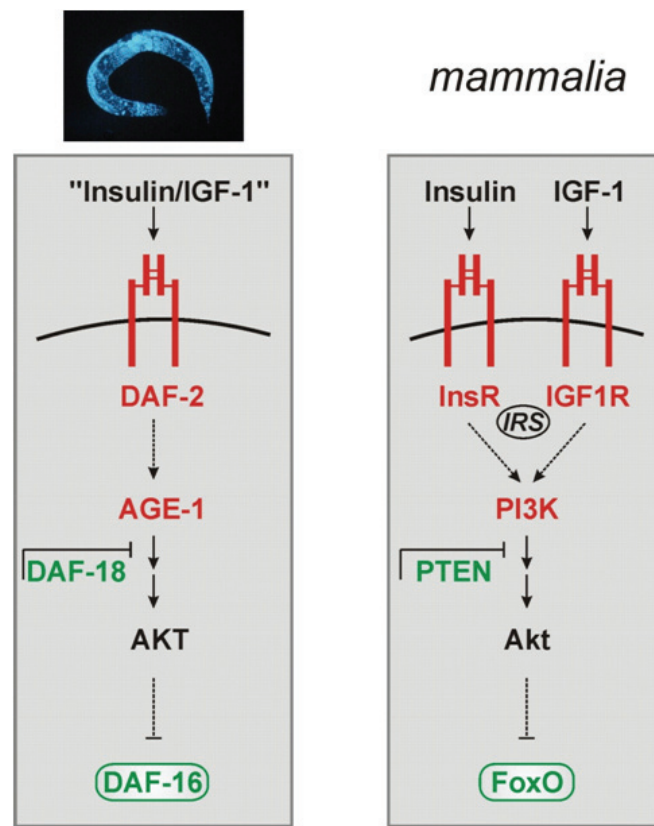


Abb. 1.7 Die Insulin-responsive Signalkaskade über PI3K, Akt und FoxO ist konserviert zwischen *Mammalia* und *C.elegans*

Die einzelnen Schlüsselkomponenten des Insulin-responsiven Signalwegs über PI3K, Akt und FoxO sind zwischen Säugern und Nematoden hochkonserviert. Außerdem liegen einige Biokomponenten in *C.elegans* nur mit einer Isoform vor, wie der Vertreter der FoxO-Familie, DAF-16 (abnormal **dauer** formation-**16**), oder auch DAF-2 als Rezeptor für Insulin und IGF-1 (InsR und IGF1R). DAF-18 ist das *C.elegans*-Ortholog zur Phosphatase PTEN, AGE-1 zur PI3K (beschrieben in Kapitel 1.2.1). Bei den IRS handelt es sich um Insulinrezeptor-Substrate welche, die Phosphorylierung der PI3K vermitteln.

Für den Insulin- und den IGF-Rezeptor besitzt *C.elegans* nur ein Ortholog, genannt DAF-2, dessen inaktivierende Mutation zu einer Verdopplung der Lebensspanne von *C.elegans* führt (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997). AGE-1 kodiert in *C.elegans* für die katalytische Untereinheit (p110) einer PI3K (Morris et al., 1996; Paradis et al., 1999). Auch die Mutation von age-1 kann zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensspanne führen (Johnson 1990; Morris et al., 1996). AGE-1

nachgeschaltet wird das Signal in Form von Phosphorylierungsvorgängen an eine Reihe von Proteinen, darunter AKT-1, AKT-2, PDK-1 und SGK-1, weiter-gegeben (Hertweck et al., 2004; Kimura et al., 1997; Paradis & Ruvkun 1998). Im Gegensatz zu den Vertebraten besitzt *C.elegans* nur eine Isoform der FoxO Transkriptionsfaktorfamilie, DAF-16 (abnormal **d**auer **f**ormation) (Lee et al., 2001; Ogg et al., 1997). DAF-16 ist essentiell für die Regulation des Dauerstadiums in Larven über den DAF-2/Insulin-Signalweg, wobei auch das Insulinortholog in *C.elegans* als Insulin bezeichnet wird, aber auch für die Regulation der Lebensspanne und der Vermittlung von Stressresistenz in adulten Nematoden (Honda & Honda 1999; Kimura et al., 1997; Lithgow et al., 1995; Murakami & Johnson 1996). In Bezug auf die Regulation der Lebensspanne über DAF-2/AGE-1 zeigt sich die Bedeutsamkeit von DAF-16 daran, dass bei der inaktivierenden Mutation von *daf-16* die oben besprochene Verlängerung der Lebensspanne durch Mutation von *daf-2* oder *age-1* aufgehoben werden kann (Honda & Honda 1999; Lee et al., 2003).

Wie bei den Vertebraten sind es auch bei *C.elegans* direkte Zielgene des FoxO-Transkriptionsfaktors DAF-16, deren Expressionsprodukte als Schlüsselproteine in Metabolismus und Stressresistenz fungieren. Unter diesen DAF-16 Zielgenen ist auch das Gen zu dem MnSOD-Ortholog SOD-3 zu finden, welches durch oxidativen Stress induziert werden kann (Honda & Honda 1999). Unter Stressbedingungen wird in *C. elegans* DAF-16 durch JNK phosphoryliert, wodurch wie bei den Vertebraten die Translokation in den Kern stimuliert wird (Oh et al., 2005).

Der Modellorganismus *C. elegans* eignet sich also gerade für die Untersuchungen des Insulin-responsiven PI3K/Akt/FoxO-Signalweges, da dieser von *C. elegans* bis zum Menschen hoch konserviert vorliegt.

1.5 Zielsetzung

Dem Verzehr von Flavonoiden aus grünem Tee wurden verschiedenste positive Wirkungen nachgesagt. Insbesondere EGCG gilt als wirksam in der Prävention von verschiedenen Krankheitsbildern. Für diese Arbeit waren die Insulin-ähnlichen Wirkungen von EGCG in Tiermodellen besonders von Interesse. FoxO-Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression wichtiger Schlüsselenzyme der Glukoneogenese wie die PEPCK und die G6Pase.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Flavonoiden aus grünem Tee auf den Insulin-responsiven PI3K/Akt/FoxO-Signalweg und die Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren untersucht. Es sollte aufgeklärt werden,

- 1.) ob und wie Flavonoide aus grünem Tee im Zellmodell auf den Insulin-responsiven PI3K/Akt/FoxO-Signalweg wirken.
- 2.) ob Flavonoide in den verwendeten Versuchsanordnungen die Bildung von H_2O_2 induzieren und ob unter diesen Bedingungen die Bildung von H_2O_2 eine Rolle bei der Beeinflussung des PI3K/Akt/FoxO-Signalwegs durch die Flavonoide spielt.
- 3.) welche Signalmoleküle an der Ausbildung beobachteter Effekte von EGCG beteiligt sind.
- 4.) ob die *in vitro* gefundenen Ergebnisse aus dieser Arbeit von physiologischer Relevanz sind (durch Überprüfung am *in vivo*-Modell *C.elegans*).

2. Material und Methoden

Plasmide und Reagenzien

Das verwendete FoxO1a-EGFP Expressionsplasmid wurde zuvor beschrieben (Kortylewski et al., 2003). FKHR cDNA wurde dort in pEGFP-C1 (Clontech) kloniert. Insulin wurde von Roche Bichemicals (Mannheim, Germany), alle anderen Chemikalien, wenn nicht anders angegeben von Sigma (Deisenhofen), Cell Signaling Technology (Beverly, USA), Santa Cruz (Heidelberg), Amersham (Piscataway, USA), Upstate (Lake Placid, USA), Dianova (Hamburg) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Direct-Q[®] 3 UV (Millipore, Eschborn) erzeugt.

Verwendete EGCG-Chargen (Sigma):

Lot1: 106K1311

Lot2: 117K1479

Lot3: 108K1564

2.1 Zellkultur

2.1.1 Anzucht von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Diese sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Zum Waschen kultivierter Zellen wurde PBS (**p**hosphate-**b**uffered **s**aline; 140 mM NaCl; 11,5 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) verwendet.

HFFF2-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM mit 1 g Glukose/l), das mit 9% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) (beides von PAA, Pasching, Österreich), 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAXTM-I, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) und Penicillin/Streptomycin (PAA, 100 Units/ml bzw. 0,1 mg/ml) supplementiert war (Komplettmedium), in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Ohne FCS-Supplementation wurde das Medium als serumfrei

bezeichnet. HepG2-Zellen wurden auf die gleiche Weise gehalten, jedoch enthielt das Medium 4,5 g Glukose/l und zusätzlich zu den angegebenen Komponenten 0,9% nicht-essentielle Aminosäuren (PAA).

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Name der Zelllinie	Beschreibung	Referenz/Bezugsquelle
HFFF2	humane fötale Vorhautfibroblasten	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC-Nr.: 86031405)
HepG2	Humane Hepatomzellen	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC Nr.: 85011430)

Zum Passagieren und zur Aussaat auf Kulturschalen wurden die Zellen nach Erreichen einer 90–100%-igen Konfluenz mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (PAA) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach ca. 5 Minuten mit Kompletmedium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und in entsprechender Verdünnung auf Kulturflaschen und -schalen überführt. Die Trypsinierung von HepG2-Zellen wurde hingegen in ca. 10 Minuten vorgenommen.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren wurde die Zellsuspension nach dem Abstoppen der Trypsinierung (s. o.) zentrifugiert, das Zellpellet in Einfriermedium (Kompletmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in Kryogefäßen (Greiner) bei -80°C eingefroren. Die Zellen einer 175 cm²-Kulturflasche wurden jeweils in ca. 4 ml

Einfriermedium aufgenommen und auf 4 Kryogefäße verteilt. Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie im Wasserbad bei 37°C angetaut und vor dem kompletten Auftauen in eine 75 cm²-Kulturflasche mit Komplettmedium überführt. Um Zellschäden durch das DMSO zu verhindern, wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, sobald sich alle lebenden Zellen abgesetzt hatten (nach ca. 4-5 Stunden).

2.1.3 MTT-Test zur Viabilitätsbestimmung

Die auf 24-Well-Platten mit einer Fläche von 2 cm² pro Well ausgesäten und zu ca. 90% konfluenten HFFF2- und HepG2-Zellen wurden nach folgendem Muster mit unterschiedlichen Substanzen für 3fach-Bestimmungen in 208 µl serumfreien Medium behandelt:

- 4 Stunden ohne Postinkubation
- 4 Stunden mit 20 stündiger Postinkubation in serumfreien Medium
- 24 Stunden ohne Postinkubation

Das Medium wurde durch 250µl frisches, serumfreies DMEM ersetzt, um alle Substanzen für die Behandlung zu entfernen und je Ansatz mit 25 µl MTT-Lösung versetzt. Nach 1-2 Stunden im Inkubator wurden je 250 µl Stopplösung hinzugefügt. Die aus MTT in lebenden Zellen reduktiv gebildeten violetten Formazan-Kristalle wurden gründlich durch Schütteln auf einem Rotationsschüttler suspendiert und gelöst. 100 µl je Probe wurden auf eine 96-Well-Platte überführt und die Absorptionswerte bei 570nm gegen 620nm als Referenz ermittelt. Als Leerwert wurde eine parallel behandelte, jedoch zellfreie Probe verwendet. Die berechneten Wellenlängendifferenzen wurden auf den Wert unbehandelter Zellen normiert und als Viabilität bezeichnet.

MTT-Lösung

5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in PBS

Stopplösung

0,04 M HCl in Isopropanol

2.1.4 Neutralrot-Test zur Viabilitätsbestimmung

Die HFFF2- und HepG2-Zellen wurden wie unter 2.1.3 beschrieben kultiviert und behandelt. Auch hier erfolgten 3fach-Behandlungen, nach denen das Medium durch je 0,5 ml Neutralrot-Medium ersetzt wurde. Neutralrot ist ein lipophiler Vitalfarbstoff, der von vitalen Zellen in den Lysosomen gespeichert wird. Die Menge des in einer Zellpopulation aufgenommenen Farbstoffs entspricht also der Zahl der vitalen Zellen. Nach 2-4 Stunden im Inkubator wurde das Neutralrot-Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zur Lösung des Neutralrots aus den vitalen Zellen je 0,5 ml Fixierlösung hinzugegeben. Die Zellen wurden nun kurz bei RT geschüttelt und die Absorptionswerte mit je 100 µl des Überstands in 96-Well-Platten bestimmt. Es wurden die Absorption bei 550nm gegen 400nm als Referenzwert ermittelt. Als Leerwert wurde Fixierlösung verwendet. Die berechneten Wellenlängendifferenzen wurden auf den Wert unbehandelter Zellen normiert und als Viabilität bezeichnet.

Neutralrot-Medium

0,5 ml Neutralrot-Lösung (3,3 g/l in PBS) ad 100 ml mit serumfreiem Medium

Fixierlösung

50% (v/v) Ethanol, 1% (v/v) Eisessig, 49% (v/v) H₂O

2.1.5 Behandlung von Zellen mit Flavonoiden und anderen Komponenten

Nur für Westernanalysen wurden die in Kulturschalen zu ca. 90% konfluenten Zellen vor Behandlung über Nacht serumdepletiert um die basale Phosphorylierung untersuchter Proteine möglichst gering zu halten. In allen Analysen wurden Flavonoide oder Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen, Insulin stets

in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Als Kontrolle dienten dabei die jeweiligen Lösungsmittel der verschiedenen Komponenten. Die Behandlungen mit Flavonoiden und anderen Komponenten erfolgten stets in Komplettmedium ohne FCS, sofern nicht anders vermerkt, für 4 h. Für Analysen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurden die Zellen für 30 und/oder 60 Minuten gegebenenfalls in Hank's balanced salt solution (HBSS) inkubiert. Das Lösemittel der Flavonoide war Methanol (MeOH).

2.1.6 Behandlung von Zellen unter Verwendung von Inhibitoren

Der Einfluss der Inhibitoren AG1478 (Calbiochem, San Diego, USA), Wortmannin (Calbiochem), LY294002 (Calbiochem) und AG1024 (Calbiochem) auf die Phosphorylierung von Akt nach Behandlung mit EGCG wurde in HFFF2-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen für mindestens 30 Minuten mit dem entsprechenden Inhibitor in Komplettmedium ohne FCS präinkubiert. Die Zellen wurden mit warmem PBS gewaschen und frisch angesetzte Inhibitoren für die verschiedenen Behandlungen eingesetzt. 100 nM Insulin diente als Positivkontrolle für die Aktivierung des Akt-Signalweges. Das Lösemittel der Inhibitoren war DMSO.

2.1.7 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von HFFF2- und HepG2-Zellen erfolgte in 35 mm Kulturschalen bei 60-80% Konfluenz mit dem Transfektionsreagenz TurboFect (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Zellen wurden mit 4 μg Plasmid nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Wenn nicht anders angegeben, folgte nach 5 h ein Mediumwechsel auf Vollmedium mit 1% FCS, gefolgt von einer Inkubation im Inkubator bei 37°C über Nacht.

Midi/Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die für die Transfektionen eingesetzten Plasmide wurden aus einer 50-100 ml Kultur nach Anweisung des Herstellers und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer

isoliert. Die Kulturen wurden in einer Sorvall-Kühlzentrifuge mit einem SLA-1000-Rotor bei 4 °C für 10 min mit 4000 g abzentrifugiert und der Kulturüberstand entfernt. Midi-Präparationen wurden mit Hilfe des „Pure-Yield Plasmid Midiprep System-Kits“ (Promega, Mannheim) und Maxi-Präparationen mit Hilfe des „Qia-Plasmid-Maxi-Prep (Endo-Free)-Kits“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die DNA-Konzentration der jeweiligen Proben zu ermitteln wurden je 3 µl Probe im Verhältnis 1:50 in bidest H₂O verdünnt und an einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) photometrisch bei 260 nm gegen bidest H₂O als Referenz gemessen. Eine Extinktion von 1 entsprach dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.2 Proteinanalytik

2.2.1 Protein-Quantifizierung nach Bradford (Bradford 1976)

Für die jeweiligen Analysen wurden auf Eis Lysate erzeugt und mittels eines kommerziell erhältlichen Coomassie Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, USA) in 96-well-Platten nach Herstellerangaben behandelt. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration aus dieser Absorption wurde mittels der bei jeder Messung mit BSA-Standardlösungen (0-5 mg/ml) erzeugten Eichgeraden vorgenommen.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Für die jeweiligen Analysen wurden auf Eis Lysate erzeugt und mittels des kommerziell erhältlichen Dc Protein Assay Kits (BioRad, Hercules, USA) in 96-well-Platten nach Herstellerangaben behandelt. Anschließend wurde die Absorption bei 750 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration aus dieser Absorption wurde mittels der bei jeder Messung mit BSA-Standardlösungen (0-5 mg/ml) erzeugten Eichgeraden vorgenommen.

2.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für Western-Analysen wurden die Zellen nach Behandlung (2.1.5 und 2.1.6) mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 4 x Laemmli-Puffer lysiert. Die Lysate wurden sonifiziert, für 10 Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Wenn nicht direkt verwendet, wurden die Lysate bei -80°C aufbewahrt.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine in diesen Gesamtzell-Lysaten wurde ein diskontinuierliches Gelelektrophorese-System nach Laemmli verwendet (Laemmli 1970). Dieses bestand aus einem Sammelgel zur Fokussierung und einem Trenngel zur Auftrennung der Proteine. Durch SDS (Natriumdodecylsulfat) werden Proteine denaturiert und ihre Eigenladung maskiert. So wird die elektrophoretische Migrationsgeschwindigkeit der Proteine nach dieser Methode nur durch das Molekulargewicht bestimmt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Lysate für 5 min bei 95°C denaturiert, mit Ausnahme jener, aus denen FoxO-Proteine nachgewiesen werden sollten. Die Gelelektrophorese wurde unter Verwendung eines Protein-Größenstandards in einer vertikalen Gelapparatur „Novex Mini Cell“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei einer maximalen Stromstärke von 40 mA pro Gel.

4 x Laemmli-Probenpuffer

250 mM	Tris-HCl (pH 8)
20% (w/v)	Glycerol
5% (w/v)	SDS
0,01% (w/v)	Bromphenolblau
100 mM	DTT (Dithiothreitol)

SDS-PAGE-Laufpuffer (pH 8,3)

50 mM	Tris
383 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS

Trenngel, 10 % (w/v) Acrylamid

27% (v/v)	bidest. H ₂ O
40% (v/v)	Trenngelpuffer (2,5x)
33% (v/v)	Acrylamid (30%; Roth, Karlsruhe)
0,025% (v/v)	TEMED (Tetramethylethyldiamin)
0,31% (v/v)	APS

Sammelgel, 5 % (w/v) Acrylamid

62 % (v/v)	bidest. H ₂ O
20% (v/v)	Sammelgelpuffer (5x)
17% (v/v)	Acrylamid (30%; Roth, Karlsruhe)
0,067% (v/v)	TEMED
0,83% (v/v)	APS

Trenngelpuffer (2,5x)

1,87 M	Tris/HCl (pH 8,9)
0,25% (w/v)	SDS

Sammelgelpuffer (5x)

300 mM	Tris/HCl (pH 6,7)
0,5% (w/v)	SDS

APS

10% (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
-----------	------------------------

2.2.4 Elektro-Transfer von Proteinen auf PVDF- oder Nitrocellulose-Membranen (Western-Blot)

Für den immunologischen Nachweis von FoxO-Proteinen erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine von SDS-Polyacrylamidgelen (2.2.2) auf Nitrocellulose-Membranen, für alle anderen Proteine auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen (HybondTM-P, Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, UK). Der Transfer erfolgte in Novex Mini Cell-Tank-Blot-Apparaturen (Invitrogen). Der Aufbau der Blot-Apparatur erfolgte nach folgendem Schema von der Kathode zur Anode:

2 in Transferpuffer äquilibrierte Schwämme, ein in Transferpuffer äquilibriertes Filterpapier, das in Transferpuffer äquilibrierte Trenngel, darauf luftblasenfrei PVDF / Nitrocellulose-Membran, darauf luftblasenfrei ein in Transferpuffer äquilibriertes Filterpapier. Anschließend folgten entweder 2 in Transferpuffer äquilibrierte Schwämme und ein zweites Gel mit Membran und Filterpapier (nie mehr als 2 Gele) oder aber ausreichend in Transferpuffer äquilibrierte Schwämme, um die Apparatur zu füllen. Der Transfer der Proteine erfolgte in Transferpuffer für 150 min bei einer Spannung von 24 V für PVDF-Membranen, für 100 min bei einer Spannung von 14 V für Nitrocellulose-Membran.

Vor ihrer Verwendung wurden die einzelnen Komponenten wie folgt behandelt:

1. Die PVDF-Membran wurde für 20 s mit Methanol, anschließend für 10-30 min in Transferpuffer äquilibriert.
2. Die Nitrocellulose-Membran wurde für 10 min in bidest. H₂O, anschließend für 10-30 min in Transferpuffer äquilibriert.
3. Filterpapiere und Schwämme wurden für mindestens 30 Minuten in Transferpuffer äquilibriert.

Transferpuffer (pH 8,5)

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol

2.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Direkt nach dem Transfer (2.2.3) wurden die Membranen aus der Blot-Apparatur genommen, kurz mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Milchpulver oder BSA unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern (Tab.2.2) erfolgte stets bei 4°C und über Nacht. Hierfür wurde auf den Boden einer Kulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm Parafilm aufgebracht. Je nach Größe der Membran wurde 1-1,5 ml Erstantikörper in entsprechender Verdünnung in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Milchpulver oder BSA auf den Parafilm gegeben und die Membran blasenfrei mit der proteintragenden Seite nach unten aufgelegt. Um Austrocknung zu verhindern wurde, mit bidest. H₂O angefeuchtetes Filterpapier am Rand der Kulturschale verteilt und der Deckel aufgelegt. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran für 30-60 min in TBST-Puffer bei Raumtemperatur (RT) gewaschen, wobei dieser dreimal gewechselt wurde. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper-HRP-Konjugat (Tabelle 2.2) für 1 h inkubiert (RT). Erneut wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper für 30-60 min mit TBST-Puffer gewaschen, wobei der Puffer dreimal gewechselt wurde. Der

indirekte Nachweis der auf der Membran gebundenen Proteine wurde nun über die an den Zweitantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP) mittels ECL-System „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent“ Substrat (Pierce, Rockford, USA) nachgewiesen. Die Anwendung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Dokumentation erfolgte über die Exposition eines Röntgenfilms (Amersham) zu der aufgetretenen Chemilumineszenz.

TBS-Puffer

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl

TBS-T-Puffer

0,1% (v/v) Tween-20 (Polyoxyethylensorbitol-monolaurat) in TBS-Puffer

Tabelle 2.2: Liste in dieser Arbeit verwendeter Antikörper. MMP - Magermilchpulver, BSA - Rinderserumalbumin, ZNS - Ziegennormalserum.

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Beverly, USA; # 9271	1:1000 in 5 % (w/v) MMP /TBST
Anti-phospho-FoxO1a/ FoxO3a (Thr24/Thr32)	Cell Signaling Technology; # 9464	1:1000 in 5 % (w/v) BSA /TBST
Anti-GAPDH	Chemicon (#MAB374)/Maus	1:16.000 in 5 % MMP
Anti-Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling Technology; # 9251	1:1000 in 5 % (w/v) MMP/TBST
Anti-FoxO1a	Cell Signaling Technology; #2880	1:50 in 1% (w/v) ZNS/PBS
Anti-FoxO3a	Cell Signaling Technology; #2497	1:50 in 1% (w/v) ZNS/PBS
Anti-FoxO4	Cell Signaling Technology	1:25 in 1% (w/v) ZNS/PBS

Sekundärantikörper	Hersteller/Spezies	Verdünnung
Anti-Kaninchen (aus Ziege)	Dianova (#111-035-144)	1:4000 in 5% MMP
Anti-Maus (aus Schaf)	Amersham (#NA931V)	1:4000 in 5% MMP
Anti-Ziege (aus Esel)	Santa Cruz (#sc-2020)	1:2000 in 1% MMP
Anti-Kaninchen	Invitrogen (Alexa Fluor 546)	1:800 in PBS

2.2.6 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)

Um Antikörper von proteinbeladenen Membranen zu entfernen, wurde die Blotmembran für 30 min bei 50°C in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS; pH 6,8) geschüttelt. Anschließend wurde die Membran gründlich in Wasser und dann mehrmals mit TBST gewaschen, bis der Geruch von β -Mercaptoethanol verschwunden war. Nach dem Entfernen der Antikörper von der Membran konnte eine erneute Immunodetektion (2.2.4) durchgeführt werden.

2.2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfärbung von FoxO1a, FoxO3a und FoxO4 (Cell Signaling Technology) wurden HFFF2- und HepG2-Zellen in 6-Well-Platten auf runden Objektgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80-100% mit den verschiedenen Komponenten behandelt (2.1.5).

Nach der Behandlung wurden die Zellen kurz und vorsichtig mit PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung der Zellen für 10 Minuten unter langsamem Schwenken mit 1 ml 4% Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur, dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit PBS, gefolgt von einer 15 minütigen Inkubation in eiskaltem Methanol bei -20°C ohne Bewegung. Wie die Fixierung, erfolgten auch alle weiteren Inkubations- und Waschschrte aus Gründen der mechanischen Empfindlichkeit der fixierten Zellen

bei äußerst vorsichtigem Schütteln. Nach Fixierung und dreimaligem Waschen für 10 Minuten mit PBS konnten die Zellen bei 4°C für mehrere Tage in PBS aufbewahrt werden. Für die weitere Behandlung wurden die Zellen mit 3% (w/v) ZNS (Ziegennormalserum) + 0,3% (v/v) Triton X-100 in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Objektgläschen mit den fixierten Zellen wurden vorsichtig aus den Platten genommen, und mit der Zellseite nach unten, blasenfrei auf 40 µl des entsprechenden Antikörpers (1:50 oder 1:25 verdünnt in 1% ZNS in PBS) gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert (vergleiche kapitel 2.2.5). Für die Kontrolle der Spezifität des verwendeten Sekundärantikörpers wurde eine Probe in PBS ohne Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektgläschen mit der Zellseite nach oben zurück in die Platten gelegt, dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei 37°C mit 1,5 ml des fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor 546 Anti-Kaninchen-Antikörpers (Invitrogen; 1:800 in PBS verdünnt) unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser Schritt und alle weiteren Schritte wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Zweitantikörpers unter Lichtausschluss durchgeführt. Nach erneutem Waschen für dreimal 10 Minuten mit PBS wurden die Objektgläschen mit den fixierten und immunmarkierten Zellen mittels „Pro Long Gold anti fade reagent with DAPI“ (Invitrogen) auf Objektträger aufgebracht. Die Proben wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen) hinsichtlich der subzellulären FoxO-Lokalisation ausgewertet.

2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden in 35 mm Kulturschalen ausgesät und mit pEGFP-FKHR-Plasmiden (Kortylewski et al., 2003) transient transfiziert (2.1.7). Am nächsten Tag erfolgten die Behandlungen (2.1.5) nach denen die Zellen direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von FoxO1a-EGFP ausgewertet wurden. Für jede Behandlung wurden in n=3 Versuchen in der Regel zwischen 340 und 500 Zellen ausgewertet. Dabei wurde mit Licht des Wellenlängenbereichs 450 bis 490 nm angeregt und bei einer 200 oder 400-fachen Vergrößerung stichprobenartig digitale Aufnahmen der Lichtemission der transfizierten Zellen im Wellenlängenbereich von 515 bis 565 nm gemacht. Die

Aufnahmen und Analysen von Zellen mit EGFP-Fusionsproteinen wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen) durchgeführt.

2.2.9 DNA-Bindung durch FoxO

Die FoxO1a DNA Bindeaktivität nach verschiedenen Behandlungen wurde mittels des ELISA-basierenden FoxO1a DNA Bindeaktivität Kits „TransAM“ (Active Motif, Carlsbad, CA) untersucht. Hierzu wurde nach der Behandlung (2.1.5) eine Kernextraktion vorgenommen, die Proteinmenge nach Bradford (2.2.1) bestimmt und die Kernlysate auf 96-Well-Platten mit immobilisierten, FoxO1a-DNA-Bindeelemente beinhaltenden Oligonukleotiden gegeben. Gebundenes, aktives FoxO1a-Protein wurde über einen gegen FoxO1a gerichteten Antikörper und Verwendung eines Zweitantikörpers mit gebundener Meerrettichperoxidase (HRP) und mehreren Waschschritten nachgewiesen. Die gesamte Untersuchung erfolgte nach Herstellerangaben des TransAM-Kits.

2.3 RNA-Analytik

2.3.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen mindestens in Doppelansätzen in 30mm Kulturschalen behandelt (2.1.5) und anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, dieses gründlich abgesaugt und bei der Aufarbeitung vereinigt. Es wurde das „RNeasy-mini“-Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Die isolierte RNA wurde in den meisten Fällen direkt quantifiziert (2.3.2) und in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben (2.3.3), manchmal aber auch für maximal 4 Tage bei -80°C eingefroren.

2.3.2 Quantifizierung von RNA

Um die RNA-Konzentration der jeweiligen Proben zu ermitteln, wurden je 3 µl 1:50 in bidest. H₂O verdünnt und an einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) photometrisch bei 260 nm gegen bidest H₂O als Referenz gemessen. Eine Extinktion von 1 entsprach dabei einer RNA-Konzentration 50 µg/ml.

2.3.3 Reverse Transkription

Um RNA mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umzuschreiben wurde das Omniscript RT-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Neben den Komponenten aus dem Kit wurden desweiteren Oligodesoxythymidin (dT16, Invitrogen) sowie RNase-Inhibitor (RNaseOUTTM; Invitrogen) verwendet. Die einstündige Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 37°C im Thermocycler T-Personal (Biometra, Göttingen). Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR)

Realtime-PCR Analysen wurden mit einem LightCycler unter Verwendung des „FastStart SYBR Green I PCR Master Mix“-Kits von Roche (Penzberg) nach

Herstellerangaben durchgeführt. Wurde in die Reverse Transkription (2.3.3) 1 µg RNA eingesetzt, so wurde die cDNA 1:5, ansonsten hierzu proportional in bidest H₂O verdünnt. Pro Realtime-PCR-Ansatz wurden 4 µl, also etwa 8 ng, der cDNA eingesetzt.

Tabelle 2.3: Liste in dieser Arbeit verwendeter Primer

Genprodukt	Primer (5'→3')	Primer für Gegenstrang (5'→3')	Amplifikatgröße (bp)
MnSOD	agcacgcttactaccttcag	acttttgcaagccatgtat	111
p21	aggaaggggatggtaggaga	acatagcccgtatacactgctg	96
HPRT	tgaccagtcaacaggggacatt	gtgtcaattatatcttcacaatcaagt	95
GAPDH	gctctctgctcctcctgttc	acgaccaaataccgttgactc	115

Das Programm für die Amplifikation konnte für alle in dieser Arbeit verwendeten Primer gleichermaßen verwendet werden, da alle Primer die gleiche Annealing-Temperatur und Amplifikatgröße besitzen. Der Ablauf des Programms ist in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 2.4: Ablauf der Realtime-PCR

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Initiale Denaturierung	95	10
Denaturierung	95	30s
Annealing	59	5s
Elongation	72	5s
Finale Elongation	72	2



Die Amplifikation erfolgte stets in 50 Zyklen durch Repetition der durch den Pfeil in Tabelle 2.4 angezeigten PCR-Schritte, gefolgt vom Aufschmelzen der Amplifikate. Die Auswertung aller Daten erfolgte mit der zum LightCycler gehörigen Software.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Das Trennverfahren der Agarose-Gelelektrophorese beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld. Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein konstantes Ladungs-Massen-Verhältnis besitzen, wandern wegen ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt vom Molekulargewicht der RNA- oder DNA-Fragmente, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Die Agarose-Gelelektrophorese fand in der vorliegenden Arbeit ihre Anwendung bei der präparativen Isolierung von Plasmid-DNA (2.1.7), nach der RNA-Isolation (2.3.1) und bei der Analyse von Produkten der PCR (2.3.4).

Die Matrix der Gele bestand aus 1% (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA; pH 8,3). Die entsprechende Menge an Agarose wurde im gewünschten Volumen TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Für die spätere Detektion der RNA oder DNA im Gel wurde die aufgekochte Agaroselösung auf unter 60°C abgekühlt und dann Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 µg/ml zugesetzt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht Strahlung im sichtbaren Bereich ($\lambda = 452 \text{ nm}$) emittiert.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Volumen Probenpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 30% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau versetzt und in die Taschen der ausgehärteten Agarose-Gele appliziert. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 100 V mit TAE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt.

2.4 *Caenorhabditis elegans*

2.4.1 Anzucht von *C. elegans*

In dieser Arbeit wurde der transgene *C.elegans*-Stamm TJ356 verwendet, der das Fusionsprotein DAF-16::GFP exprimiert und auf festem NGM (nematode growth medium) –Agar in Kulturschalen von 100 mm Durchmesser bei 20°C gehalten wurde. Als Nahrung dienten auf das Medium ausplattierte *E. coli* OP50 Bakterien. Einmal wöchentlich wurden für die Kulturfortführung rund 30 Nematoden mit Hilfe eines abgeflämmten Platindrahts auf frische Platten umgesetzt, um in der Kultur stets ausreichend Nahrung zu garantieren.

NG-Medium

3g	NaCl
2,5 g	Peptone
ad 973 ml bidest. H ₂ O	
nach dem Autoklavieren Zugabe von:	
1 ml	Lsg A
0,5 ml	Lsg B
1 ml	Lsg C
25 ml	Lsg D

NGM-Agar

17 g	Agar-Agar
3 g	NaCl
2,5 g	Peptone
ad 973 ml bidest. H ₂ O	
nach dem Autoklavieren Zugabe von:	
1 ml	Lsg A
0,5 ml	Lsg B
1 ml	Lsg C
25 ml	Lsg D

Lösung A

5 mg Cholesterin in 1 ml Ethanol

Lösung B

1 M	CaCl ₂
-----	-------------------

Lösung C

0,8 M	MgSO ₄
-------	-------------------

Lösung D (pH 6,0)

0,16 M	KH ₂ PO ₄
0,16 M	K ₂ HPO ₄

2.4.2 Behandlung von *C. elegans* mit EGCG

Für die Behandlungen wurden im Vorfeld zwei NGM-Agarplatten (Durchmesser: 100 mm) mit *C.elegans* des Stamms TJ356 (*Caenorhabditis* Genetics Centre University of Minnesota, Minneapolis) angelegt, so dass genügend gravide Nematoden vorlagen. Vor jeder Behandlung wurden die Nematoden Alterssemisynchronisiert. Hierzu wurden die Nematoden von den NGM-Agarplatten mit flüssigem NGM abgespült, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mittels Bleichelösung für 3 Minuten unter gelegentlichem Invertieren aufgelöst. Die Lyse wurde durch dreimaliges Waschen mit M9-Puffer, jeweils gefolgt von Zentrifugationsschritten bei 7°C, gestoppt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die lysierten Würmer, von denen nur noch die Eier aus den graviden Hermaphroditen unversehrt waren, in einem möglichst kleinen Volumen flüssigem NGM aufgenommen und auf eine frische NGM-Agarplatte mit OP50-Bakterien als Nahrung überführt und bei 20°C für 24 h inkubiert. Die geschlüpften Nematoden wurden wiederum mit flüssigem NGM von der NGM-Agarplatte gespült und die OP50-Bakterien durch wiederholtes Waschen mit M9-Puffer, gefolgt von Zentrifugationsschritten bei 7°C und 55 g, entfernt. Anschließend wurde das Wurmpellet in einem möglichst geringen Volumen flüssigem NGM aufgenommen und gleiche Anzahlen Nematoden für die unterschiedlichen Behandlungen auf 300 mm Kulturschalen überführt. In diesen Kulturschalen wurden die Nematoden mit 2 ml flüssigem NGM, welches 1% BSA, 50 µg/ml Streptomycin, streptomycinresistenten OP50-1 Bakterien (2.5×10^7 Bakterien/ml) und EGCG oder DMSO als Lösemittelkontrolle enthielt, für 48 h bei 20°C inkubiert.

M9 Puffer

22 mM	KH ₂ PO ₄
22 mM	Na ₂ HPO ₄
85 mM	NaCl

nach dem Autoklavieren Zugabe von 1 ml Lösung C pro 1 L Puffer.

Bleichelösung

50%	Sodium Hypochlorid [12% Cl]
2,5 M	Sodium Hydroxid

2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Analysen der subzellulären Lokalisation des DAF-16::GFP Fusionsproteins wurden die wie unter 2.4.2 beschrieben behandelten Nematoden des Stamms TJ356 in einem Tropfen mit 2% Natrium Azid auf einem Objektträger überführt und betäubt. Um die Nematoden und den Tropfen vor dem Austrocknen zu schützen, wurden sie sogleich mit einem Deckgläschen mit einer geringen Menge Silikon an den Rändern abgedeckt. Möglichst rasch erfolgte die Klassifizierung der Nematoden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiolab, Zeiss, Göttingen) bei einer 100 fachen Vergrößerung hinsichtlich der generellen, subzellulären DAF-16::GFP-Lokalisation. Mit einem passenden Filter (Anregung 365nm, Emission 420nm), einer CoolSnap CF Digital Monochrom Kamera (Intas, Göttingen) und einem Image ProPlus Programm (Version 4.5 MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA) wurden die Würmer in drei Kategorien (nukleär, cytosolisch und nukleär und cytosolisch) unterteilt.

2.5 Messung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Um die Bildung von H_2O_2 in Zellkulturmedium (hier DMEM ohne Phenolrot, Invitrogen) und NGM unter dem Einfluss verschiedener in dieser Arbeit verwendeter Komponenten zu analysieren, wurde das Amplex Red Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Der Einsatz der jeweiligen Komponenten erfolgte wie bei den verschiedenen Behandlungen beschrieben (2.1.5, 2.4.2), jedoch in Abwesenheit von Zellen oder Nematoden. Von jeder Probe wurden 5 μ l-Aliquots entnommen und das enthaltene H_2O_2 über die Oxidation des AmplexRed Reagens zu dem fluoreszierenden Resorufin (Anregung 530 ± 25 nm, Emission 590 ± 35 nm) in Gegenwart von HRP photometrisch mit Hilfe einer H_2O_2 -Eichgeraden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ermittelt.

2.6 Densitometrie

Für die densitometrischen Analysen der Ergebnisse der Western-Untersuchungen wurde das Programm Scion Image der Fa. Scion Corporation (Maryland, USA) verwendet.

Die densitometrischen Werte zu den jeweiligen Banden wurden zunächst auf den Hintergrund, dann auf die jeweils zugehörigen Werte zu den Ladekontrollen normiert. Diese Werte wurden jeweils auf den Wert der Insulin-behandelten Probe, welcher als 100% gesetzt wurde, normiert.

3. Ergebnisse

3.1 Viabilität von HFFF2-Zellen nach EGCG-Behandlung

Um die Viabilität von HFFF2-Zellen nach der Behandlung mit für diese Arbeit relevanten Dosen von EGCG zu bestimmen, wurden die Fibroblasten mit bis zu 100 μM EGCG behandelt. Um möglichst valide Ergebnisse zu erhalten, wurden hierzu sowohl MTT- als auch Neutralrot-Tests durchgeführt. Die so ermittelte relative Viabilität von HFFF-2 Zellen nach Behandlung mit EGCG ist Abbildung 3.1 zu entnehmen.

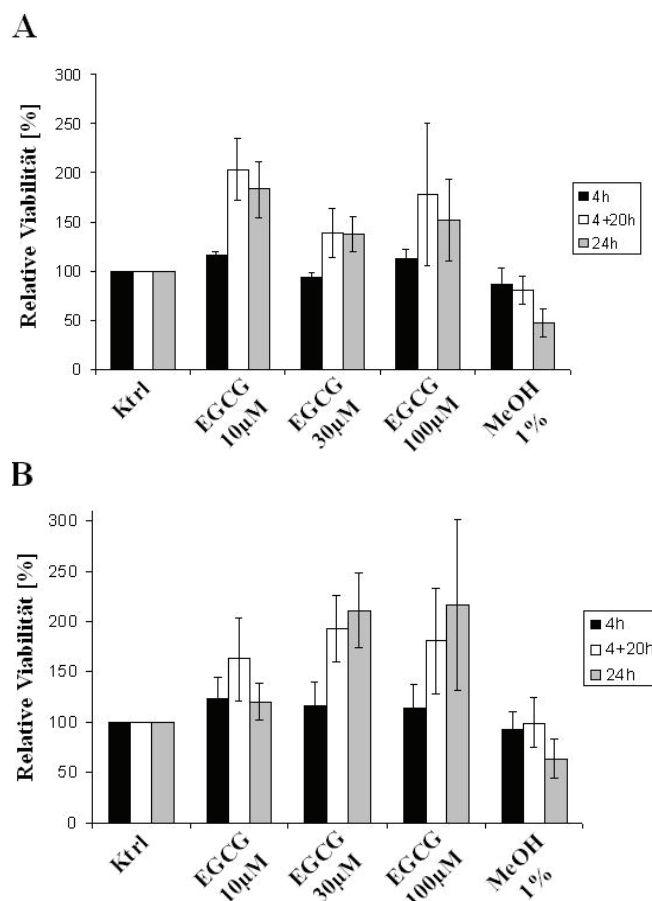


Abb.3.1: Viabilitätsbestimmung mittels MTT- und Neutral-Rot-Test bei HFFF2-Zellen nach EGCG-Behandlung

HFFF2-Zellen wurden für 4 Stunden, für 4 Stunden mit einer 20-stündigen Postinkubation in serumfreiem DMEM und für 24 Stunden mit unterschiedlichen EGCG-Konzentrationen (Lot 1) oder 1% Methanol als Lösemittelkontrolle für alle Konzentrationen EGCG in serumfreiem DMEM behandelt. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT- (A) oder Neutral-Rot-Test (B) bestimmt. Die gezeigten Werte sind jeweils auf die Viabilität von unbehandelten Zellen normierte Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Nahezu alle Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit befassten sich mit Kurzzeiteffekten nach Behandlungen für 4 Stunden. Nach diesem Zeitraum wiesen beide Tests nur geringe Änderungen der Viabilität nach Behandlung mit EGCG verschiedener Dosen auf. Desweiteren wurde die Viabilität nach 24 h Inkubation und 4 h Inkubation mit 20 h Postinkubation ohne EGCG oder Methanol bestimmt, um eventuell erst zu einem späteren Zeitpunkt zu Tage tretende Toxizität der verwendeten Dosen auszuschließen. Diese hätte bereits zu einem frühen Zeitpunkt auf molekularer Ebene (verschiedener Signalkaskaden) Einfluss haben können, ohne dass die Viabilität bereits beeinflusst ist. Wie Abbildung 3.1 zu entnehmen ist, führt die Behandlung mit den verschiedenen Dosen zu einer Steigerung der Inkorporation des Neutralrots, bzw. des Umsatzes an MTT durch die Zellen zum späteren Zeitpunkt, wohingegen bei der Methanolkontrolle (hier 1% entsprechend der Konzentration des Lösemittels in den EGCG-Behandlungen) die Werte nach einer 24 h Dauerbehandlung bis auf 50% gesenkt werden. Als Kontrolle dienten hier Zellen, die in serumfreiem DMEM entsprechend der jeweiligen Behandlungsmuster inkubiert wurden. Die Werte zu den unbehandelten Kontrollen wurden auf 100% gesetzt und die der anderen Behandlungen darauf bezogen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine 4 h-Behandlung mit den gegebenen Dosen für alle nachfolgenden Untersuchungen unter dem Gesichtspunkt der Toxizität unbedenklich ist.

3.2 Einfluss von Grüntee-Catechinen auf den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg

Verschiedenen Studien zufolge hat EGCG Insulin-mimetische Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*. Inwieweit diese Eigenschaften über den Insulin-responsiven PI3K/Akt/FoxO-Signalweg vermittelt werden bzw. inwieweit EGCG Insulin-mimetisch auf diesen Signalweg einwirkt, sollte mit den folgenden Untersuchungen ermittelt werden.

3.2.1 Insulin-mimetische Stimulierung der Akt-Phosphorylierung durch EGCG

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Insulin unter den gegebenen Zellkulturbedingungen dazu in der Lage ist, Akt in HFFF2-Fibroblasten zu aktivieren. Weiterhin sollte EGCG mit drei weiteren Grüntee-Catechinderivaten verglichen werden. Wird Akt in Antwort auf Insulin aktiviert, zeigt sich dies unter anderem in der Phosphorylierung von Akt an Ser-473. Nach der Behandlung der HFFF2-Zellen mit den Catechin-Derivaten oder mit Insulin für 4 Stunden wurde diese Phosphorylierung mittels Westernblot-Analyse untersucht. Vor der Behandlung wurden die Zellen über Nacht serumdepletiert, da die im fötalen Kälberserum (FCS) enthaltenen Wachstumsfaktoren in der Lage sind, eine unerwünschte basale Phosphorylierung der am untersuchten Signalweg beteiligten Faktoren zu stimulieren. Aus diesem Grund, und da Proteine und andere Substanzen aus dem FCS die Catechine binden oder beeinflussen könnten, wurden auch sämtliche Behandlungen in serumfreiem Medium durchgeführt. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde EGCG aus verschiedenen Produktionschargen verwendet. Da diese Chargen kleinere Unterschiede aufwiesen, ist im Folgenden im Fall von EGCG immer das verwendete Lot genannt.

In vier voneinander unabhängigen Experimenten war nach der Insulin-Behandlung eine deutliche Phosphorylierung von Akt an Ser-473 zu beobachten. Von den vier Catechinen war nur EGCG dazu in der Lage, diese Aktivierung eindeutig zu imitieren. Dabei kam es, wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, bei den Behandlungen mit

100 μM EGCG immer zu einer deutlichen Aktivierung der Akt nach 4 Stunden. In manchen Fällen konnte nach Behandlungen mit EGC ein schwach zu erkennendes Signal phosphorylierter Akt detektiert werden, wie auch bei 30 μM EGCG.

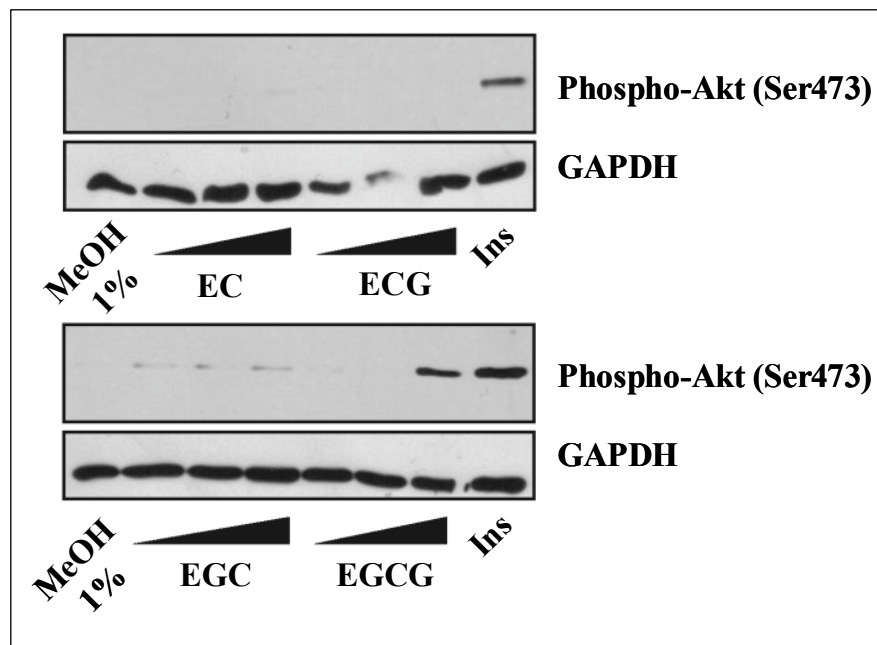


Abb. 3.2: Phosphorylierung von Akt in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit Catechinen

Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine vierstündige Behandlung mit Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC), oder Epigallocatechingallat (EGCG, Lot 1) mit einer Konzentration von 10, 30 oder 100 μM bzw. mit Insulin (0,1 μM). 1% MeOH diente als Lösemittelkontrolle. Nach einer Lyse der behandelten Zellen folgte Westernblot-Analyse und Immunodetektion von phosphoryliertem Akt und Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Das gezeigte Beispiel ist repräsentativ für mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Anders verhielt es sich bei der Verwendung einer weiteren Charge EGCG (Lot 3). In diesen Untersuchungen war, wie Abbildung 3.3 beispielhaft zu entnehmen, bei dem Einsatz von 30 μM EGCG in jedem Fall bereits eine deutliche Phosphorylierung der Akt zu detektieren.

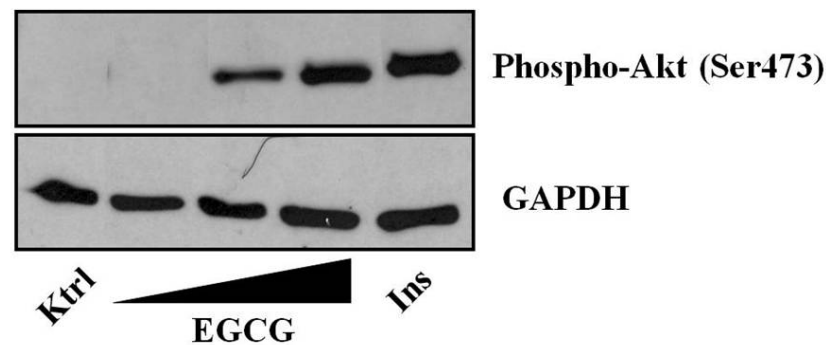


Abb. 3.3: Phosphorylierung von Akt in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit EGCG und DMEM jeweils einer anderen Charge

Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine vierstündige Behandlung mit Epigallocatechingallat (EGCG, Lot 3) mit einer Konzentration von 10, 30 oder 100 μM bzw. mit Insulin (0,1 μM). 1% MeOH diente als Lösemittelkontrolle. Nach einer Lyse der behandelten Zellen folgte Westernblot-Analyse und Immunodetektion von phosphoryliertem Akt und Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Das gezeigte Beispiel ist repräsentativ für mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Um die konzentrationsabhängige Phosphorylierung von Akt durch EGCG verschiedener Chargen über die verschiedenen Versuchsanordnungen zu quantifizieren, wurde eine densitometrische Auswertung aller hierzu aufgeführten Ergebnisse vorgenommen. Die Spiegel des phosphorylierten Proteins Akt wurden zunächst auf den jeweiligen Spiegel Gesamtproteins der Probe, repräsentiert durch den GAPDH-Spiegel, normiert. Danach wurde die durch Insulin induzierte Akt-Phosphorylierung auf 100% gesetzt und die Werte der anderen Proben darauf bezogen. In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis dieser densitometrischen Auswertung dargestellt.

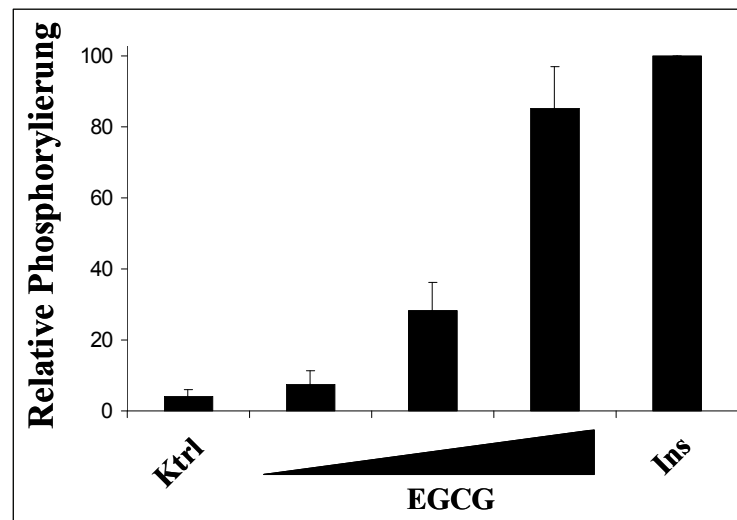


Abb. 3.4: Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von Akt

Die Abbildung 3.2 und 3.3 zugrunde liegenden Ergebnisse wurden densitometrisch ausgewertet. Den Werten liegen Behandlungen von HFFF2-Zellen mit Epigallocatechingallat (EGCG, Lot 1 oder 3) mit einer Konzentration von 10, 30 oder 100 μM bzw. mit Insulin (0,1 μM) zu grunde. 1% MeOH diente als Lösemittelkontrolle. Die densitometrischen Werte zu der Phosphorylierung von Akt wurden auf die jeweils zugehörigen Werte zu der Glyceraldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die gezeigten Werte sind jeweils auf den Wert der Insulin-behandelten Probe, welcher als 100% relative Phosphorylierung der Akt gesetzt wurde, normierte Mittelwerte aus den Werten der bereits angeführten Experimente $\pm$ SEM.

Vergleicht man die densitometrischen Werte der Proben zu den drei verschiedenen EGCG-Dosen über alle Experimente hinweg, so zeigt sich eine Korrelation zwischen der eingesetzten Konzentration an EGCG und der relativen Phosphorylierung der Akt.

3.2.2 FoxO-Phosphorylierung in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit Grüntee-Catechinen

Die Aminosäurereste Threonin-32 bei FoxO3a und Threonin-24 bei FoxO1a sind Stellen, welche direkt durch aktivierte Akt phosphoryliert werden. Aus den vorherigen Untersuchungen war bekannt, dass eine Dosis von 100 μ M EGCG im untersuchten Zellmodell in jedem Fall zu einer Aktivierung der Akt führt. Daher wurden hier EGCG und die anderen Catechinderivate zum Vergleich mit einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt, um die Phosphorylierung von FoxO1a und 3a in Antwort auf die Aktivierung von Akt durch die Grüntee-Catechine zu untersuchen. Als weitere Positivkontrolle für die Akt- und FoxO-Phosphorylierung wurden die Zellen in jedem der durchgeführten Experimente wie in den vorherigen Untersuchungen mit 100 nM Insulin behandelt, was wie erwartet zu einer deutlich detektierbaren Phosphorylierung von Akt und FoxO-Proteinen führte (Daten nicht gezeigt). Auch bei dieser Untersuchung wurden die Zellen vor der vierstündigen Behandlung serumdepletiert, um die basale Phosphorylierung der untersuchten Proteine möglichst gering zu halten. Nur die Behandlung mit EGCG führte in allen drei voneinander unabhängigen Experimenten zu einer deutlich detektierbaren Phosphorylierung von Akt, FoxO1a und FoxO3a an den genannten Aminosäureresten, wie in Abbildung 3.3 dargestellt. Bei längerer Exposition des Röntgenfilms und in einem Fall auch bei regulärer Expositionszeit war auch für EGC ein leichtes Signal der Phosphorylierung von FoxO1a und FoxO3a zu detektieren. Im Vergleich der vier Grüntee-Catechine war also nur EGCG dazu in der Lage, eindeutig die Wirkung von Insulin auf die FoxO-Transkriptionsfaktoren über die Aktivierung von Akt zu imitieren.

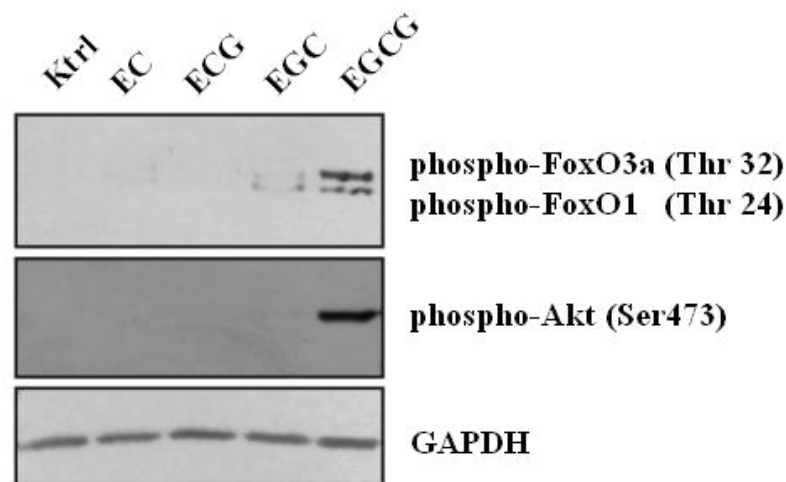


Abb. 3.5: Phosphorylierung von FoxO1a und FoxO3a sowie von Akt in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit Catechinen

Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine vierstündige Behandlung mit Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC), oder Epigallocatechingallat (EGCG, Lot 1) mit einer Konzentration von 100 μM bzw. mit Insulin (0,1 μM). 1% MeOH diente als Lösemittelkontrolle. Nach einer Lyse der behandelten Zellen folgte Westernblot-Analyse und Immunodetektion von phosphoryliertem Akt, FoxO1, FoxO3a und Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Das gezeigte Beispiel ist repräsentativ für mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.2.3 Nachweis für PI3K-Abhängigkeit der Insulin-mimetischen Aktivierung des Akt/FoxO Signalwegs durch EGCG

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von Akt durch EGCG über PI3K läuft. Um dies zu testen, wurden die beiden strukturell von einander unterschiedlichen, für die PI3K spezifischen Inhibitoren Wortmannin und LY294002 eingesetzt. Vor der Behandlung der Zellen mit 100 μM EGCG, 0,1 μM Insulin oder 1% Methanol erfolgte nach Serumdepletion über Nacht eine einstündige Präinkubation mit den Inhibitoren oder DMSO als Lösemittelkontrolle. Dann folgte die vierstündige Behandlung mit den genannten Komponenten in Gegenwart jeweils einer der Inhibitoren oder DMSO. In Western-Analysen wurde in den so behandelten

Zellen die Aktivierung von Akt wie bereits beschrieben anhand des Phosphorylierungsstatus untersucht (Abbildung 3.2).

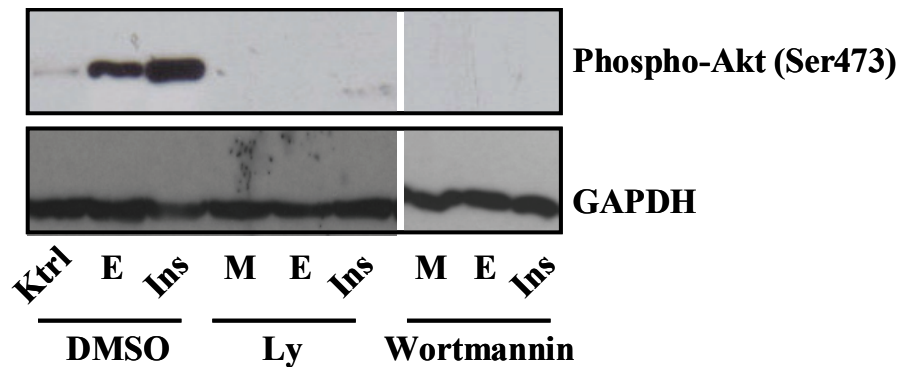


Abb. 3.6: Die Rolle der PI3K bei der durch EGCG induzierten Phosphorylierung von Akt

Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Präinkubation mit LY294002 (Ly, 50 μ M), Wortmannin (0,2 μ M) oder DMSO (Lösemittelkontrolle). Die Zellen wurden gewaschen und mit EGCG aus Lot 1 (E, 100 μ M) oder Insulin (0,1 μ M) in Gegenwart frischer Inhibitoren, wie bei der Präinkubation eingesetzt, für 4 Stunden behandelt. Als Lösemittelkontrolle für EGCG diente Methanol (M, 1%). Nach einer Lyse der behandelten Zellen folgte Westernblot-Analyse und Immunodetektion von phosphoryliertem Akt und Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Das gezeigte Beispiel ist repräsentativ für mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Wie beispielhaft in Abbildung 3.6 zu sehen, zeigten die Untersuchungen, dass die Behandlung mit EGCG oder Insulin keine Aktivierung der Akt mehr zu Folge hatte wenn einer der beiden unterschiedlichen PI3K-Inhibitoren eingesetzt wurde. Demgegenüber war DMSO, Lösemittel der Inhibitoren, nicht in der Lage, die bekannte Aktivierung der Akt durch EGCG oder Insulin zu inhibieren.

3.3 Die Rolle von Wasserstoffperoxid in der Aktivierung des PI3K/Akt/FoxO-Signalwegs durch EGCG

Reaktive Sauerstoffspezies sind bekanntermaßen in der Lage, die PI3K/Akt/FoxO Signalkaskade zu aktivieren (Kapitel 1.2.1). Darüber hinaus kann es bei der Verwendung phenolischer Verbindungen wie EGCG in manchen Zellkulturversuchsanordnungen zu einer Bildung von Wasserstoffperoxid kommen. In den nun folgenden Untersuchungen sollte ermittelt werden, in welchem Maß es in der in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturanordnung zu einer Bildung von Wasserstoffperoxid bei dem Einsatz von EGCG kommt. Auch der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg wurde untersucht.

3.3.1 Bildung von Wasserstoffperoxid durch EGCG in Zellkulturmedium

Um zu überprüfen, ob es in der hier verwendeten Zellkulturanordnung zur Bildung von Wasserstoffperoxid durch EGCG kommt, wurde die Versuchsanordnung so gewählt, dass sie mit der der Zellkulturversuche zur Aktivierung des PI3K/Akt/FoxO Signalwegs übereinstimmt. Auch hier wurde DMEM als Medium verwendet, nur ohne Phenolrot. Gemessen wurde die H_2O_2 -Konzentration über die durch HRP (Meerrettichperoxidase) katalysierte Oxidation von AmplexRed sowie Detektion des fluoreszierenden Produkts, Resorufin (Anregung $530 \pm 25\text{nm}$, Emission $590 \pm 35\text{nm}$). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von EGCG wurden 5 μl -Aliquots entnommen und die H_2O_2 -Konzentrationen bestimmt.

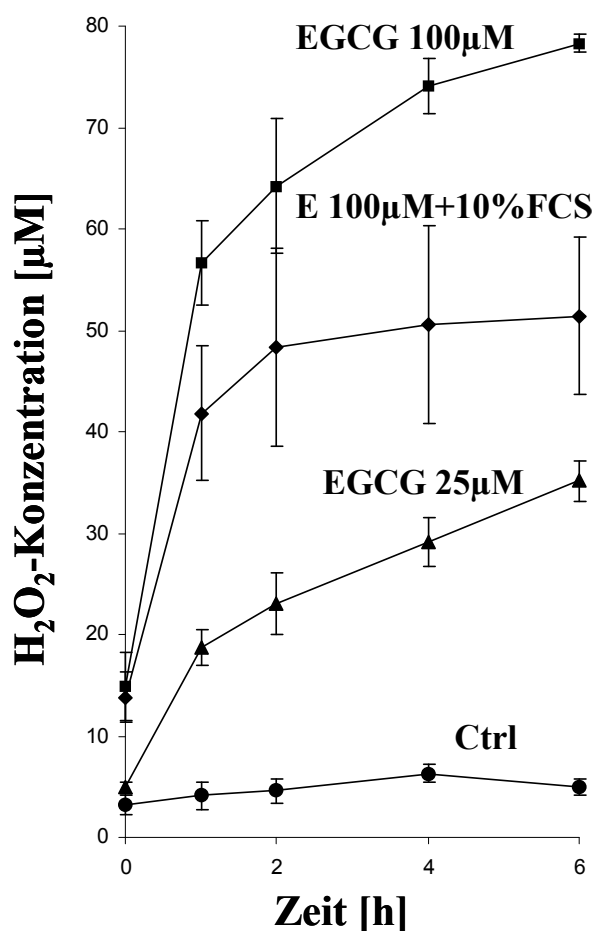


Abb. 3.7: Bildung von Wasserstoffperoxid durch EGCG in DMEM

EGCG (Lot1) (E, 100 µM und E, 25 µM) wurde in 1 ml DMEM mit (E 100/S) und ohne (E 100, E 25) 10% (v/v) FCS verdünnt und in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden 5 µl Aliquots von jeder Probe entnommen und die H₂O₂ Konzentrationen mittels Amplex Red/HRP bestimmt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SEM.

Die Menge an gebildetem Wasserstoffperoxid nach der Applikation von EGCG in DMEM sollte ohne den Einfluss durch Zellen untersucht werden. Zellen nehmen das EGCG auf und produzieren Enzyme, welche H₂O₂ abbauen. Diese Effekte wären vom verwendeten Zelltyp abhängig und könnten erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen verursachen, die nicht mehr auf EGCG zurückzuführen wären.

Nach 6 Stunden stieg die Konzentration an Wasserstoffperoxid nicht weiter an, sondern fiel innerhalb weiterer 18 Stunden leicht ab. Wie Abbildung 3.7 zu entnehmen ist, wurden in der Zellkulturversuchsanordnung, wie sie in dieser Arbeit für alle Versuche verwendet wurde, nach der Zugabe von 100 μM EGCG sogar bei Anwesenheit von 10% FCS signifikante Konzentrationen an Wasserstoffperoxid gebildet (im Durchschnitt ca. 51 μM).

Tab. 3.1: Bildung von Wasserstoffperoxid in DMEM induziert

Die angegebenen Catechinderivate wurden in 1 ml DMEM verdünnt und in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C (5% CO_2) inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die H_2O_2 Konzentrationen mittels Amplex Red/HRP bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Substanz	H_2O_2 [μM] $\pm$ SEM
1% MeOH (Kontrolle)	5,8 $\pm$ 2,2
EGCG (Lot1) 100 μM	78,3 $\pm$ 0,9
EGCG (Lot2) 100 μM	120,2 $\pm$ 15,1
EGCG (Lot3) 100 μM	84,2 $\pm$ 9,7
EGCG (Lot3) 10 μM	22,8 $\pm$ 1,9
EGCG (Lot3) 1 μM	7,9 $\pm$ 4,7
EC 100 μM	13,3 $\pm$ 2,9
ECG 100 μM	28,1 $\pm$ 3,0
EGC 100 μM	69,5 $\pm$ 7,5

Nachdem bekannt war, dass nach Zugabe von EGCG in DMEM die höchste Konzentration an Wasserstoffperoxid nach 6 Stunden erreicht wird, wurden zum Vergleich der verschiedenen EGCG-Chargen und der anderen Catechin-Derivate Messungen der gebildeten Konzentrationen an H_2O_2 zu diesem Zeitpunkt

vorgenommen. In einem Einzelversuch wurde die Bildung von H_2O_2 nach Zugabe von EGCG aus Lot 1 erneut bestimmt, dieses Mal in der Charge DMEM, wie sie in den Zell-Versuchen mit EGCG von Lot3 verwendet wurde. In dieser Charge wurde eine Konzentration von $55\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 erreicht, was einer etwa 31% geringeren H_2O_2 -Konzentration gegenüber der zuvor verwendeten Charge DMEM entsprach. Wie Tabelle 3.1 zeigt, gab es zwischen den einzelnen Chargen EGCG deutliche Unterschiede. So wurden 6 Stunden nach der Applikation von $100\text{ }\mu\text{M}$ EGCG aus Lot 3 bis zu $95\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 , von EGCG aus Lot 2 sogar bis zu $150\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 gebildet. Nach Zugabe von EGCG aus Lot 1 wurde, wie bereits gezeigt, maximal eine Konzentration von $79\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 erreicht. Mit sinkenden Konzentrationen applizierten EGCGs nahm auch die Konzentration des Wasserstoffperoxids ab. Nach Zugabe von $1\text{ }\mu\text{M}$ EGCG wurden Konzentrationen gemessen, die sich fast nicht mehr von denen unter Kontrollsituation unterschieden. Auch die Zugabe von $100\text{ }\mu\text{M}$ EC führte nur zu geringer Bildung von H_2O_2 ($13\text{ }\mu\text{M}$ im Durchschnitt). 6 Stunden nach Applikation von ECG wurden im Durchschnitt $28\text{ }\mu\text{M}$ und 6 Stunden nach Applikation von EGC $69\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 gemessen.

Zusammenfassend steigt das Ausmaß der Bildung von H_2O_2 in Gegenwart von Catechinen wie folgt:

$$\text{EC} < \text{ECG} < \text{EGC} < \text{EGCG}.$$

Um zu testen, ob die Messungen in der hier verwendeten Versuchsanordnung tatsächlich spezifisch für Wasserstoffperoxid waren, wurde zu dem wasserstoffperoxidhaltigen Medium $300\text{ }\mu\text{M}$ MnTBAP hinzugegeben. Diese Komponente weist eine katalasemimetische Aktivität auf und ist in der Lage, H_2O_2 abzufangen. Direkt nach der Zugabe von MnTBAP wurde kein H_2O_2 mehr detektiert.

3.3.2 Aktivierung von Akt durch EGCG über Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid ist ein starker Aktivator des untersuchten Signalwegs und in der Lage, die Phosphorylierung von Akt an der untersuchten Phosphorylierungsstelle zu induzieren. Nach den Untersuchungen zu der Bildung von H_2O_2 durch Catechine war nun von Interesse, ob Wasserstoffperoxid verantwortlich für die Aktivierung des PI3K/Akt/FoxO-Signalwegs durch EGCG war. Hierzu wurden erneut humane Fibroblasten in An- und Abwesenheit von 300 μM MnTBAP mit 100 μM EGCG behandelt.

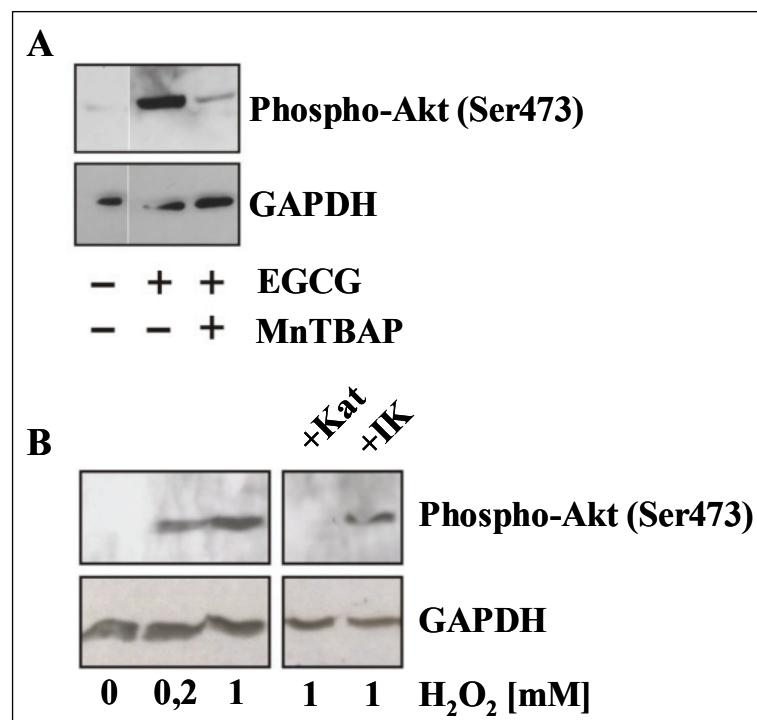


Abb. 3.8: Aktivierung von Akt durch EGCG über H_2O_2

(A) Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine 4-stündige Behandlung mit EGCG in Gegenwart oder Abwesenheit von MnTBAP (300 μM). (B) Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Behandlung mit Wasserstoffperoxid in den angegebenen Konzentrationen in Ab- oder Anwesenheit von Katalase (Kat, 40 U) oder hitzeinaktivierter Katalase (IK, 40 U). Nach einer Lyse der behandelten Zellen (A, B) folgte Westernblot-Analyse und Immunodetektion von phosphoryliertem Akt und Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Die gezeigten Beispiele sind repräsentativ für jeweils mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Wie Abbildung 3.8 A zu entnehmen ist, war nach 4 Stunden Behandlung mit EGCG erwartungsgemäß eine deutliche Phosphorylierung der Akt zu detektieren. In Anwesenheit von MnTBAP jedoch blieb diese Phosphorylierung und somit Aktivierung der Akt in drei voneinander unabhängigen Experimenten aus.

Um zu ermitteln, ob Wasserstoffperoxid in der Lage ist, die für EGCG beobachtete Aktivierung von Akt in Fibroblasten zu induzieren, wurden diese mit 0,2 mM oder 1 mM H_2O_2 behandelt. Wie in Abbildung 3.8 B beispielhaft dargestellt, führte die Verwendung beider Konzentrationen bereits nach 30 Minuten zu einer deutlichen Aktivierung von Akt. Diese Aktivierung war tatsächlich auf H_2O_2 zurückzuführen, wie die Applikation von aktiver oder durch Hitze inaktivierte Katalase zeigte. Im Fall der inaktivierten Katalase war weiterhin eine deutliche durch 1 mM H_2O_2 induzierte Phosphorylierung von Akt zu detektieren. Fand die Behandlung der Fibroblasten mit H_2O_2 jedoch in Gegenwart von aktiver Katalase statt, so konnte keinerlei aktive Akt detektiert werden.

Insgesamt war EGCG deutlicher als die anderen Catechinderivate in der Lage, die Bildung von Wasserstoffperoxid in DMEM-Zellkulturmedium zu induzieren. Weiter blieb die Insulin-mimetische Aktivierung von Akt durch EGCG aus, wenn die Behandlung der Zellen in Gegenwart des H_2O_2 -abfangenden MnTBAP stattfand. Wasserstoffperoxid induzierte in einer Konzentration, die mit der bei der Applikation von 100 μM EGCG in DMEM entstehenden vergleichbar ist, Akt deutlich.

3.4 Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren

EGCG erwies sich bei der Betrachtung des Insulin-responsiven PI3K/Akt-Signalwegs in hohen Konzentrationen als Insulinmimetikum. Wie bereits erwähnt, sind es die FoxO-Transkriptionsfaktoren, welche eine breites Spektrum der Wirkungen von Insulin vermitteln können. Im Folgenden sollte ermittelt werden, in welcher Weise die FoxO-Transkriptionsfaktoren selbst durch die Behandlung von Zellen mit EGCG

moduliert werden. Darüber hinaus sollte die physiologische Relevanz der *in vitro* gefundenen Resultate überprüft werden, indem der *in vivo*-Modellorganismus *C.elegans* ebenfalls mit EGCG behandelt wurde. Der Nematode wurde gewählt, da er bereits als Modellorganismus für die Untersuchung biologischer Effekte von Polyphenolen etabliert war (Kampkötter et al., 2007a; Kampkötter et al., 2007b). Neben der Modulation der subzellulären Lokalisation von FoxO-Transkriptionsfaktoren sollte auch die Aktivität der Transkriptionsfaktoren untersucht werden, da beispielsweise im Kern befindliches FoxO nicht zwangsläufig aktiv sein muss. Die humanen Fibroblasten erwiesen sich in im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen als nicht geeignet für Luciferase-Reporter-Gen-Assays zur Bestimmung der Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren. Die Transfektion der Fibroblasten (HFFF2) und die Überexpression von FoxO1a führte nach verschiedenen Behandlungsmustern mit EGCG zu einer erheblichen Reduktion der Expression des Renilla-Luciferase-Konstrukts im Vergleich zur Kontrollsituation.

Um die Aktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren bestimmen zu können wurde daher, wie im Folgenden beschrieben, die DNA-Bindeaktivität von endogenem FoxO untersucht.

3.4.1 Modulation der subzellulären Lokalisation sowie der Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren

Wie in Kapitel 3.2 gezeigt, resultiert die Aktivierung von Akt in der Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren. Diese Phosphorylierung kann zur Inaktivierung und Kernexklusion dieser Faktoren führen. Um zu ermitteln, ob die Aktivierung von Akt in mit Wasserstoffperoxid behandelten Zellen tatsächlich zu einer Verringerung des Anteils von FoxO im Zellkern führt, wurden humane Fibroblasten oder humane Hepatomzellen (HepG2) mit einem Konstrukt transient transfiziert, welches für ein Fusionsprotein aus EGFP und FoxO1a kodiert. Zellen, die dieses Konstrukt exprimierten, wurden für 30 Minuten mit Wasserstoffperoxid oder dem H₂O₂ bildenden, membrangängigen Menadion behandelt. Es folgte eine

fluoreszenzmikroskopische Analyse der so behandelten Zellen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von FoxO1-EGFP.

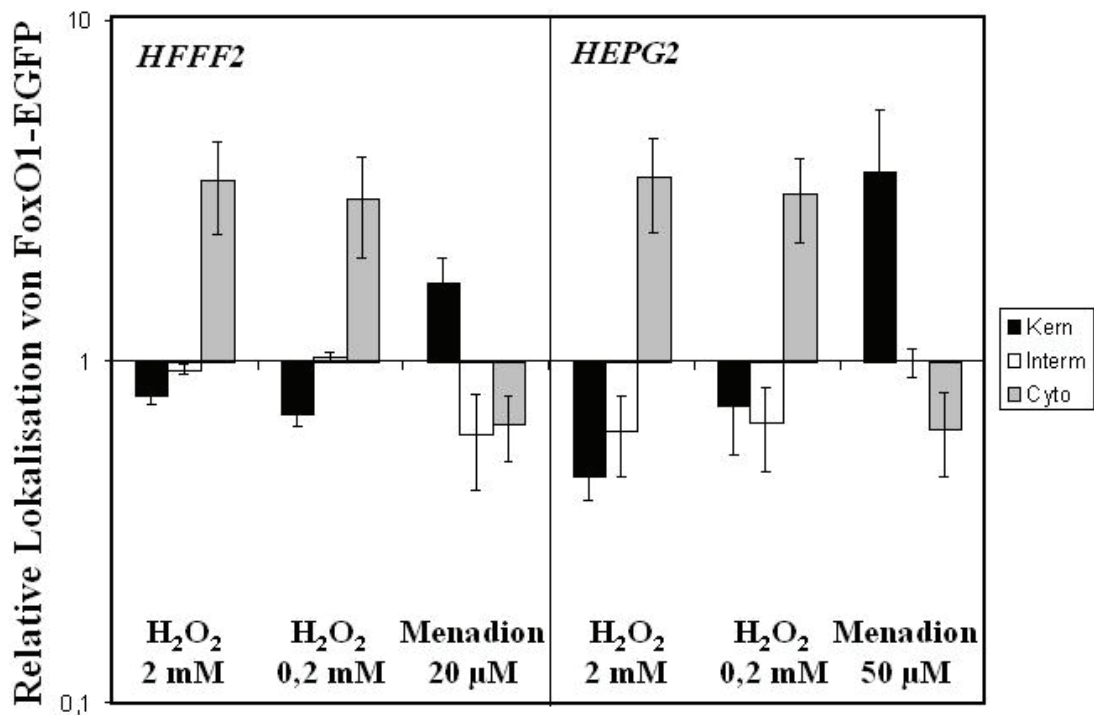


Abb. 3.9: Subzelluläre Lokalisation von FoxO1a in HFFF2- und HepG2-Zellen nach Behandlung mit H₂O₂ oder Menadion

HFFF2- oder HepG2-Zellen wurden mit einem Plasmid, welches für FoxO1a-EGFP kodiert, transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen für 30 Minuten mit H₂O₂ (0,2 mM oder 2 mM) oder Menadion (20 µM oder 50 µM) behandelt. Unverzüglich erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von FoxO1a-EGFP. Die EGFP positiven Zellen aus mindestens 10 Mikroskopfeldern wurden in nukleär, cytoplasmatisch oder nukleär/cytoplasmatisch klassifiziert und gezählt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ± SEM.

EGFP-positive Zellen wurden in 3 Gruppen kategorisiert: Zellen, welche das Fusionsprotein maßgeblich im Kern lokalisiert (Kern), homogen im Kern und Cytoplasma verteilt (Intermediär) oder maßgeblich im Cytoplasma (Cytoplasma) trugen. Für jede Behandlung wurden die Zellen der jeweiligen Gruppen ausgezählt und die Werte auf die entsprechenden Werte der Kontrolle normiert. Unter

Kontrollbedingungen war FoxO1a-EGFP in durchschnittlich 30% der analysierten Zellen maßgeblich im Kern lokalisiert. Demgegenüber trugen 10% der Zellen das Protein exklusiv cytosolisch und etwa 60% zu gleichen Anteilen im Kern und Cytoplasma.

Wie Abbildung 3.9 zu entnehmen ist, führte die Behandlung der beiden Zelllinien HFFF2 und HepG2 mit H_2O_2 in jedem Fall zu einer Translokation von FoxO1a aus dem Kern in das Cytoplasma. Demgegenüber stimulierte die Behandlung mit Menadion in beiden Zelllinien die Akkumulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Extrazellulär appliziertes Wasserstoffperoxid war also per se in der Lage, die Lokalisation von FoxO-Transkriptionsfaktoren in einer Weise zu modulieren, wie sie auf Grund der Aktivierung von Akt zu erwarten war.

Die Auswirkungen der Behandlungen von Zellen mit EGCG wurden zunächst auf dieselbe Weise untersucht, wie zuvor zu Abbildung 3.9 beschrieben. Einhergehend mit den Ergebnissen zu der Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade, stimuliert durch Behandlung mit Insulin, resultierte die Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren in einer Translokation von FoxO1 aus dem Zellkern in das Cytoplasma (Abbildung 3.10 A) in humanen Fibroblasten. Entgegen der Insulin-mimetischen Wirkung von EGCG auf die PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade führte die Behandlung der Zellen mit EGCG aus Lot 1, welches nachweislich in deutlich geringerer Weise die Bildung von H_2O_2 induzierte als die anderen Chargen, zu einer Insulin-antagonistischen Modulation von FoxO. Durch die Behandlung mit 100 μM EGCG wurde in dieser Versuchsreihe eine Akkumulation der Transkriptionfaktoren im Zellkern stimuliert. Ein Beispiel für die Akkumulation von FoxO1a-EGFP im Zellkern ist in Abbildung 3.10 B gegeben. Das Catechin war desweiteren, wie Abbildung 3.10 A zu entnehmen, in der Lage, die Wirkung von Insulin aufzuheben. Trotz paralleler Applikation von Insulin führte hier die Behandlung mit EGCG ebenfalls zu einer erhöhten Präsenz von FoxO1a im Zellkern.

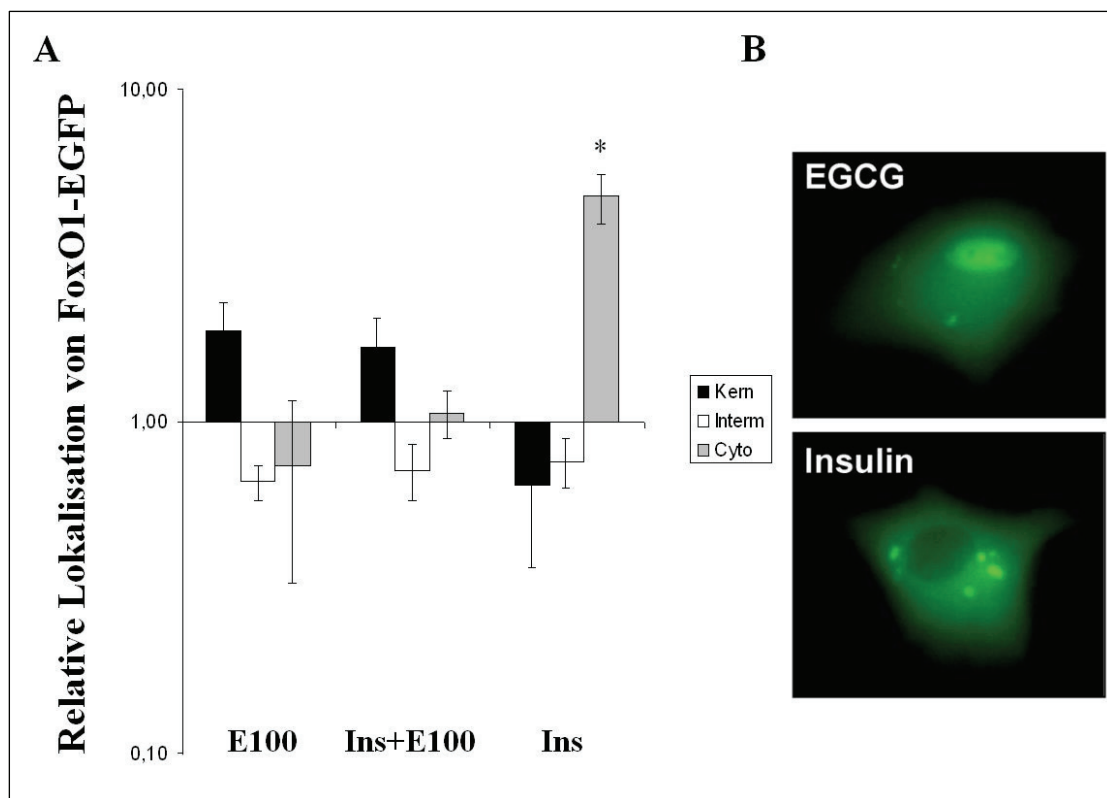


Abb. 3.10: Subzelluläre Lokalisation von FoxO1a in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit EGCG

HFFF2-Zellen wurden mit einem Plasmid, welches für FoxO1a-EGFP kodiert, transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen für 4 Stunden mit Methanol (Lösemittelkontrolle), EGCG (Lot 1, 100 μ M) und/oder Insulin (0,1 μ M) behandelt. Unverzüglich erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von FoxO1a-EGFP. Die EGFP-positiven Zellen aus mindestens 10 Mikroskopfeldern wurden in nukleär, cytoplasmatisch oder nukleär/cytoplasmatisch klassifiziert und gezählt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM. Im Teil B dieser Abbildung sind Beispiele für FoxO1a-EGFP positive Zellen der Klassifizierung Kern (EGCG) und Cytoplasma (Insulin) gezeigt.

Es bestand die Möglichkeit, dass die beobachteten Effekte hinsichtlich der Lokalisation von FoxO1a lediglich auf dessen Überexpression zurückzuführen sind. Dies sollte ausgeschlossen werden, indem die Lokalisation von endogenem FoxO nach entsprechenden Behandlungen beobachtet wurde. Hierfür wurden Fibroblasten für 4 Stunden mit 100 μ M EGCG, 100 nM Insulin oder 0,1% Methanol als Lösemittelkontrolle behandelt. Nach der Fixierung der behandelten Zellen mit Formaldehyd und Methanol wurde endogenes FoxO mit einem entsprechenden Primärantikörper und einem Sekundärantikörper gekoppelt an eine fluoreszierende Komponente markiert. Mit einem DAPI-haltigen Reagenz wurden diese Zellen fixiert,

konserviert und die Zellkerne angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopisch Untersuchungen der Lokalisation endogenen FoxOs wurden zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt.

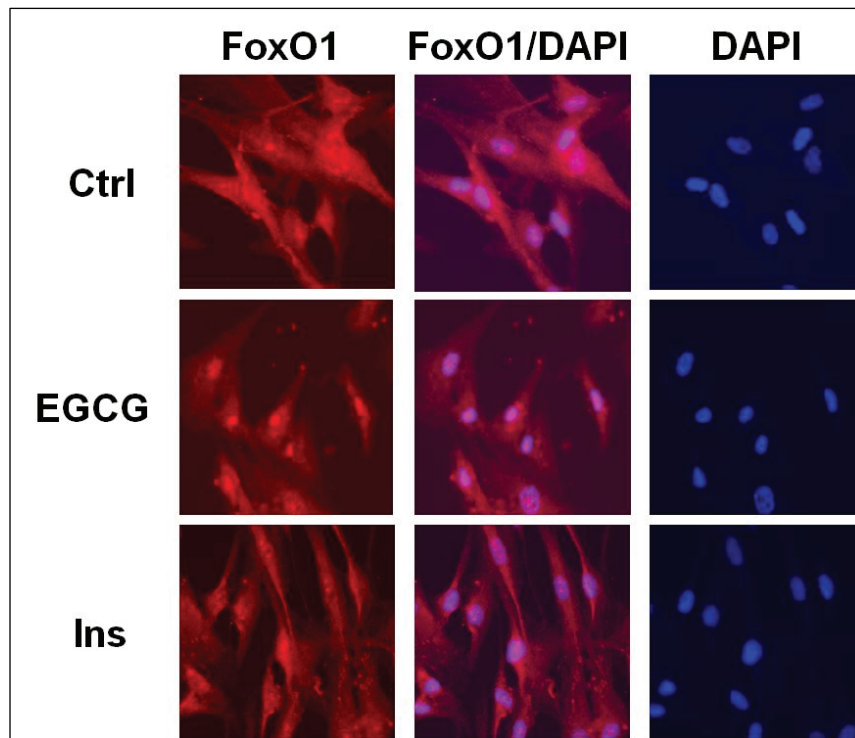


Abb. 3.11: Subzelluläre Lokalisation von FoxO1 in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit EGCG

Auf Deckgläsern ausgesäte HFFF2-Zellen wurden für 4 Stunden mit Methanol (Lösemittelkontrolle), EGCG (Lot 1, 100 μ M) oder Insulin (0,1 μ M) behandelt. Es folgte ein kurzer Waschschrift mit anschließender Fixierung mittels Formaldehyd und Methanol. Endogenes FoxO1 wurde immunocytochemisch markiert (rot). Die Konservierung der Zellen mit Mountingreagenz, welches DAPI enthielt, machten eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von FoxO1, sowie die Sichtbarkeit der Zellkerne (blau) zu einem späteren Zeitpunkt möglich. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, kam es nach der Behandlung von Fibroblasten mit 100 μ M EGCG zu einer Akkumulation von endogenem FoxO1 im Zellkern. Nach der Stimulierung mit Insulin konnte in den Fibroblasten keine eindeutige Kernexklusion von FoxO1 beobachtet werden, wie dies im Fall der Überexpression von FoxO1a-

EGFP der Fall war. Weiter erlaubte die Methode der Überexpression von FoxO1a-EGFP eine bessere Quantifizierung der beobachteten Effekte durch die verschiedenen Behandlungen. Aus diesen Gründen wurden weitere Untersuchungen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von FoxO1 wie zu Abbildung 3.9 und 3.10 durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob die anderen beiden relevanten Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie, FoxO3a und FoxO4, in der in dieser Arbeit untersuchten Signalkaskade durch die Flavonoide aus grünem Tee beeinflusst werden, sollten ebenfalls immunocytochemische Untersuchungen der endogenen Proteine vorgenommen werden. Es zeigte sich jedoch, dass endogenes FoxO4 in den Fibroblasten nicht zu detektieren war. Daher wurden hier immunocytochemische Untersuchungen überexprimierter FoxO4-Transkriptionsfaktoren vorgenommen.

Die Untersuchungen zu endogenem FoxO3 zeigten, dass der Transkriptionsfaktor konstitutiv im Kern lokalisiert vorlag. Selbst nach der Stimulierung der Zellen mit Insulin war, wie in Abbildung 3.12 A dargestellt, eine deutliche Akkumulation von FoxO3 im Zellkern zu beobachten. Zu dem gleichen Ergebnis führten Untersuchungen in humanen Hepatomzellen (HepG2, Daten nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt, konnte FoxO4 mittels der immunocytochemischen Methode nur detektiert werden, wenn es überexprimiert wurde (siehe Abbildung 3.12 B). Hier weisen die mit DAPI gefärbten Zellkerne auf das Vorhandensein von Zellen hin, in denen FoxO4 nicht überexprimiert wurde und somit nicht detektiert werden konnte. Auf Grund dieser Ergebnisse zu FoxO3a und FoxO4 wurde in folgenden Untersuchungen zu der Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren nur noch FoxO1 untersucht.

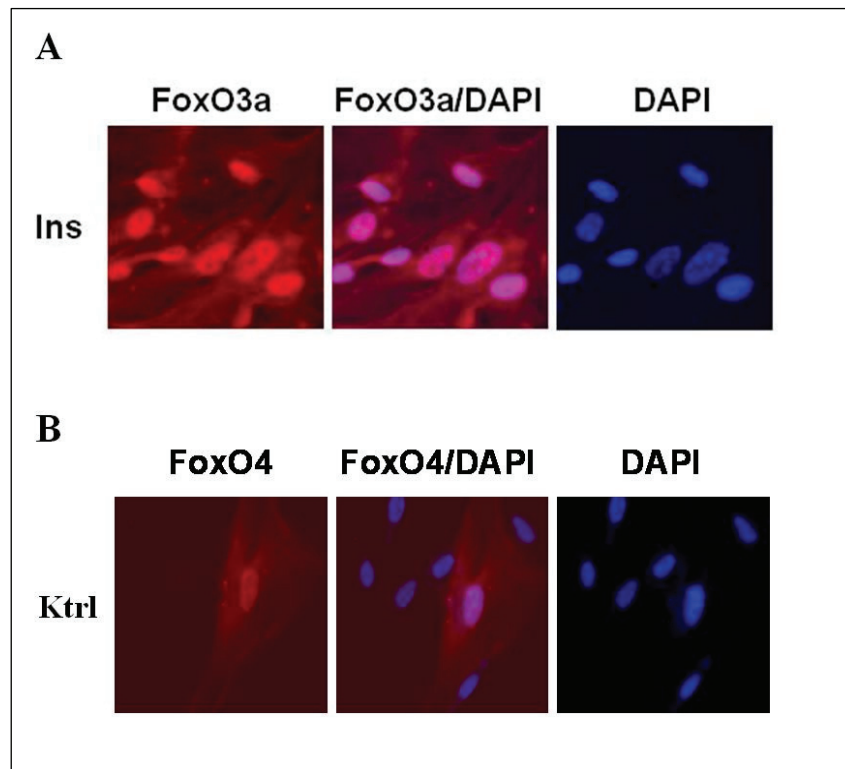


Abb. 3.12: Subzelluläre Lokalisation von FoxO3a und FoxO4 in HFFF2-Zellen

(A) Auf Deckgläsern ausgesäte HFFF2-Zellen wurden für 4 Stunden mit Insulin (0,1 μ M) behandelt. Es folgte ein kurzer Waschschrift mit anschließender Fixierung mittels Formaldehyd und Methanol. (B) Auf Deckgläsern ausgesäte HFFF2-Zellen wurden transient mit einem Konstrukt, welches für FoxO4 kodiert, transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Formaldehyd und Methanol fixiert. (A, B) Endogenes FoxO1 bzw. überexprimiertes FoxO4 wurden immunocytochemisch markiert (rot). Die Konservierung der Zellen mit Mountingreagenz, welches DAPI enthielt, machten eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von FoxO1 sowie die Sichtbarkeit der Zellkerne (blau) zu einem späteren Zeitpunkt möglich. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils zwei voneinander unabhängige Experimente.

Allein die Steigerung der Menge an FoxO-Transkriptionsfaktoren im Zellkern ist kein Garant für eine gesteigerte Aktivität. Um den Effekt von EGCG auf die Aktivität von FoxO zu ermitteln, wurden humane Fibroblasten für 4 Stunden mit 100 μ M EGCG und/oder 0,1 μ M Insulin behandelt, 0,1% Methanol diente als Lösemittelkontrolle. Nach der Behandlung wurde eine Extraktion der Kernproteine vorgenommen und die hier enthaltenen FoxO-Proteine hinsichtlich ihrer DNA-Bindeaktivität untersucht.

Hierzu wurden die Kernextrakte auf 96-Well-Platten gegeben, in denen Oligonukleotide fixiert waren, welche FoxO-DNA-Bindeelemente (DBEs) trugen. Aktives FoxO wurde so in den Platten immobilisiert und konnte über einen gegen FoxO1a gerichteten Antikörper, unter Verwendung eines entsprechenden Sekundärantikörpers, gekoppelt an HRP, detektiert werden.

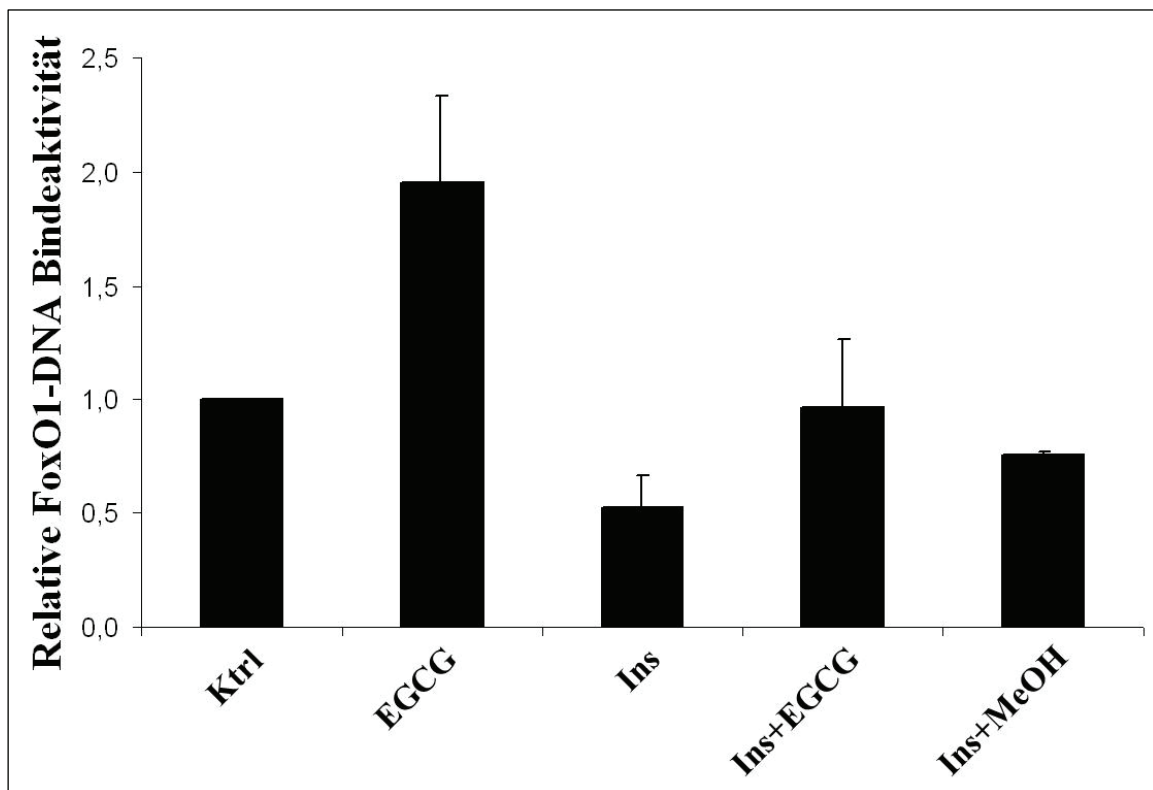


Abb. 3.13: FoxO1 DNA-Bindeaktivität in HFFF2 Zellen nach EGCG-Behandlung

HFFF2-Zellen wurden für 4 Stunden mit 0,1% Methanol (Lösemittelkontrolle) oder EGCG (Lot 1, 100 μ M) und/oder Insulin (0,1 μ M) behandelt. Anschließend erfolgte eine Isolierung von Kernproteinen, gefolgt von einer Bestimmung der relativen FoxO1 DNA-Bindeaktivität. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Wie Abbildung 3.13 zeigt, ging die gesteigerte Akkumulation von FoxO1 im Zellkern, stimuliert durch EGCG aus Lot 1, einher mit einer gesteigerten DNA-Bindeaktivität. Die Behandlung mit 100 μ M EGCG führte zu einer Steigerung der FoxO-Aktivität um etwa 95% im Durchschnitt. Die Behandlung mit Insulin hingegen resultierte, einhergehend mit der beobachteten Exklusion von FoxO aus dem Zellkern, in einer

Reduktion der Aktivität um durchschnittlich etwa 50%. Darüber hinaus war EGCG in der Lage, dem Effekt von Insulin auf die FoxO-Aktivität entgegenzuwirken. So wurde bei der Behandlung der Fibroblasten mit Insulin in Gegenwart von 100 μ M EGCG eine FoxO-Aktivität beobachtet, welche im Mittel in etwa der Aktivität unter Kontrollbedingungen entsprach. Diese Untersuchungen zeigten, dass EGCG die Aktivität von FoxO1 stimulierte, eine Stimulation der Kernlokalisation von FoxO jedoch nicht zwangsläufig zu einer gesteigerten Aktivität der FoxOs führen muss, wie das Beispiel der Parallelapplikation von Insulin und EGCG verdeutlicht. Hier wäre auf der Basis der Lokalisationsuntersuchungen eine Steigerung der FoxO-Aktivität gegenüber der Kontrollsituation zu erwarten gewesen.

Eine Stimulation der Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren sollte zu einer gesteigerten Expression der Zielgene führen. Mittels Realtime-PCR-Analysen der relativen mRNA-Mengen am Beispiel der zwei FoxO-Zielgene zu MnSOD (Kops et al., 2002a; Miyamoto et al., 2007) und p21 (Gomis et al., 2006) sollte ermittelt werden, ob die durch EGCG gesteigerte FoxO-Aktivität zu einer erhöhten FoxO-Zielgenexpression führt. Hierfür wurden humane Fibroblasten für 4 Stunden mit 0,1% Methanol, 100 μ M EGCG oder 0,1 μ M Insulin behandelt. Nach der Behandlung wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnene cDNA wurde in Realtime-PCR-Analysen unter Verwendung geeigneter Primer eingesetzt um die Menge der Zielgen-mRNA aus den behandelten Zellen, relativ zu der Menge der Zielgen-mRNA aus Zellen, welche unter Kontrollbedingungen behandelt wurden, zu ermitteln. Um mögliche Schwankungen in der eingesetzten Menge der cDNA zu berücksichtigen, wurde eine Normierung für jede Messung zu einem Housekeeping-Gen vorgenommen. Als solche Housekeeper dienten *gapdh* oder *hprt*.

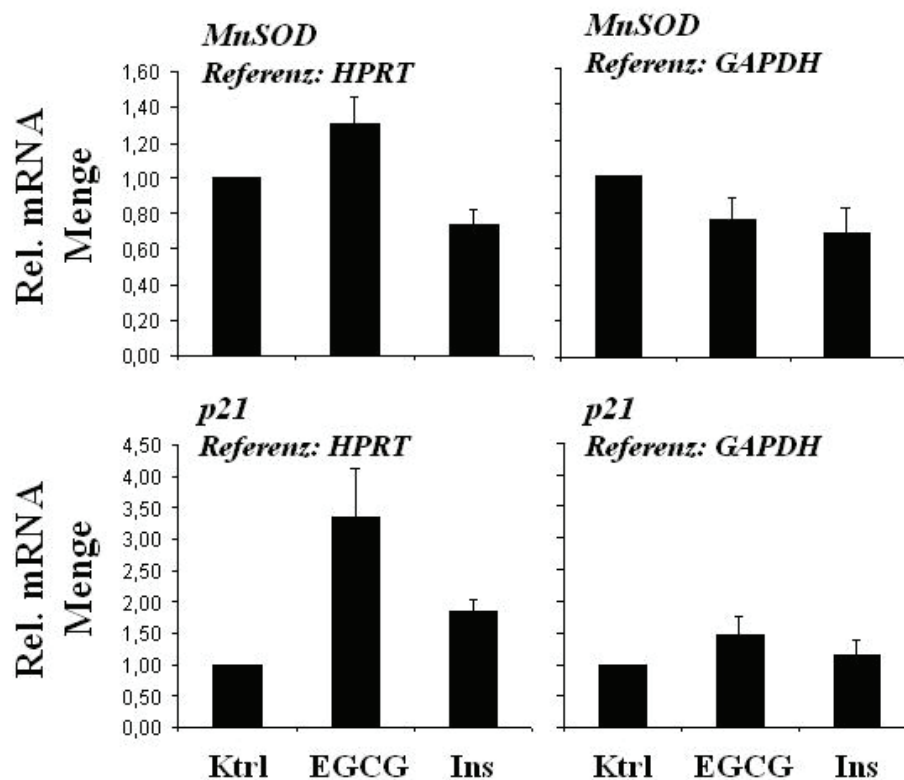


Abb. 3.14: Modulation der FoxO-Zielgen mRNA-Spiegel am Beispiel von MnSOD und p21

HFFF2-Zellen wurden für 4 Stunden mit 0,1% Methanol (Lösemittelkontrolle), EGCG (Lot 1, 100 μ M) oder Insulin (0,1 μ M) behandelt und die Gesamt-RNA isoliert. Gezeigt ist das Ergebnis der reversen Transkription mit anschließender Realtime-PCR auf die mRNA zu MnSOD oder p21 normiert auf *gapdh* oder *hprt* (Ladekontrolle). Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängige Experimenten $\pm$ SEM.

In den Untersuchungen zu der Modulation der FoxO-Zielgen mRNA-Spiegel durch EGCG konnten unter den verwendeten Parametern keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden. Wie Abbildung 3.14 zu entnehmen ist, variierten die Ergebnisse, je nachdem, welches Gen als Housekeeper zugrunde gelegt wurde. Betrachtet man die Ergebnisse basierend auf der Verwendung von *hprt* als Ladekontrolle, so war für MnSOD eine 30%ige Steigerung des mRNA-Spiegels nach der EGCG-Behandlung und eine 27%ige Reduktion des mRNA-Spiegels nach der Insulin-Behandlung zu verzeichnen. Legt man *gapdh* als Ladekontrolle zugrunde, bleibt das Ergebnis die MnSOD betreffend nach der Behandlung mit Insulin nahezu identisch. Die Behandlung der Fibroblasten mit EGCG hätte in diesem Fall jedoch zu einem um 24% niedrigeren MnSOD-mRNA Spiegel im Vergleich zu der Kontrolle geführt, was

dem Ergebnis zu der FoxO-Aktivität entgegenstünde. Ebenfalls abweichende Ergebnisse ergaben sich für die mRNA-Spiegel von p21. Normiert auf *hprt* ergab sich nach der Behandlung mit EGCG ein um 235% erhöhter mRNA-Spiegel, nach Stimulation mit Insulin eine Erhöhung des p21-mRNA-Spiegels um 84%. Wurde eine Normierung auf *gapdh* vorgenommen, so zeigte sich für die EGCG-Behandlung eine Stimulation der p21-Expression mit einer Erhöhung des mRNA-Spiegels um 46%, als Antwort auf Insulin eine Erhöhung des mRNA-Spiegels um 14%. Die Expression von p21 wurde also in jedem Fall durch EGCG in einem höheren Maß gesteigert als durch Insulin. Die Ergebnisse welche sich auf *hprt* als Housekeeper stützen stünden im Einklang mit der beobachteten Steigerung der FoxO-Aktivität, stimuliert durch EGCG und der Reduktion der FoxO-Aktivität durch Insulin. Eine ausführlichere Besprechung der Ergebnisse findet zu einem späteren Punkt statt.

Bei den Versuchen mit einer neuen Charge des EGCGs zur Kernlokalisierung von endogenem FoxO1 musste festgestellt werden, dass EGCG in hohen Konzentrationen (100 μ M) nicht mehr in der Lage war, Insulin-antagonistisch zu agieren. Daraufhin wurden Untersuchungen wie zu Abbildung 3.9 und 3.10 beschrieben durchgeführt. Wie beschrieben, wurde für die neue Charge EGCG (Lot 3) eine gegenüber der zuvor verwendeten Charge EGCG gesteigerte Fähigkeit gefunden, die Bildung von Wasserstoffperoxid zu stimulieren und Akt zu aktivieren. In hoher Konzentration zeigte diese Charge, wie in Abbildung 3.15 dargestellt, eine Insulin-mimetische Wirkung auf die Lokalisation von FoxO1.

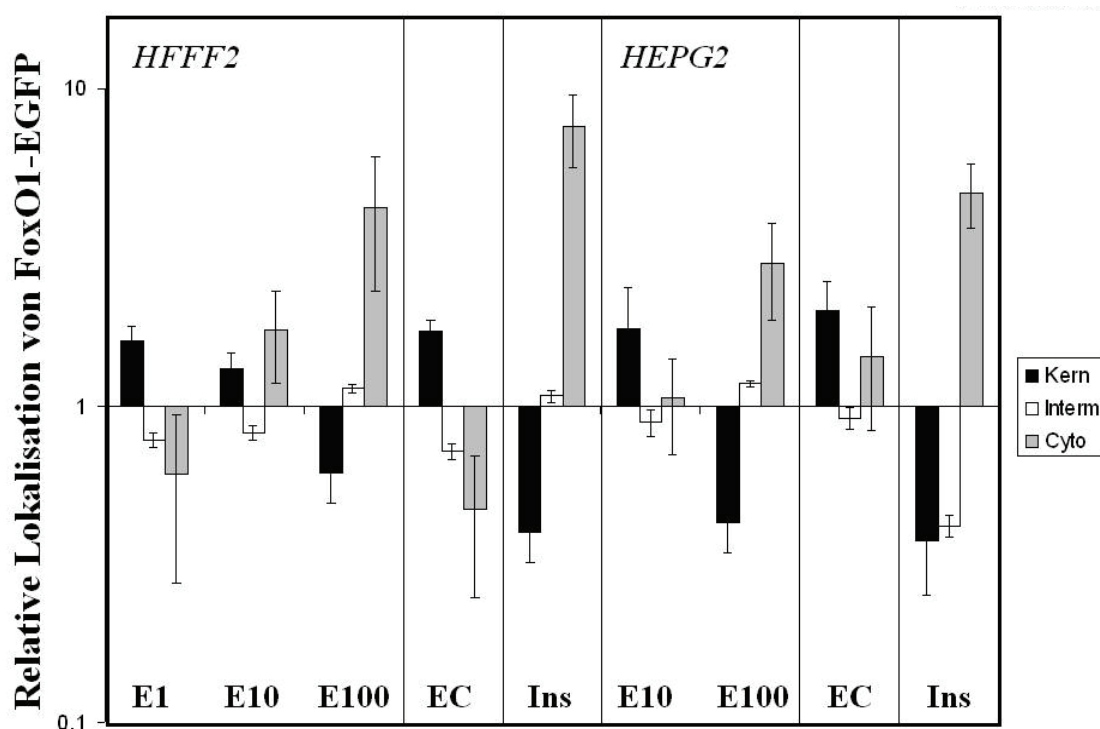


Abb. 3.15: Subzelluläre Lokalisation von FoxO1 in HFFF2- und HepG2-Zellen

HFFF2- oder HepG2-Zellen wurden mit einem Plasmid, welches für FoxO1a-EGFP kodiert, transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen für 4 Stunden wie angegeben mit EGCG (Lot 3) verschiedener Konzentrationen, 0,1% Methanol (Lösemittelkontrolle), EC (100 μ M) oder Insulin (0,1 μ M) behandelt. Unverzüglich erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von FoxO1a-EGFP. Die EGFP-positiven Zellen aus mindestens 10 Mikroskopfeldern wurden in nukleär, cytoplasmatisch oder nukleär/cytoplasmatisch klassifiziert und gezählt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Einhergehend mit der Insulin-mimetischen Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade führte die Behandlung mit 100 μ M EGCG aus Lot 3 in Fibroblasten, aber auch in humanen Hepatomzellen, zu einer Translokation von FoxO1 aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Mit sinkender EGCG-Konzentration konnte eine Zunahme der Akkumulation von FoxO1 im Zellkern beobachtet werden. In Fibroblasten war nach der Behandlung mit 1 μ M EGCG eine deutliche Stimulation der Kernlokation von FoxO1 gegenüber der Kontrollsituation zu verzeichnen, in den HepG2-Zellen bereits bei den Behandlungen mit 10 μ M EGCG. Das Catechin EC, welches wie in Tabelle 3.1 gezeigt in einer Konzentration von 100 μ M nicht in der Lage war, die Bildung von

nennenswerten Mengen H_2O_2 zu induzieren, modellierte hier in der gleichen Konzentration (100 μM), ähnlich wie geringere Konzentrationen von EGCG, FoxO1 in Insulin-antagonistischer Weise.

Als Nachweis für die Insulin-mimetische Wirkung von hohen Konzentrationen EGCG über die Bildung von H_2O_2 auf die Lokalisation von FoxO wurde die Katalase-mimetische Komponente MnTBAP eingesetzt. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, wurde in beiden Zelllinien durch MnTBAP der Insulin-mimetische Effekt von EGCG (100 μM) aufgehoben. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass MnTBAP per se in der Lage war die Lokalisation von FoxO gegenüber der Kontrolle zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurden die Werte zu den Behandlungen mit 100 μM EGCG in Anwesenheit von MnTBAP auf die Werte zu MnTBAP-Kontrollbehandlungen normiert.

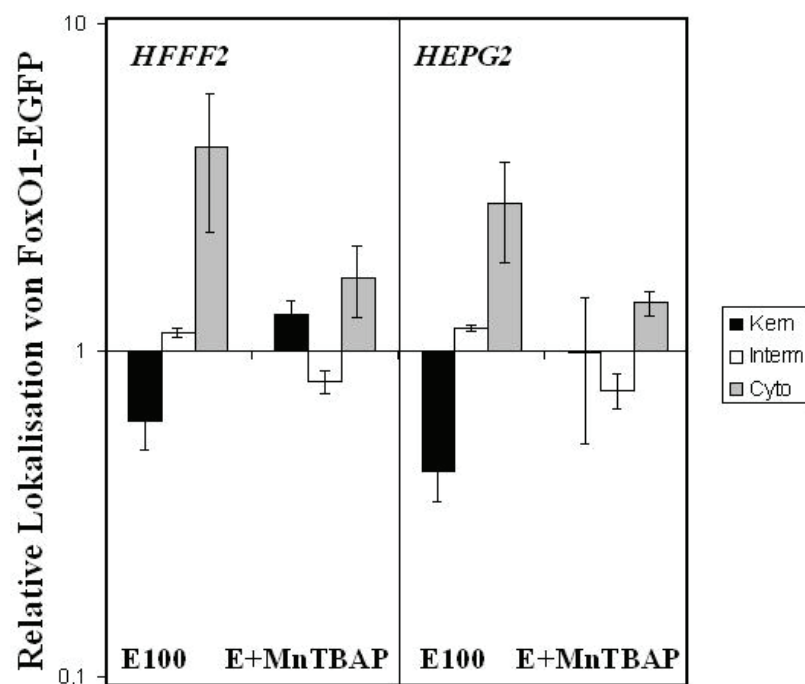


Abb. 3.16: Subzelluläre Lokalisation von FoxO1 in HFFF2- und HepG2-Zellen

HFFF2- oder HepG2-Zellen wurden mit einem Plasmid, welches für FoxO1a-EGFP kodiert, transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen für 4 Stunden mit 100 μM EGCG (Lot 3) in An- oder Abwesenheit von 300 μM MnTBAP behandelt. 0,1% Methanol bzw. 300 μM MnTBAP dienten als Kontrolle. Unverzüglich erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von FoxO1a-EGFP. Die EGFP positiven Zellen aus mindestens 10 Mikroskopfeldern wurden in nukleär, cytoplasmatisch oder nukleär/cytoplasmatisch klassifiziert und gezählt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ Range.

Als nächstes sollte überprüft werden, inwieweit die zuvor beschriebenen Ergebnisse aus der Versuchsreihe zu der FoxO1-Lokalisation mit der aktiveren Charge EGCG mit der Modulation der FoxO1-Aktivität korrespondieren. Hierzu wurden, wie zu Abbildung 3.13 beschrieben, erneut Untersuchungen zu der FoxO1-DNA Bindeaktivität durchgeführt.

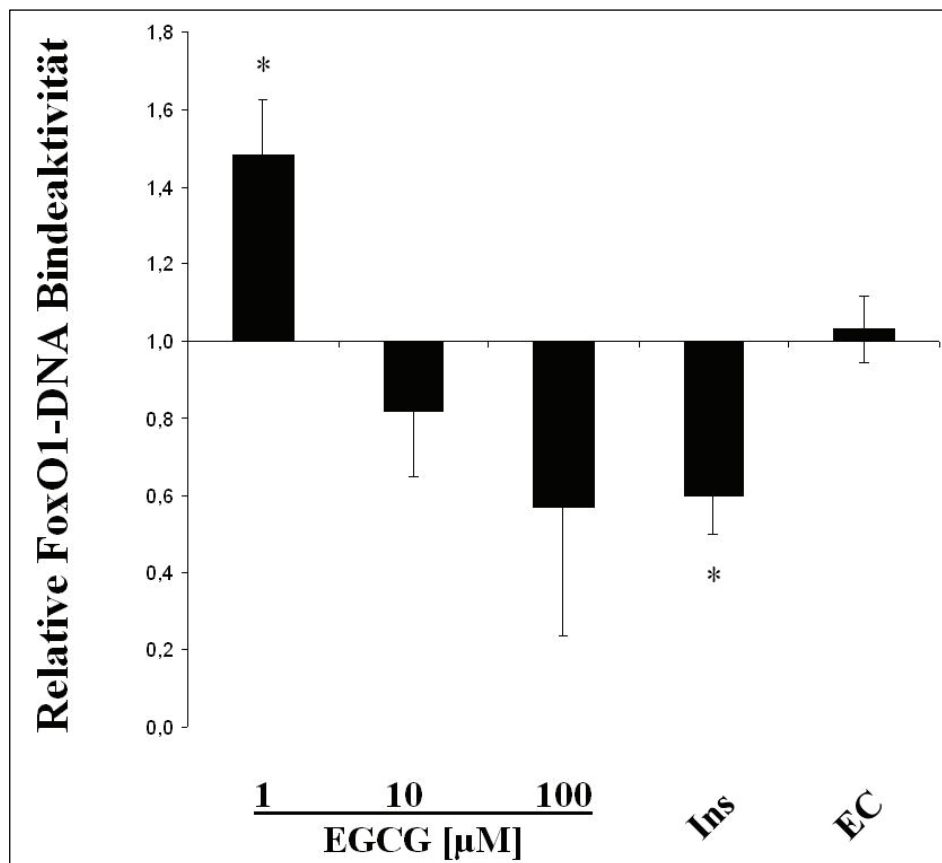


Abb. 3.17: FoxO1 DNA-Bindeaktivität in HFFF2 Zellen nach der Behandlung mit EGCG aus Lot3

HFFF2-Zellen wurden für 4 Stunden mit EGCG aus Lot 3 (1 µM, 10 µM oder 100 µM), EC (100 µM) oder Insulin (0,1 µM) behandelt. Anschließend erfolgte eine Isolation von Kernproteinen gefolgt von einer Bestimmung der relativen FoxO1 DNA-Bindeaktivität mittels einer ELISA-basierenden FoxO1 DNA-Bindestudie. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Wie Abbildung 3.17 zu entnehmen, ging die Behandlung von Fibroblasten mit 0,1 µM Insulin und die induzierte Kernexklusion von FoxO1, wie erwartet einher mit einer Reduktion der FoxO1-DNA-Bindeaktivität. Die Stimulation der Zellen mit Insulin

fürte hier zu einer signifikanten Reduktion der FoxO1-Aktivität um durchschnittlich etwa 40%. Die FoxO1-Aktivität wurde entsprechend den Ergebnissen zu der Modulation der subzellulären Lokalisation von FoxO1 nach EGCG-Behandlung beeinflusst. Die Stimulation der Fibroblasten mit der hohen Konzentration EGCG (100 μ M) führte in Insulin-mimetischer Weise zu einer Verringerung der FoxO1 DNA-Bindeaktivität. Mit sinkender EGCG Konzentration nahm dieser Insulin-imitierende Effekt ab. Die Behandlung mit 1 μ M EGCG führte in den Fibroblasten zu einer signifikanten Stimulation der FoxO1-Aktivität. Die gefundenen Effekte von EGCG stimmten also auch hier zwischen der Modulation der Lokalisation und der Aktivität von FoxO1 überein. Dies war nicht der Fall für die Ergebnisse zu den Behandlungen mit 100 μ M EC. Obwohl 100 μ M EC die Akkumulation von FoxO1 im Zellkern in ähnlicher Weise wie 1 μ M EGCG stimulierte, war das Catechin, wie Abbildung 3.17 zeigt, nur in sehr geringem Maß in der Lage, die Aktivität von FoxO1 zu stimulieren. In mit EC behandelten Zellen zeigten die Transkriptionsfaktoren eine Aktivität die sich kaum von der in Zellen unter Kontrollbedingungen unterschied.

Wie am Anfang dieses Kapitels erwähnt, diente der Nematode *C.elegans* als *in vivo*-Modell, um die physiologische Relevanz der *in vitro* Untersuchungsergebnisse zu überprüfen. In der Zellkultur hatte sich gezeigt, dass die beobachteten Effekte teilweise von der Versuchsanordnung abhängig waren. So variierte die Aktivierung der Insulin-responsiven PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade und die funktionelle Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren durch EGCG chargenabhängig in Korrelation mit der gebildeten Menge Wasserstoffperoxid. Daher sollte auch für die Verwendung von EGCG in dem Nematoden-Medium NGM ermittelt werden, ob es auch hier zu einer Bildung von H₂O₂ kommt. Hierfür wurde die Versuchsanordnung erneut so gewählt, dass sie mit der der Versuche mit *C.elegans* übereinstimmte. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 100 μ M EGCG mit oder ohne 1% BSA und in Abwesenheit von Nematoden wurden 5 μ l-Aliquots entnommen und die H₂O₂-Konzentrationen bestimmt.

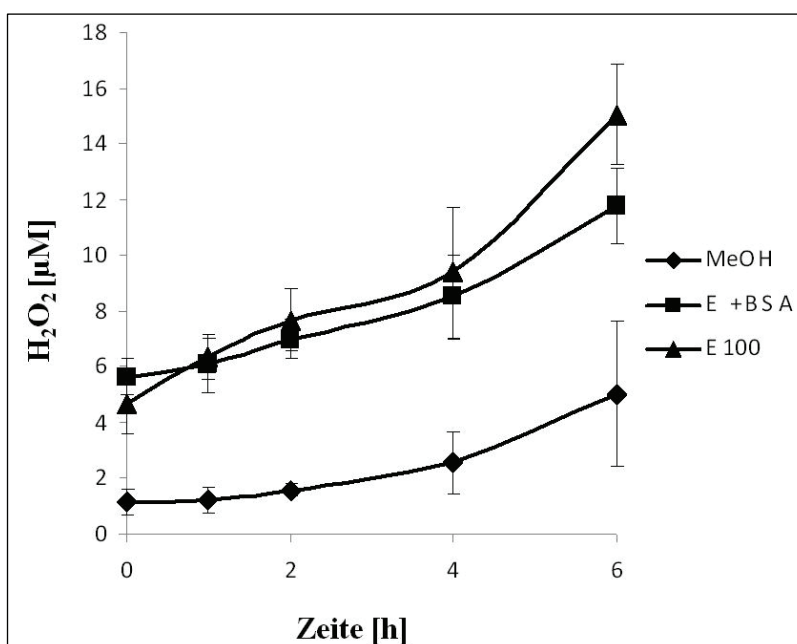


Abb. 3.18: Bildung von Wasserstoffperoxid in NGM durch EGCG

100 μM EGCG aus Lot 3 in Anwesenheit von 1% BSA (E +BSA) und ohne BSA (E 100) wurden in 2 ml NGM (**n**ematode **g**rowth-**m**edium) verdünnt und bei etwa 21°C inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden 5 μl -Aliquots von jeder Probe entnommen und die H_2O_2 Konzentrationen mittels Amplex Red/HPR bestimmt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Messungen der H_2O_2 -Konzentration nach Inkubationszeiten von 1 und 2 Tagen zeigten keine nennenswerten Steigerungen gegenüber den Werten nach 6 Stunden. Wie Abbildung 3.18 zeigt, war die durch EGCG induzierte Bildung von H_2O_2 gegenüber Kontrollbedingungen nur leicht gesteigert. Auch der Einsatz von 1% BSA, wie unter Versuchsbedingungen mit Nematoden, nahezu keinen Unterschied. Auf der Basis dieser Ergebnisse hat die Bildung von Wasserstoffperoxid in den folgenden Untersuchungen von EGCG-Effekten auf *C.elegans* vermutlich keinen Einfluss.

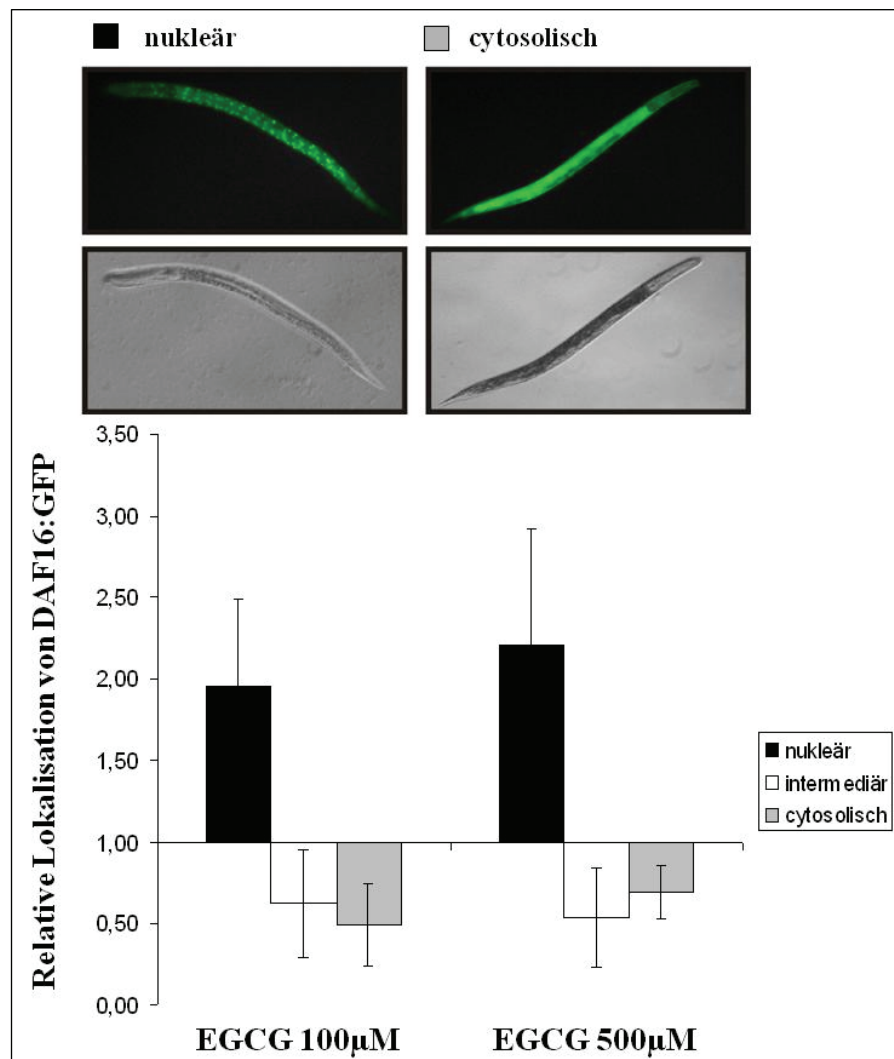


Abb. 3.19: Subzelluläre Lokalisation von DAF-16 in *C.elegans* nach Behandlung mit EGCG

Semisynchronisierte L1 Larven des *C.elegans*-Stamms TJ356, welcher DAF-16::GFP exprimiert, wurden mit EGCG (100 μ M oder 500 μ M) oder entsprechend der Konzentrationen mit DMSO (Lösemittelkontrolle) für 2 Tage behandelt. Es folgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse und Kategorisierung der Nematoden hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von DAF-16-GFP in nukleär, cytoplasmatisch oder nukleär/cytoplasmatisch (intermediär). Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM. Die Abbildung zeigt außerdem jeweils ein Beispiel eines Nematoden mit hauptsächlich nukleär lokalisiertem DAF-16-GFP und eines Nematoden mit hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiertem DAF-16-GFP.

Für die Untersuchungen zum Einfluss von EGCG auf die Lokalisation des FoxO-Orthologs in *C.elegans* (DAF-16) wurde ein Stamm verwendet, welcher stabil ein DAF-16::GFP-Konstrukt exprimiert. Gravide Nematoden wurden einer Behandlung mit Hypochloridlösung unterzogen, so dass nur die Eier intakt blieben. Diese wurden

auf festes NGM ausgebracht und über Nacht bei 20°C inkubiert. Am nächsten Tag hatten alle geschlüpften Larven das L1-Stadium erreicht und wurden in flüssigem NGM mit 100 µM oder 500 µM EGCG bzw. der entsprechenden Konzentration des Lösemittels (DMSO) als Kontrolle inkubiert. Wie aus anderen Arbeiten mit Polyphenolen bekannt, zeigten die Nematoden auch bei diesen Untersuchungen die beste Reaktion auf EGCG nach 2 Tagen. Weiter zeigten sich in den Versuchsreihen unter Nicht-Hungerbedingungen, also mit OP50-Bakterien als Nahrungsquelle, die deutlichsten Effekte (siehe Abbildung 3.19).

Zum Zwecke der Auswertung hinsichtlich der Modulation der subzellulären DAF-16-Lokalisation durch EGCG wurden die behandelten Nematoden des Stamms TJ356 in drei verschiedene Gruppen kategorisiert. Individuen, welche DAF-16 vornehmlich in den Zellkernen trugen, wurden der Kategorie “nukleär” (Beispiel siehe Abbildung 3.19), Nematoden ohne erkennbare Akkumulation von DAF-16 in den Zellkernen der Kategorie “cytosolisch” zugeordnet. Wenn ein Individuum nicht eindeutig einer dieser beiden Kategorien zugeordnet werden konnte, wurde es zu der Kategorie “intermediär” gezählt. Für jede Behandlung wurden die Individuen der einzelnen Kategorien ausgezählt und die Werte auf die entsprechenden Werte unter der Kontrollsituation normiert. Bei Kontrollbehandlung mit 0,1% DMSO (zu 100 µM EGCG) war DAF-16:GFP durchschnittlich in 37% der analysierten Individuen maßgeblich im Kern lokalisiert. Demgegenüber trugen 46% der Nematoden das Protein cytosolisch und 17% waren keiner der beiden Kategorien zuzuordnen. Die Kontrollbehandlung mit 0,5% DMSO (zu 500 µM EGCG) stellte sich sehr ähnlich dar: Ebenfalls 46% cytosolisch, 46% nukleär und 8% intermediär.

Wie Abbildung 3.19 zu entnehmen, war nach einer zweitägigen Behandlung und OP50-Bakterien als Nahrungsquelle sowohl mit 100 µM als auch mit 500 µM EGCG eine deutliche Translokation von DAF-16 in die Zellkerne des Nematoden gegenüber der jeweiligen Kontrollsituationen zu beobachten. Zu erwähnen ist, dass auch zu anderen Zeitpunkten der Behandlung (nach 1 und 3 Tagen) und auch unter Hungerbedingungen zu diesen Zeitpunkten die gleiche Tendenz zu beobachten war (Daten nicht gezeigt) wie zu Abbildung 3.19. Hier spielte, wie zuvor gezeigt auch bei der Verwendung von hohen Konzentration EGCG die Bildung von H₂O₂ keine Rolle.

Die Stimulierung der Transkriptionsfaktoren durch EGCG, welche zuvor in der Zellkultur unter Bedingungen, bei denen die Bildung von Wasserstoffperoxid keine Rolle spielte, beobachtet wurde, konnte somit in diesem *in vivo*-Modellorganismus bestätigt werden.

3.5 Untersuchung der Insulin-antagonistischen Wirkung von EGCG

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde besitzt EGCG die Fähigkeit FoxO-Transkriptionsfaktoren zu stimulieren. Akt phosphoryliert und inaktiviert FoxOs und wurde selbst, wie hier nachgewiesen, nur durch hohe Konzentrationen EGCG und durch die damit verbundene Bildung signifikanter Konzentrationen H_2O_2 aktiviert. Um die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren zu bewirken musste also ein anderer Weg existieren. Mittels der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob EGCG auf Regulatoren der FoxO-Transkriptionsfaktoren, aktivierend oder inhibierend wirkt.

3.5.1 Einfluss von Grüntee-Catechinen auf die c-Jun N-terminale Kinase (JNK)

Bei der JNK handelt es sich um eine Kinase, welche aktiv ist, wenn sie an den hier untersuchten Stellen phosphoryliert ist. Sie kann ihrerseits FoxOs an unter den FoxO-Isoformen nicht konservierten Stellen phosphorylieren, welche nicht von Akt erkannt werden. Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer Translokation in den Zellkern und zu einer Aktivierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren. Voraussetzung für eine Aktivierung von FoxO auf diesem Weg ist also die Phosphorylierung und Aktivierung von JNK.

Um zu überprüfen, ob und in welchem Maß die Behandlung von Fibroblasten mit 100 μ M Grüntee-Catechinen zu einer Aktivierung der JNK (P-JNK1 und P-JNK2/3) führt,

wurden die Zellen wie zu den vorangegangenen Untersuchungen für 4 Stunden behandelt. Auch die Behandlungen zu den nun folgenden Western-Analysen erfolgten nach einer Serumdepletion über Nacht.

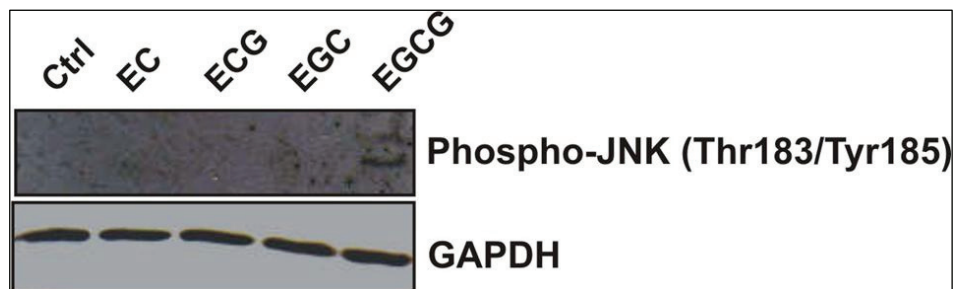


Abb. 3.20: Phosphorylierung von JNK in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit Catechinen

Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine vierstündige Behandlung mit Epicatechin (EC), Epicatechin Gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC), oder Epigallocatechin Gallat (EGCG, Lot 1) mit einer Konzentration von 100 μM . 1% MeOH diente als Lösemittelkontrolle. Nach einer Lyse der behandelten Zellen folgte eine Westernblot-Analyse und Immunodetektion von phosphoryliertem JNK und Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Das gezeigte Beispiel ist repräsentativ für mindestens 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Unter den vier Catechinen war lediglich EGCG in sehr schwacher Weise in der Lage, die Phosphorylierung und somit Aktivierung der JNK zu induzieren, wie Abbildung 3.20 zu entnehmen ist. Neben anderen Stress-Stimuli ist Wasserstoffperoxid, welches wie in dieser Arbeit gezeigt bei dem Einsatz von hohen Konzentrationen EGCG in signifikanten Mengen gebildet wird, ein starker Aktivator der JNK (beschrieben in Kapitel 1.3.2).

3.5.2 Einfluss von EGCG auf die Aktivierung von Akt über den EGF-Rezeptor

Auf Basis der hier durchgeführten Untersuchungen erschien die Beteiligung von JNK bei der positiven Beeinflussung der FoxOs durch EGCG als unwahrscheinlich, da lediglich eine schwache Aktivierung der JNK zu erkennen war. Weiter kann JNK durch Wasserstoffperoxid aktiviert werden. Auch EC stimulierte die FoxO-Kernakkumulation, war jedoch auch in hohen Konzentrationen nicht in der Lage, nennenswerte Konzentrationen H_2O_2 zu bilden. Daher sollte als nächstes die Beteiligung des EGF-Rezeptors an der Insulin-antagonistischen Stimulierung der FoxOs durch EGCG überprüft werden. Die Stimulation des EGF-Rezeptors führt unter anderem zu einer Phosphorylierung von Akt an den bereits untersuchten Aminosäureresten. Da EGCG als möglicher Inhibitor von Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor gilt (beschrieben in Kapitel 1.1.4), bestand die Möglichkeit, dass EGCG die Aktivierung von Akt über den EGF-Rezeptor inhibiert und somit der Inaktivierung von FoxO entgegenwirkt und dessen Aktivität stimuliert. Unter Verwendung eines für den EGF-Rezeptor spezifischen Inhibitors (AG1478) sollte die mögliche Inhibierung der EGF-induzierten Aktivierung der Akt durch EGCG untersucht werden. Nach einer einstündigen Präinkubation von Fibroblasten mit dem Inhibitor (Spuren 2 und 3), verschiedenen Konzentrationen EGCG (Spuren 7-12) oder der entsprechenden Lösemittelkonzentrationen als Kontrollen (Spuren 1, 2, 5 und 6) erfolgte eine Stimulation der Zellen mit EGF (Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12) in Anwesenheit der in der Präinkubation verwendeten Komponenten für weitere 3 Stunden (siehe Abbildung 3.21). So betrug die Inkubationszeit der Zellen in Gegenwart von EGCG wie in allen Zellkulturuntersuchungen zuvor 4 Stunden. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen, wurde die Aktivierung von Akt durch EGF mit dem spezifischen Inhibitor des EGF-Rezeptors komplett blockiert. 100 μ M EGCG induzierten wie erwartet per se eine deutliche Phosphorylierung von Akt. Geringere Konzentrationen, welche in vorangegangenen Untersuchungen keine Aktivierung von Akt bewirkten, zeigten auch hier keine stimulierende Wirkung auf die Phosphorylierung von Akt. EGCG in diesen Konzentrationen war jedoch auch nicht

oder nur in sehr geringem Maß in der Lage, die EGF-induzierte Aktivierung von Akt zu inhibieren.

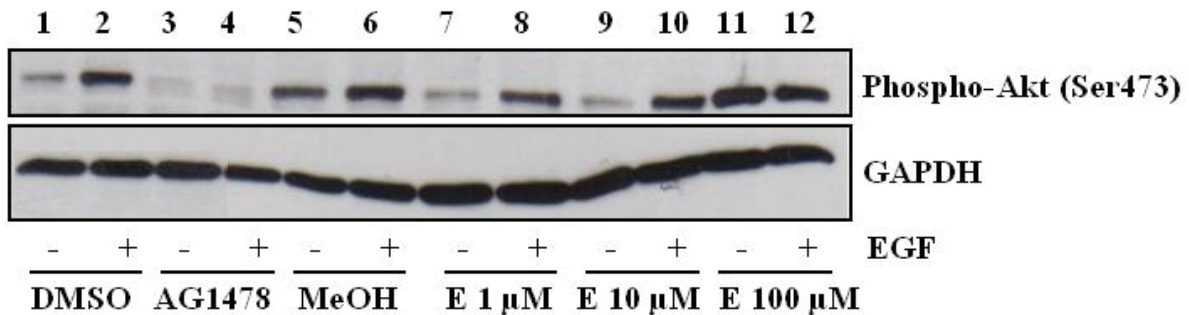


Abb. 3.21: Phosphorylierung von Akt in HFFF2-Zellen nach Behandlung mit EGF in Gegenwart von EGCG

Vor der Behandlung wurden HFFF2-Zellen über Nacht serumdepletiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Präinkubation mit 10 µM AG1478, EGCG aus Lot 3 in verschiedenen Konzentration (1 µM, 10 µM oder 100 µM), DMSO oder Methanol (Lösungsmittelkontrolle). Nach der Präinkubation wurde EGF wie angezeigt zu den konditionierten Ansätzen gegeben und diese für weitere 3 Stunden inkubiert. Nach einer Lyse der behandelten Zellen folgt eine Western-Analyse und Immunodetektion von phosphoryliertem Akt und Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrolle. Das gezeigte Beispiel ist repräsentativ für 2 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.5.3 Stimulierung der Aktivität von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Harmin

FoxO-Transkriptionsfaktoren werden in humanen Zellen basal von der DYRK1A (**d**ual **s**pecificity **tyrosine**-phosphorylation-**r**egulated **k**inase **1A**) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung findet an einem anderen Aminosäurerest statt als jene durch Akt. Die Phosphorylierung durch DYRK1A führt jedoch auch zu einem Export der Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern und somit zu deren Inaktivierung. Eine Inhibierung der DYRK1A würde somit einer Zellkernexklusion entgegenwirken und eine Akkumulation von FoxOs im Zellkern stimulieren. EGCG wurde in Untersuchungen mit isoliertem DYRK1A als ein starker Inhibitor dieser Kinase identifiziert (Bain et al., 2003b). Ob dieser Mechanismus für EGCG eine plausible

Möglichkeit darstellt, die Aktivität von FoxOs positiv zu modulieren, sollte über die Verwendung von Harmin, eines etablierten DYRK1A-Inhibitors, untersucht werden. Hierzu wurde Harmin für die Behandlung von Zellen eingesetzt, nach der dann in bereits beschriebener Weise Analysen der subzellulären Lokalisation und der DNA-Bindeaktivität von FoxO1 durchgeführt wurden.

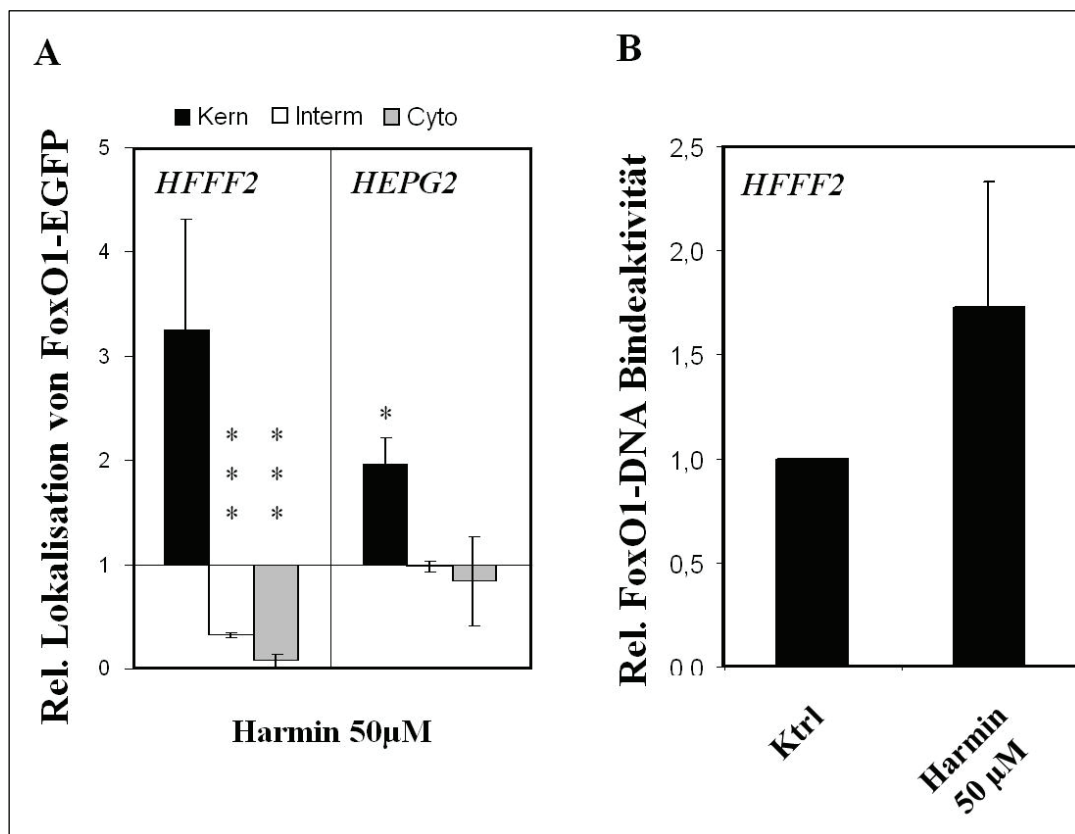


Abb. 3.22: Steigerung der Akkumulation im Zellkern und der DNA-Bindeaktivität von FoxO1 nach Harmin-Behandlung

(A) HFFF2- oder HepG2-Zellen wurden mit einem Plasmid, welches für FoxO1a-EGFP kodiert transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen für 4 Stunden mit Harmin (50 μ M) behandelt. Methanol diente entsprechend als Lösemittelkontrolle. Unverzüglich erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation von FoxO1a-EGFP. Die EGFP positiven Zellen aus mindestens 10 Mikroskopfeldern wurden in nukleär, cytoplasmatisch oder nukleär/cytoplasmatisch klassifiziert und gezählt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM. (B) HFFF2-Zellen wurden für 4 Stunden mit Harmin (50 μ M) behandelt. Methanol diente entsprechend als Lösemittelkontrolle. Anschließend erfolgte eine Isolation von Kernproteinen gefolgt von einer Bestimmung der relativen FoxO1 DNA-Bindeaktivität mittels einer ELISA-basierenden FoxO1 DNA-Bindestudie. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM.

Wie in Abbildung 3.22 gezeigt, war Harmin in der Lage, FoxO in einer Insulin-antagonistischer Weise zu beeinflussen. Sowohl in Fibroblasten als auch in Hepatomzellen induzierte die Behandlung mit Harmin eine Translokation von FoxO1 aus dem Cytoplasma in den Zellkern. Die Untersuchungen zu der Aktivität von FoxO1 in Fibroblasten nach der Behandlung mit Harmin zeigten eine deutliche Steigerung der DNA-Bindeaktivität.

Auf der Basis dieser Untersuchungsergebnisse stellt die Modulation der DYRK1A durch EGCG eine Möglichkeit für den Mechanismus hinter der positiven Stimulierung der FoxOs in humanen Zellen durch EGCG, wie sie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dar.

4. Diskussion

In der Literatur werden die Flavonoide allgemein als antioxidativ aktive Polyphenole beschrieben. Viele der für sie gefundenen positiven physiologischen Effekte werden auf diese Aktivität zurückgeführt. In dieser Arbeit konnten den Catechinen aus grünem Tee, vor allem dem Flavonoid EGCG, prooxidative Eigenschaften und die direkte Beeinflussung von Signalkaskaden nachgewiesen werden. Die Mechanismen hinter den positiven Effekten sind größtenteils noch unbekannt. Die Effekte werden sicherlich nicht ausschließlich über den in dieser Arbeit untersuchten Insulin-responsiven PI3K/Akt-Signalweg vermittelt, jedoch stellt dieser Signalweg gerade im Hinblick auf die beschriebenen Insulin-ähnlichen Wirkungen von EGCG ein interessantes und wahrscheinliches Ziel für die Untersuchungen von EGCG-Effekten dar. Ein Grund hierfür ist, dass dieser Signalweg an der Regulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren beteiligt ist. Diese beeinflussen direkt eine Vielzahl von Genen, die ihrerseits Effekte wie Stressresistenz oder Langlebigkeit vermitteln. FoxO-Transkriptionsfaktoren regulieren jedoch auch die Expression wichtiger Schlüsselenzyme der Glukoneogenese.

Diese Eigenschaften machen den PI3K/Akt-Signalweg und die FoxO-Transkriptionsfaktoren zu einem vielversprechenden Ziel für Studien zur Beteiligung an der Vermittlung der Insulin-ähnlichen Eigenschaften und auch der gesundheitsförderlichen Wirkung auf altersbegleitende Krankheitsbilder wie beispielsweise Diabetes Mellitus Typ2 von EGCG.

4.1 Einfluss von Grüntee-Catechinen auf den Insulin-responsiven PI3K/Akt/FoxO-Signalweg

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass EGCG in Säugern die Insulin-ähnliche Fähigkeiten aufweist, den Blutglukose-Spiegel zu senken (Kao et al., 2000). Zum Teil wird dieser Effekt auf die Fähigkeit, Gene der Glukoneogenese wie die PEPCK zu reprimieren, zurückgeführt (Waltner-Law et al., 2002). Die Transkriptionsfaktoren, die diesen Effekt von EGCG vermitteln, sind noch unbekannt. Gene wie die von PEPCK

und G6Pase sind jedoch bekannt als direkte Ziele von FoxO-Transkriptionsfaktoren (Hall et al., 2000; Matsumoto et al., 2007; Schmoll et al., 2000). In Arbeiten mit HEK 293-Zellen wurde gezeigt, dass EGCG in der Lage ist, die Phosphorylierung des FoxO1 an Insulin-sensitiven Aminosäureresten zu bewirken (Anton et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte an FoxO1 und FoxO3a in humanen Fibroblasten (HFFF-2) die Insulin-ähnliche Modulation durch hohe Konzentrationen EGCG, jedoch durch keines der anderen Grüntee-Catechine in vergleichbarer Weise nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.5). Die FoxO-Transkriptionsfaktoren wurden an Aminosäureresten phosphoryliert, von welchen bekannt ist, dass sie direkte Ziele von Akt (Proteinkinase B) sind. Darüber hinaus konnte hier gezeigt werden, dass die Behandlung von Fibroblasten mit EGCG in hohen Konzentrationen (100 μ M), jedoch wiederum durch keines der anderen Grüntee-Catechine, zu einer Aktivierung durch Phosphorylierung von Akt führt (siehe Abbildung 3.2). *In vivo* werden durch den Konsum von grünem Tee in Geweben und im Blut solch hohe Konzentrationen EGCG in der Regel nicht erreicht. Hier wurden effektive Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 1 μ M gefunden (Yang 1997). Dennoch ist es vorstellbar, dass lokal durch Akkumulation höhere Konzentrationen EGCG erreicht werden. Auch durch die Applikation konzentrierten EGCGs über Kapseln oder in Salben auf die Haut könnten höhere Konzentrationen erreicht werden.

Die Aktivierung der Akt verlief nicht nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“, sondern in Abhängigkeit von der Konzentration des EGCG, wie densitometrische Auswertungen aller Ergebnisse zu der Phosphorylierung von Akt durch EGCG zeigten (siehe Abbildung 3.4). Hierbei wurde deutlich, dass 10 μ M EGCG in keinem Fall in der Lage waren, eine Phosphorylierung von Akt zu bewirken, welche sich von der unter der Kontrollsituation unterschied. Bei diesen Konzentrationen war also auch keine Phosphorylierung der FoxOs an den Zielaminosäureresten der Akt möglich. Durch den Einsatz zweier strukturell voneinander unterschiedlichen, für die PI3K spezifischen Inhibitoren (LY294002 und Wortmannin) konnte hier ebenfalls gezeigt werden, dass die Aktivierung von Akt durch hohe Konzentrationen EGCG, wie die Aktivierung durch Insulin inhibiert werden kann (siehe Abbildung 3.6).

Es konnte also eindeutig gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen EGCG in Insulin-ähnlicher Weise die PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade aktivieren. Die Aktivierung

dieser Kaskade durch EGCG und Insulin unterschied sich dadurch, dass Insulin im Gegensatz zu EGCG die Aktivierung auf der Ebene der Akt bereits nach einer halben Stunde bewirken konnte. EGCG hingegen war in jedem Fall erst nach 4 Stunden, in manchen Untersuchungen auch zu früheren Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt) zu einer Aktivierung der Signalkaskade auf der Ebene der Akt in der Lage. Dieser Umstand soll hier an einem späteren Punkt diskutiert werden.

4.2 Die Bildung von H₂O₂ durch EGCG und die Aktivierung der PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade

Long *et al.* zeigten, dass EGCG in manchen Zellkulturmedien die Bildung signifikanter Mengen H₂O₂ bewirken kann (Long et al., 2000). Besonders in dem auch in dieser Arbeit verwendeten DMEM war dies zu beobachten. In anderen Arbeiten wurde H₂O₂ als starker Aktivator der PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade identifiziert (Barthel & Klotz 2005).

Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, konnte hier eine deutliche Aktivierung von Akt durch die Behandlung von Fibroblasten mit H₂O₂ festgestellt werden. Ebenfalls wurde auf der Ebene von Akt gezeigt, dass MnTBAP die durch die Behandlung mit hohen Konzentrationen EGCG verursachte Aktivierung der untersuchten Signalkaskade unterbindet. Bei dieser Untersuchung wurde Katalase-mimetisches MnTBAP anstatt Katalase selbst verwendet, um Interaktionen zwischen dem Enzym selbst und EGCG auszuschließen.

Weiter konnte gezeigt werden, dass es in der verwendeten Zellkulturanordnung, welche genau dem Versuchsaufbau aller anderen Zellkulturversuche dieser Arbeit entsprach, durch EGCG zu der Bildung signifikanter Konzentrationen H₂O₂ kam. Bereits 6 Stunden nach der Zugabe von verschiedenen Konzentrationen EGCG in zellfreies Medium wurden die Maximalkonzentrationen an Wasserstoffperoxid in den jeweiligen Ansätzen erreicht (siehe Abbildung 3.7). In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die maximale Konzentration von generiertem H₂O₂ abhängig ist von der eingesetzten Konzentration EGCG (siehe Tabelle 3.1). Durch

geringe Mengen EGCG wurden keine signifikant erhöhte Konzentrationen H_2O_2 gebildet. Der Einsatz der anderen Catechine EC, ECG und EGC führte zu geringeren Konzentrationen H_2O_2 , im Fall von EC bis hin zu Konzentrationen, die kaum von der unter der Kontrollsituation zu unterscheiden waren. Diese Untersuchungen zeigten also, dass die Aktivierung der hier untersuchten Signalkaskade durch die Flavonoide mit der Konzentration gebildeten Wasserstoffperoxids korreliert. Es ist wahrscheinlich, dass EGCG aus diesem Grund unter den Flavonoiden die stärkste Aktivierung von Akt zeigte. Doch wie in Abbildung 3.2, mit Blick auf Akt und auch in Abbildung 3.5, mit Blick auf die FoxO-Transkriptionsfaktoren zu sehen, war auch EGC in der Lage, die Bildung von signifikanten Konzentrationen H_2O_2 und gleichzeitig die Phosphorylierung von Akt und der FoxOs in einem geringeren Maß als EGCG zu bewirken. Unter den gegebenen Zellkulturbedingungen scheint es einen Konzentrationsbereich der stetigen Bildung von H_2O_2 zu geben, in dem es zu einer detektierbaren Aktivierung der untersuchten Signalkaskade kommt, wie es im Vergleich von 100 μM EGC und 100 μM EGCG in Abbildung 3.2 mit Blick auf die Konzentrationen an H_2O_2 (siehe Tabelle 3.1) den Anschein hat. Wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben variierte die Bildung von Wasserstoffperoxid zwischen den einzelnen Chargen EGCG. Auch die Konzentrationen, in denen EGCG die Phosphorylierung von Akt bewirkte, variierte zwischen den verwendeten Chargen (vergleiche Abbildung 3.2 mit Abbildung 3.3). Dieser Umstand ist wahrscheinlich auf die Unterschiede zwischen den verwendeten EGCG-Chargen in der Fähigkeit die Bildung von H_2O_2 zu bewirken zurückzuführen und ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung der PI3K/Akt/FoxO-Kaskade in Abhängigkeit von der Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium.

Bei allen Untersuchungen und beobachteten Effekten von hohen Konzentrationen an Flavonoiden sind also die Umstände wie die verwendeten Chargen und die resultierenden H_2O_2 -Konzentrationen zu berücksichtigen.

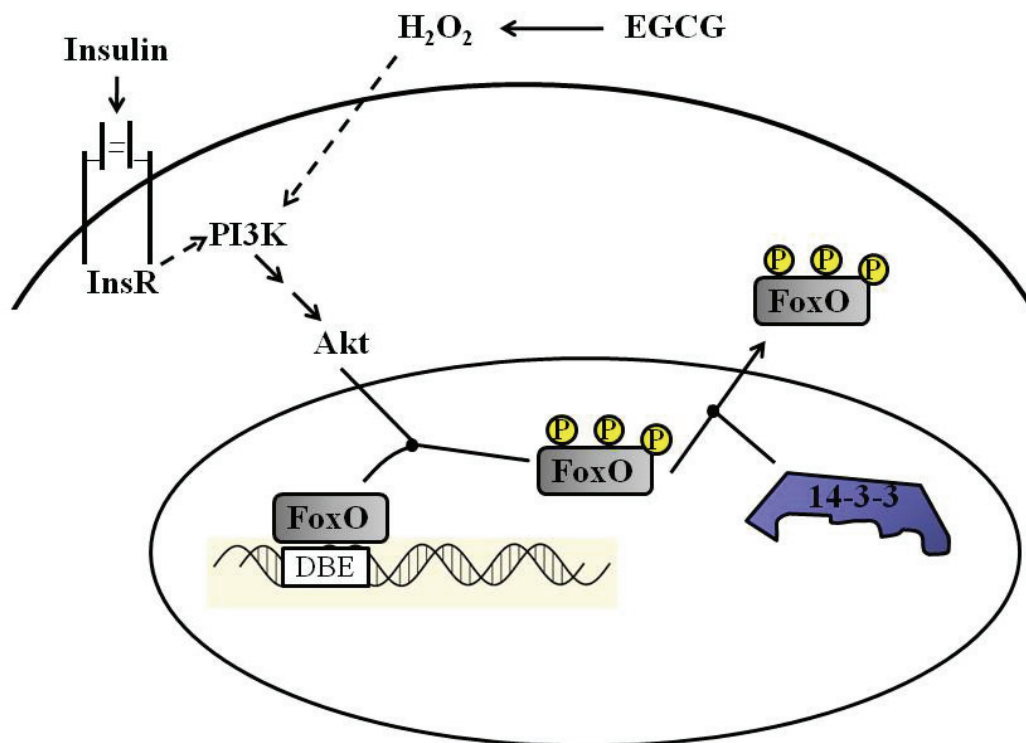


Abbildung 4.1: Insulin-mimetische Aktivierung der PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade in Abhängigkeit von der Bildung ausreichender Mengen H₂O₂ durch EGCG

Die stetige Bildung signifikanter Mengen Wasserstoffperoxid durch EGCG führt zu einer Aktivierung von Akt. Diese Aktivierung geschieht in Abhängigkeit von der PI3K und resultiert in einer Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren. Unter diesen Umständen wird FoxO aus dem Zellkern transloziert und inaktiviert.

4.3 Die physiologische Relevanz der Bildung von H₂O₂ durch EGCG

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid können verschiedene Signalwege beeinflussen (Barthel & Klotz 2005). In diesem Zusammenhang werden zwei Wege diskutiert, über die die in dieser Arbeit untersuchte PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade aktiviert werden kann. Allgemein könnten verschiedene oxidierte biologische Zielmoleküle der ROS die Signalkaskade aktivierend beeinflussen. Weiter ist die Oxidation von Enzymen, die direkt an der Signalkaskade beteiligt sind,

wie verschiedener Phosphatasen vorstellbar (Barthel & Klotz 2005). Im Falle der Aktivierung der PI3K/Akt/FoxO-Signalkaskade scheint die ausschlaggebende Beeinflussung auf der Ebene der PI3K oder stromaufwärts zu liegen, wie die Inhibierung der PI3K zeigte (siehe Abbildung 3.6). Doch auch eine additive unterstützende Beeinflussung an der Signalkaskade beteiligter Proteine stromabwärts der PI3K ist vorstellbar. Auf dieser Basis wäre die unter Kapitel 4.1 angesprochene zeitliche Differenz in der Aktivierung von Akt durch Insulin und durch EGCG damit zu erklären, dass im Fall von EGCG zunächst eine stetige Akkumulation von oxidierten Biomolekülen notwendig ist um eine Phosphorylierung von Akt zu verursachen.

Wie bereits erwähnt, wären *in vivo* hohe Konzentrationen von EGCG, die zu einer stetigen Bildung von hohen Dosen H_2O_2 führen könnten, lediglich bei lokaler Akkumulation oder bei der gezielten Applikation erhöhter Dosen vorstellbar. Weiter befindet sich EGCG *in vivo* in ständiger Gegenwart von Biomolekülen, welche in der Lage sind, EGCG zu binden oder gebildetes H_2O_2 abzufangen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in dem Medium (NGM) für die Versuche mit *C.elegans* nur äußerst geringe Mengen H_2O_2 durch die Zugabe von EGCG gebildet wurden (siehe Abbildung 3.18). Verantwortlich für die ausbleibende Bildung von H_2O_2 im Nematoden-Medium sind wahrscheinlich Bestandteile des in dem NGM vorhandenen Peptons, welche wie beispielsweise Pyruvat das Wasserstoffperoxid abfangen können (Long & Halliwell 2009). *In vivo*, wie die Untersuchungen mit dem Modellorganismus *C.elegans* zeigten, scheint die durch H_2O_2 vermittelte Insulin-mimetische Wirkung von EGCG auf den PI3K/Akt/FoxO- bzw. den homologen Signalweg eine untergeordnete oder nur lokal eine Rolle zu spielen.

Eine stetige Bildung von geringen Mengen Wasserstoffperoxid und *in vivo* daraus folgend auch anderer ROS, bewirkt durch EGCG-Konzentrationen wie sie *in vivo* wahrscheinlich sind, könnten jedoch durchaus in einem anderen Hinblick von physiologischer Relevanz sein. Im Zusammenhang mit dem positiven Effekt von geringen Mengen ROS, wie sie während des körperlichen Trainings gebildet werden wurde ganz aktuell der negative Einfluss von hohen Dosen von Antioxidantien, wie

Vitamin C und E diskutiert (Ristow et al., 2009). Mittels der euglykämischen Insulin-Clamp-Methode wurde dort nach einem 4-wöchigem Training eine um etwa das zweifache erhöhte Insulin-Sensitivität bei den Probanden einer nicht-supplementierten Kontrollgruppe festgestellt. Für diese erhöhte Insulinsensitivität wurde die durch die geringen Mengen ROS induzierte Expression von PGC-1 α verantwortlich gemacht. Dieses Biomolekül wirkt als Insulinsensitizer und könnte auch eine Rolle bei den in Tiermodellen beobachteten Insulin-ähnlichen Verringerungen des Blutglukosespiegels durch EGCG eine Rolle spielen. Weiter sind auch andere mögliche Effekte wie die Steigerung der Expression von antioxidativen Enzymen durch diese als distinkten, geringen Stress zu wertende Bildung von geringen Mengen ROS durch EGCG *in vivo* vorstellbar.

4.4 Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Flavonoide

Werden FoxO-Transkriptionsfaktoren (Ausnahme FoxO6, siehe Kapitel 1.3) durch aktive Akt phosphoryliert, führt dies normalerweise zu ihrer Inaktivierung, der Bindung von 14-3-3 Proteinen und einem Export aus dem Zellkern. Bekanntermaßen sind ROS wie z. B. H₂O₂ in der Lage, in Insulin-ähnlicher Weise Akt zu aktivieren. Einhergehend mit der Aktivierung von Akt durch die Behandlung mit H₂O₂, wie gezeigt in Fibroblasten (Abbildung 3.8), kam es in Untersuchungen in dieser Arbeit sowohl bei der Behandlung von humanen Fibroblasten als auch von humanen Hepatomzellen mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ zu einer Translokation von FoxO1 aus dem Zellkern in das Cytoplasma (siehe Abbildung 3.9). Die Behandlung mit Menadion (2-methyl-1,4-naphthochinon, auch Vitamin K3 genannt) führte im Gegensatz in beiden Zelllinien zu einer erhöhten Akkumulation von FoxO1 im Zellkern. Menadion ist ein redoxaktives Molekül und in der Lage, die Bildung von H₂O₂ in Zellen und Geweben zu bewirken. Darüber hinaus wurde für Menadion die direkte Interaktion mit Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen) nachgewiesen. So wurde für Menadion beispielsweise die Beeinflussung des EGF-Rezeptors über PTPasen gezeigt (Abdelmohsen et al., 2003). Diese Eigenschaft von Menadion

könnte das zu Wasserstoffperoxid selbst gegenteilige Ergebnis verursachen. Es konnte weiter gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen EGCG, unter Bedingungen, bei denen hohe Mengen H_2O_2 gebildet wurden, in der Lage waren, den Effekt von Insulin zu imitieren. Einhergehend mit der Aktivierung von Akt (siehe Abbildung 3.3) bewirkten hohe EGCG-Konzentrationen einen Export von FoxO1 aus dem Zellkern in vergleichbarer Weise wie Insulin, sowohl in HFFF2- als auch HepG2-Zellen (siehe Abbildung 3.15). Das Ergebnis, dass Untersuchungen, in denen die Behandlung mit 100 μM EGCG nicht zu einer Kernexklusion, sondern vielmehr zu einem Kernimport von FoxO1 führten (Abbildungen 3.10 und 3.11), obwohl hohe Konzentrationen der gleichen Charge EGCG zuvor eine Phosphorylierung von Akt und der FoxOs (siehe Abbildungen 3.2 und 3.5) bewirkten, ist mit Unterschieden in dem Versuchsaufbau zu erklären. Auch die Verwendung zweier verschiedener Chargen DMEM könnte dabei durchaus eine Rolle spielen, da wie bereits beschrieben auch hier deutliche Unterschiede bei der Bildung von H_2O_2 auftreten können (Clement et al., 2001; Long et al., 2000). Wie in Kapitel 3.3.1 erwähnt, wurde in einem einzelnen Versuch für die gleiche Charge EGCG (Lot 1) in der neueren Charge DMEM eine deutlich niedrigere Konzentration H_2O_2 6 Stunden nach der Zugabe von 100 μM EGCG gemessen als in der Charge DMEM, in der die Versuche zu den Untersuchungen zu der Aktivierung der Signalkaskade durchgeführt wurden. Mit dem Unterschreiten einer Schwelle hinsichtlich der stetig gebildeten Menge an H_2O_2 zeigte sich hier ein Effekt, der auf EGCG selbst und nicht auf die Bildung von H_2O_2 zurückzuführen war. Dieser Effekt scheint durch ausreichende Bildung von Wasserstoffperoxid und der damit einhergehenden Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade bei hohen Konzentrationen maskiert zu werden. Deutlich wurde dies mit einer Konzentrationsreihe von EGCG. Hier nahm die Insulin-mimetische Modulation der Lokalisation von FoxO1 mit sinkender Konzentration eingesetzten EGCGs und damit einhergehender Verringerung der H_2O_2 -Konzentration ab und die Insulin-antagonistische Modulation zu (siehe Abbildung 3.15). Wie Abbildung 3.16 zeigt, war die Insulin-mimetische Wirkung von hohen Konzentrationen auf die Lokalisation von FoxO genauso abhängig von der Bildung von H_2O_2 wie die Aktivierung von Akt (siehe Abbildung 3.8). Weiter führte der Einsatz von 100 μM des EC, bei dem zuvor keine signifikanten Mengen H_2O_2 detektiert wurden, ebenfalls zu

einer Insulin-antagonistischen Stimulation der Kernlokalisierung von FoxO1. Dennoch schien die Insulin-antagonistische Wirkung von EGCG stärker zu sein als die von EC, da bei deutlich geringeren Konzentrationen vergleichbare oder sogar stärkere Effekte beobachtet werden konnten. Es konnte eine Insulin-antagonistische Wirkung von EGCG auf die Lokalisation von FoxO1 sogar in Gegenwart von Insulin beobachtet werden. Hier wurde eine Stimulierung der Kernlokalisierung von FoxO1, induziert durch 100 μ M EGCG in Gegenwart von 0,1 μ M Insulin, beobachtet (siehe Abbildung 3.10).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Modulation der FoxO-Lokalisation kein Artefakt auf Grund der FoxO1a-EGFP Überexpression darstellte (siehe Abbildung 3.11). Allerdings konnte hier der Kernexport von endogenem FoxO1 als Antwort auf die Behandlung mit Insulin nicht oder nur sehr schlecht beobachtet werden, da keine konfokalmikroskopische Auswertung der Ergebnisse vorgenommen werden konnte. Hier wäre eine Verringerung der FoxO1-Menge im Kern gegenüber dem Cytoplasma in der Ebene der Kerne wahrscheinlich sichtbar gewesen, was in der Aufsicht durch FoxO1 im Cytoplasma über dem Kern bei insgesamt schwacher Fluoreszenz überdeckt wurde.

Die physiologische Relevanz der beobachteten Insulin-antagonistischen Modulation der FoxOs *in vitro* konnte in dem Modellorganismus *C.elegans* nachgewiesen werden. Bei dem Nematoden handelt es sich um einen Modellorganismus, der für die Untersuchung von biologischen Effekten von Flavonoiden etabliert ist (Kampkötter et al., 2007a; Kampkötter et al., 2007b). Wie unter Kapitel 4.3 diskutiert, spielt die Bildung von Wasserstoffperoxid bei dem Einsatz von hohen Konzentrationen EGCG in dieser Versuchsanordnung keine Rolle. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass nicht die gleiche Konzentration in den Organismus und zu den Zellen der Nematoden gelangt, wie sie in das Medium eingesetzt wurde. Aus diesem Grund wurde auch zusätzlich eine Dosis EGCG verwendet, die im Medium dem 5-fachen der maximal verwendeten Dosis in der Zellkultur entsprach. Die in Abbildung 3.19 dargestellten Ergebnisse zu der Stimulation der Kernlokalisierung des FoxO-Orthologs DAF-16 unterstützen die physiologische Bedeutung der *in vitro* gefunden Insulin-antagonistischen Modulation der FoxO-Transkriptionsfaktoren.

In humanen Fibroblasten wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Insulin-antagonistische Modulation der FoxO-Lokalisation durch EGCG zu einer entsprechenden Stimulation der FoxO-Aktivität führt (siehe Abbildungen 3.13 und 3.17). Die Stimulierung der Kernlokalisierung von FoxO1 durch EC resultierte jedoch nicht in einer Änderung der FoxO1-DNA Bindeaktivität. Dies zeigt, dass im Kern befindliches FoxO nicht zwangsläufig aktiv sein muss.

4.5 Modulation der FoxO-Zielgenexpression durch EGCG

Die Vertreter der FoxO-Familie FoxO1, FoxO3a und FoxO4 werden ubiquitär in allen Geweben exprimiert, wohingegen FoxO6 vornehmlich in neuronalen Geweben eine Rolle spielt und konstitutiv im Kern lokalisiert vorliegt (siehe Kapitel 1.3). Daher wurden in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien nur FoxO1, FoxO3a und FoxO4 untersucht. Wie zuvor diskutiert, konnte für FoxO1 eindeutig eine Beeinflussung durch die Behandlung der Zellen mit EGCG nachgewiesen werden. Da FoxO3 in Fibroblasten wie in Abbildung 3.12 A dargestellt und in HepG2-Zellen wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, konstitutiv im Kern lokalisiert vorlag, wurden weitere Untersuchungen zu Effekten der Behandlungen mit EGCG oder auch Insulin auf die Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren nicht weiter an FoxO3a vorgenommen. Auch FoxO4 scheint eine untergeordnete Rolle bei der Modulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren in Fibroblasten zu spielen. Um dies mit Sicherheit zu bestätigen, müssten zu der scheinbar sehr schwachen Expression von FoxO4 in Fibroblasten (siehe Abbildung 3.12 B) jedoch noch weitere Untersuchungen auf der Proteinebene durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der FoxO4-Antikörper nicht in gleichem Maß funktionierte, wie die verwendeten Antikörper gegen FoxO1 und FoxO3a. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse scheint vornehmlich FoxO1 in dem hier verwendeten Zellmodell bei der Modulation der FoxO-Zielgenexpression durch EGCG von ausschlaggebender Wichtigkeit zu sein. Aus diesem Grund konzentrieren sich die Untersuchungen zu der Lokalisation und Aktivität der FoxO-Transkriptionsfaktoren in dieser Arbeit auf FoxO1.

Wie in Kapitel 1.3.3 ausführlich beschrieben, werden verschiedene Gene direkt durch FoxO-Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Expression der Gene von p21 und MnSOD wird durch FoxO-Transkriptionsfaktoren initiiert (Gomis et al., 2006; Miyamoto et al., 2007). Für p21 wurde in Brustkrebszellen MCF-7 eine Steigerung der Expression in Antwort auf Insulin, in anderen Modellen eine Steigerung der Expression verursacht durch oxidativen Stress gezeigt (Kaneto et al., 1999; Lai et al., 2001). Sowohl für die Expression der MnSOD als auch des p21 konnte in der vorliegenden Arbeit kein eindeutiges Ergebnis gefunden werden. Je nach zugrunde gelegtem Gen für die Ladekontrolle (*hprt* oder *gapdh*) variierten die gemessenen relativen mRNA-Mengen (siehe Abbildung 3.14). Grund hierfür kann eine Beeinflussung des Gens für die Ladekontrolle durch die Behandlungen sein. In einer anderen Arbeit wurde für die MnSOD eine gesteigerte Expression als Antwort auf EGCG-Behandlungen nachgewiesen (Li et al., 2007). Arbeiten aus der Arbeitsgruppe um Dr. Kampkötter (Inst. für Toxikologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) zeigten nach der Behandlung von *C.elegans* mit EGCG eine gesteigerte Expression des MnSOD-Orthologs SOD3 auf Proteinebene. Diese Daten unterstützen die Ergebnisse welche sich auf die *hprt* als Ladekontrolle beziehen. Diesen Daten zufolge wird einhergehend mit einer Steigerung der Kernlokalisierung und der DNA-Bindeaktivität (vergleiche Abbildungen 3.10 und 3.13) durch die Behandlung von Fibroblasten mit EGCG die Expression sowohl der MnSOD als auch des p21 gesteigert.

4.6 Insulin-antagonistische Wirkung von EGCG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte wie zuvor beschrieben die Insulin-mimetische Wirkung von hohen Konzentrationen EGCG auf den PI3K/Akt/FoxO-Signalweg auf die stetige Bildung signifikanter Mengen H_2O_2 zurückgeführt werden. In Versuchsanordnungen mit EGCG, in denen die Bildung von Wasserstoffperoxid keine Rolle spielte, wurde hier EGCG eine Insulin-antagonistische Wirkung auf die FoxO-Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. Dieser Effekt von EGCG kann wie

beschrieben nicht über die untersuchte Signalkaskade vermittelt werden. Für EGCG bestehen zwei mögliche Wege FoxOs zu stimulieren, zum einen über die Inhibierung eines Inhibitors, zum anderen über die Stimulierung eines Aktivators der FoxO-Transkriptionsfaktoren.

Aktivierung der JNK

Ein möglicher Vermittler des Insulin-antagonistischen Effekts von EGCG ist JNK. Die JNK sind, wenn an den in dieser Arbeit untersuchten Stellen phosphoryliert, aktiv und phosphorylieren ihrerseits FoxO-Transkriptionsfaktoren wodurch diese aktiviert und in den Zellkern transportiert werden. Die JNK selbst können durch ROS wie H₂O₂ aktiviert werden (Essers et al., 2004). Die schwache Aktivierung der JNK nach der Behandlung von Fibroblasten mit EGCG, wie sie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.20) könnte auf der Bildung von H₂O₂ beruhen. Für die anderen Catechinderivate konnte keine Aktivierung der JNK nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.20) obwohl zumindest für EC eine Stimulation der Kernlokalisation von FoxO nachgewiesen wurde (vergleiche Abbildung 3.15). Im *C.elegans*-Modell, in dem die Bildung von Wasserstoffperoxid keine Rolle spielte, war wie beschrieben eine Stimulierung der Kernlokalisation von dem FoxO-Ortholog durch EGCG zu beobachten (vergleiche Abbildung 3.19). Auf der Basis dieser Ergebnisse kann die JNK als Vermittler der Insulin-antagonistischen Wirkung von EGCG ausgeschlossen werden. Dennoch stellt die Aktivierung der JNK einen Gegenspieler während der Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade durch H₂O₂ verursacht durch EGCG dar.

Inhibierung des EGF-Rezeptors

Im Zusammenhang mit beobachteten gesundheitsförderlichen Effekten auf die Karzinogenese wird die Inhibierung des EGF-Rezeptors durch EGCG diskutiert (Masuda et al., 2001; Shimizu et al., 2005). Die Inhibierung des EGF-Rezeptors würde zu einer Verminderung der Aktivierung von Akt führen und somit eine

Stimulation einer nukleären Akkumulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren unterstützen. Die Inhibierung des EGF-Rezeptors bei der Stimulierung von FoxOs durch EGCG-Behandlung konnte in der vorliegenden Arbeit als hauptverantwortlicher Mechanismus ausgeschlossen werden (vergleiche Abbildung 3.21). Die Behandlung von Fibroblasten mit EGCG-Konzentrationen, bei denen die Bildung von H₂O₂ keine Rolle spielt, führte nur zu einer schwachen Verringerung der EGF-Rezeptor vermittelten Aktivierung von Akt. Die in dem verwendeten Zellmodell beobachteten Effekten stellen lediglich einen äußerst schwachen Beitrag zu der insgesamt deutlichen FoxO-stimulierenden Wirkung von EGCG dar.

Inhibierung der DYRK1A

Bei DYRK1A handelt es sich um eine Kinase, die basal und in Antwort auf Insulin in erhöhtem Maße über Phosphorylierung die FoxO-Transkriptionsfaktoren inaktiviert (Rena et al., 2002; Woods et al., 2001). Von Bain *et. al* wurde an isolierter DYRK1A gezeigt, dass es sich bei EGCG um einen starken Inhibitor dieser Kinase handelt (Bain et al., 2003a). Die Inhibierung der DYRK1A könnte der beschriebenen Inaktivierung der FoxOs entgegenwirken und eine Akkumulation aktiven FoxOs im Zellkern bewirken. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus ein vielversprechender Weg für die FoxO-stimulierende Wirkung von EGCG ist. Wie in Abbildung 3.22 dargestellt, führte die Behandlung mit einem bekannten Inhibitor der DYRK1A (Harmin) in zwei verschiedenen Zelllinien zu einer Stimulierung der Kernlokalisation von FoxO1. Der Inhibitor wurde in einer Konzentration eingesetzt, für die in einer *in-vitro* Studie eine deutliche Wirkung beobachtet wurde (Seifert et al., 2008). In humanen Fibroblasten konnte nachgewiesen werden, dass die Akkumulation von FoxO1 im Zellkern verursacht durch die Behandlung mit dem DYRK1A-Inhibitor in einer deutlichen Steigerung der DNA-Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors resultiert.

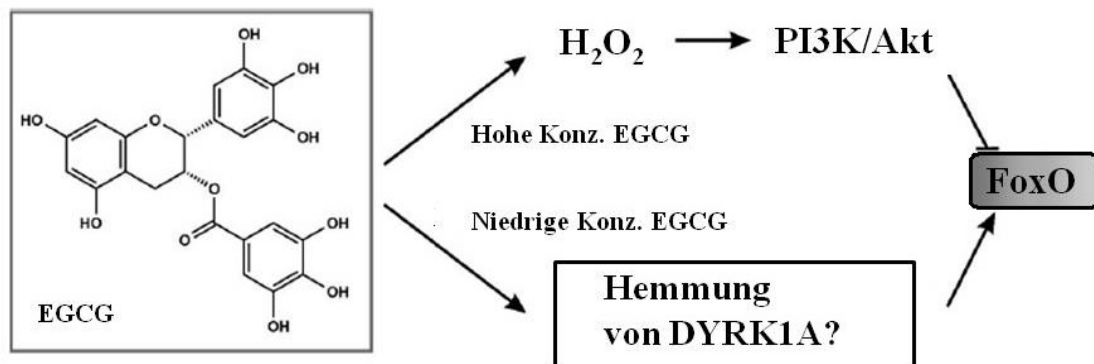


Abb. 4.2: Schema der Insulin-mimetischen und Insulin-antagonistischen FoxO-Modulation durch EGCG

Zu Bedingungen, unter denen hohe Konzentrationen von EGCG zu der Generierung signifikanter Mengen H_2O_2 führen, wird der Insulin-responsive PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, was in einer Inhibierung von FoxOs resultiert. Kommt es durch EGCG nicht zu einer Bildung signifikanter Mengen H_2O_2 , wird FoxO durch EGCG stimuliert. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die Stimulierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren auf der Inhibierung eines Inaktivators der FoxOs, der DYRK1A, beruht.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Grüntee-Flavonoid (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) sowohl Insulin-mimetische als auch Insulin-antagonistische Effekte auf Signalkaskaden in menschlichen Zellen aufweist. Inkubationen in Gegenwart unphysiologisch hoher Konzentrationen EGCG (bis zu 100 μM) bewirkte die Aktivierung des Insulin-responsiven Phosphoinositid-3'-Kinase (PI3K)/Akt-Signalwegs in kultivierten menschlichen Hautfibroblasten (HFFF2). Diese Aktivierung resultiert in der Phosphorylierung, dem nukleären Export und der Verringerung der DNA-Bindeaktivität von Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie. Dieser Effekt wurde durch die Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium vermittelt, wie durch den Einsatz eines Superoxiddismutase- und Katalase-Mimetikums gezeigt werden konnte. Im Gegensatz hierzu bewirkten niedrige Konzentrationen EGCG (1–10 μM) die Akkumulation von FoxOs im Zellkern von Fibroblasten und von HepG2 Hepatomzellen. Gleichzeitig wurde die FoxO DNA-Bindeaktivität in Fibroblasten gesteigert.

Harmin, ein Inhibitor der FoxO-Kinase DYRK1A, stimulierte in ähnlicher Weise die nukleäre Akkumulation und DNA-Bindeaktivität von FoxO.

Die physiologische Relevanz der FoxO-stimulierenden Eigenschaften von EGCG wurde am einfachen Modellorganismus *C.elegans* überprüft. Ähnlich den Säugerzellen reagierten *C.elegans*-Würmer mit einer Akkumulation des FoxO-Orthologs DAF-16 in den Zellkernen nach Inkubation mit EGCG.

Zusammenfassend ergibt sich eine zweifache Wirkung von EGCG. In niedrigen Konzentrationen stimuliert es die Akkumulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren im Zellkern und die DNA-Bindeaktivität in kultivierten menschlichen Zellen. Höhere EGCG-Konzentrationen gehen mit der Bildung von Wasserstoffperoxid einher, das den PI3K/Akt-Signalweg stimuliert, was den Effekt der Stimulierung der FoxO-Aktivität maskiert.

Summary

It is demonstrated here that the green tea flavonoid (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) may exert both insulin-mimetic and insulin-antagonistic effects on signaling cascades in human cells. Incubation of HFFF2 human skin fibroblasts in the presence of unphysiologically high concentrations of EGCG (up to 100 μ M) caused activation of the insulin-responsive phosphoinositide-3'-kinase (PI3K)/Akt pathway. This activation resulted in phosphorylation, nuclear exclusion and attenuation of DNA binding activity of FoxO family transcription factors. This effect was mediated by hydrogen peroxide generated in cell culture media, as demonstrated using a superoxide dismutase and catalase mimetic. In contrast, EGCG in low concentrations (1–10 μ M) elicited nuclear accumulation of FoxO1a-EGFP in fibroblasts and HepG2 hepatoma cells, and it enhanced the endogenous FoxO DNA binding activity in fibroblasts. Harmine, an inhibitor of the FoxO kinase DYRK1A, similarly stimulated FoxO nuclear accumulation and DNA binding activity.

The physiological relevance of FoxO-stimulating properties by EGCG was tested *in vivo* using the model organism *C.elegans*. Worms reacted to EGCG treatment in a fashion similar to mammalian cells, i.e. by nuclear accumulation of the FoxO ortholog, DAF-16.

In summary, there are two modes of action of EGCG. At low concentrations, it stimulates FoxO transcription factor nuclear accumulation and DNA binding activity in cultured human cells. At higher concentrations of EGCG, this effect is masked by EGCG-derived hydrogen peroxide that stimulates PI3K/Akt signaling to attenuate FoxO activity.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, S., Wink, M., 2009. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* 75, 216-221.
- Abdelmohsen, K., Gerber, P. A., von Montfort, C., Sies, H., Klotz, L. O., 2003. Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases. *J.Biol.Chem.* 278, 38360-38367.
- Ahmad, N., Gupta, S., Mukhtar, H., 2000. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 376, 338-346.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B. A., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15, 6541-6551.
- Anderson, M. J., Viars, C. S., Czekay, S., Cavenee, W. K., Arden, K. C., 1998. Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 47, 187-199.
- Anton, S., Melville, L., Rena, G., 2007. Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. *Cell Signal.* 19, 378-383.
- Arden, K. C., 2006. Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp.Gerontol.* 41, 709-717.
- Arts, I. C., Hollman, P. C., Feskens, E. J., Bueno de Mesquita, H. B., Kromhout, D., 2001. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am.J.Clin.Nutr.* 74, 227-232.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P., 2003b. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem.J.* 371, 199-204.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P., 2003a. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem.J.* 371, 199-204.
- Balendran, A., Casamayor, A., Deak, M., Paterson, A., Gaffney, P., Currie, R., Downes, C. P., Alessi, D. R., 1999. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr.Biol.* 9, 393-404.
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., Bouwens, L. C., 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* 37, 693-704.

Barthel, A., Klotz, L. O., 2005. Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress. *Biol.Chem.* 386, 207-216.

Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., Tsichlis, P. N., 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.

Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.

Broadhurst, C. L., Polansky, M. M., Anderson, R. A., 2000. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J.Agric.Food Chem.* 48, 849-852.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E., Yaffe, M. B., 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J.Cell Biol.* 156, 817-828.

Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., Greenberg, M. E., 2001. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol.Cell Biol.* 21, 952-965.

Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., Greenberg, M. E., 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.

Cantley, L. C., 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.

Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J. C., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Carracedo, A., Pandolfi, P. P., 2008. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27, 5527-5541.

Chen, D., Milacic, V., Chen, M. S., Wan, S. B., Lam, W. H., Huo, C., Landis-Piwowar, K. R., Cui, Q. C., Wali, A., Chan, T. H., Dou, Q. P., 2008. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol.Histopathol.* 23, 487-496.

- Clement, M. V., Ramalingam, J., Long, L. H., Halliwell, B., 2001. The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide. *Antioxid.Redox.Signal.* 3, 157-163.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B. A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Datta, K., Franke, T. F., Chan, T. O., Makris, A., Yang, S. I., Kaplan, D. R., Morrison, D. K., Golemis, E. A., Tsichlis, P. N., 1995. AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol.Cell Biol.* 15, 2304-2310.
- Datta, S. R., Brunet, A., Greenberg, M. E., 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905-2927.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M. E., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Dong, Z., 2000. Effects of food factors on signal transduction pathways. *Biofactors* 12, 17-28.
- Essers, M. A., Weijzen, S., De Vries-Smits, A. M., Saarloos, I., de Ruiter, N. D., Bos, J. L., Burgering, B. M., 2004. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* 23, 4802-4812.
- Frescas, D., Valenti, L., Accili, D., 2005. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J.Biol.Chem.* 280, 20589-20595.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E., Cantley, L. C., 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu.Rev.Biochem.* 67, 481-507.
- Fujiki, H., 1999. Two stages of cancer prevention with green tea. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 125, 589-597.
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N., 2000. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem.J.* 349, 629-634.
- Gomis, R. R., Alarcon, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., Massague, J., 2006. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 12747-12752.
- Graham, H. N., 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev.Med.* 21, 334-350.

- Greer, E. L., Brunet, A., 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410-7425.
- Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P., Unterman, T., 1999. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J.Biol.Chem.* 274, 17184-17192.
- Gupta, S., Hastak, K., Ahmad, N., Lewin, J. S., Mukhtar, H., 2001. Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 10350-10355.
- Hakim, I. A., Harris, R. B., Weisgerber, U. M., 2000. Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9, 727-731.
- Hall, R. K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'Brien, R., Granner, D. K., 2000. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J.Biol.Chem.* 275, 30169-30175.
- Halliwell, B., 2003. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* 540, 3-6.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 1992. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 307, 108-112.
- Hermeking, H., Benzinger, A., 2006. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin.Cancer Biol.* 16, 183-192.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., Kromhout, D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.
- Hertog, M. G., Sweetnam, P. M., Fehily, A. M., Elwood, P. C., Kromhout, D., 1997. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am.J.Clin.Nutr.* 65, 1489-1494.
- Hertweck, M., Gobel, C., Baumeister, R., 2004. C. elegans SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev.Cell* 6, 577-588.
- Honda, Y., Honda, S., 1999. The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 13, 1385-1393.
- Huang, H., Regan, K. M., Wang, F., Wang, D., Smith, D. I., van Deursen, J. M., Tindall, D. J., 2005. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 1649-1654.

Huang, Y., Zhang, A., Lau, C. W., Chen, Z. Y., 1998. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 63, 275-283.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M., Guarente, L., 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.

Jacobs, F. M., Van Der Heide, L. P., Wijchers, P. J., Burbach, J. P., Hoekman, M. F., Smidt, M. P., 2003. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J.Biol.Chem.* 278, 35959-35967.

Johnson, T. E., 1990. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* 249, 908-912.

Kaestner, K. H., Knochel, W., Martinez, D. E., 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 14, 142-146.

Kampkötter, A., Gombitang, N. C., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Watjen, W., Kahl, R., 2007a. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch.Toxicol.* 81, 849-858.

Kampkötter, A., Nkwonkam, C. G., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Watjen, W., Kahl, R., 2007b. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans* KAMPKOTTER2007. *Toxicology* 234, 113-123.

Kaneto, H., Kajimoto, Y., Fujitani, Y., Matsuoka, T., Sakamoto, K., Matsuhisa, M., Yamasaki, Y., Hori, M., 1999. Oxidative stress induces p21 expression in pancreatic islet cells: possible implication in beta-cell dysfunction. *Diabetologia* 42, 1093-1097.

Kao, Y. H., Hiipakka, R. A., Liao, S., 2000. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 141, 980-987.

Katiyar, S. K., Afaq, F., Azizuddin, K., Mukhtar, H., 2001. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 176, 110-117.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R., 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464.

Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., Ruvkun, G., 1997. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942-946.

Kops, G. J., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W., Coffey, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H., Burgering, B. M., 2002a. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321.

Kops, G. J., de Ruiter, N. D., De Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L., Burgering, B. M., 1999. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398, 630-634.

Kops, G. J., Medema, R. H., Glassford, J., Essers, M. A., Dijkers, P. F., Coffey, P. J., Lam, E. W., Burgering, B. M., 2002b. Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 22, 2025-2036.

Körner M., 2007. German tea market: high standards, moderate consumption. *Tea & Coffee Trade Journal* 179.

Kortylewski, M., Feld, F., Krüger, K. D., Bahrenberg, G., Roth, R. A., Joost, H. G., Heinrich, P. C., Behrmann, I., Barthel, A., 2003. Akt modulates STAT3-mediated gene expression through a FKHR (FOXO1a)-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 5242-5249.

Kuriyama, S., Shimazu, T., Ohmori, K., Kikuchi, N., Nakaya, N., Nishino, Y., Tsubono, Y., Tsuji, I., 2006. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA* 296, 1255-1265.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lai, A., Sarcevic, B., Prall, O. W., Sutherland, R. L., 2001. Insulin/insulin-like growth factor-I and estrogen cooperate to stimulate cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of cyclin E and p21(WAF1/Cip1). *J. Biol. Chem.* 276, 25823-25833.

Lambert, J. D., Yang, C. S., 2003. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat. Res.* 523-524, 201-208.

Lapidot, T., Walker, M. D., Kanner, J., 2002. Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3156-3160.

Larsson, S. C., Wolk, A., 2005. Tea consumption and ovarian cancer risk in a population-based cohort. *Arch. Intern. Med.* 165, 2683-2686.

Lee, R. Y., Hench, J., Ruvkun, G., 2001. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Curr. Biol.* 11, 1950-1957.

- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., Rhee, S. G., 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J.Biol.Chem.* 273, 15366-15372.
- Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C., Ruvkun, G., 2003. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* 300, 644-647.
- Leslie, N. R., 2006. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxid.Redox.Signal.* 8, 1765-1774.
- Li, Y. M., Chan, H. Y., Huang, Y., Chen, Z. Y., 2007. Green tea catechins upregulate superoxide dismutase and catalase in fruit flies. *Mol.Nutr.Food Res.* 51, 546-554.
- Liang, J., Slingerland, J. M., 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2, 339-345.
- Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., Lin, J. K., 1997. Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J.Cell Biochem.* 67, 55-65.
- Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S., Johnson, T. E., 1995. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 7540-7544.
- Long, L. H., Clement, M. V., Halliwell, B., 2000. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 273, 50-53.
- Long, L. H., Halliwell, B., 2009. Artefacts in cell culture: pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 388, 700-704.
- Long, L. H., Kirkland, D., Whitwell, J., Halliwell, B., 2007. Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutat.Res.* 634, 177-183.
- Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Dusterhoft, T., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V., 2004. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J.Biol.Chem.* 279, 6190-6195.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
- Lu, Y. P., Lou, Y. R., Xie, J. G., Peng, Q. Y., Liao, J., Yang, C. S., Huang, M. T., Conney, A. H., 2002. 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* 99, 12455-12460.

Luo, X., Puig, O., Hyun, J., Bohmann, D., Jasper, H., 2007. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. *EMBO J.* 26, 380-390.

Masuda, M., Suzui, M., Weinstein, I. B., 2001. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin.Cancer Res.* 7, 4220-4229.

Matsumoto, M., Pocai, A., Rossetti, L., Depinho, R. A., Accili, D., 2007. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell Metab* 6, 208-216.

Menet, M. C., Sang, S., Yang, C. S., Ho, C. T., Rosen, R. T., 2004. Analysis of theaflavins and thearubigins from black tea extract by MALDI-TOF mass spectrometry. *J.Agric.Food Chem.* 52, 2455-2461.

Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., Hirao, A., 2007. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* 1, 101-112.

Morris, J. Z., Tissenbaum, H. A., Ruvkun, G., 1996. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 536-539.

Mukamal, K. J., Maclure, M., Muller, J. E., Sherwood, J. B., Mittleman, M. A., 2002. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 105, 2476-2481.

Murakami, S., Johnson, T. E., 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 143, 1207-1218.

Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K., Kondo, T., 2003. Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J.Biol.Chem.* 278, 50226-50233.

Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M., Imai, K., 2000. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 13, 49-54.

Nakae, J., Park, B. C., Accili, D., 1999. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J.Biol.Chem.* 274, 15982-15985.

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G. I., Lee, L., Tissenbaum, H. A., Ruvkun, G., 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389, 994-999.

Oh, S. W., Mukhopadhyay, A., Svazikapa, N., Jiang, F., Davis, R. J., Tissenbaum, H. A., 2005. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 4494-4499.

Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., Donner, D. B., 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.

Pan, M. H., Lin-Shiau, S. Y., Ho, C. T., Lin, J. H., Lin, J. K., 2000. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activity by theaflavin-3,3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages. *Biochem.Pharmacol.* 59, 357-367.

Paradis, S., Ailion, M., Toker, A., Thomas, J. H., Ruvkun, G., 1999. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 13, 1438-1452.

Paradis, S., Ruvkun, G., 1998. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev.* 12, 2488-2498.

Potente, M., Urbich, C., Sasaki, K., Hofmann, W. K., Heeschen, C., Aicher, A., Kollipara, R., Depinho, R. A., Zeiher, A. M., Dimmeler, S., 2005. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J.Clin.Invest* 115, 2382-2392.

Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., Sellers, W. R., 2002. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2, 81-91.

Rena, G., Guo, S., Cichy, S. C., Unterman, T. G., Cohen, P., 1999. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J.Biol.Chem.* 274, 17179-17183.

Rena, G., Prescott, A. R., Guo, S., Cohen, P., Unterman, T. G., 2001. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem.J.* 354, 605-612.

Rena, G., Woods, Y. L., Prescott, A. R., Pegg, M., Unterman, T. G., Williams, M. R., Cohen, P., 2002. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *EMBO J.* 21, 2263-2271.

- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Kloting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C. R., Bluher, M., 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 8665-8670.
- Schmoll, D., Walker, K. S., Alessi, D. R., Grempler, R., Burchell, A., Guo, S., Walther, R., Unterman, T. G., 2000. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J.Biol.Chem.* 275, 36324-36333.
- Seifert, A., Allan, L. A., Clarke, P. R., 2008. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.* 275, 6268-6280.
- Sesso, H. D., Gaziano, J. M., Buring, J. E., Hennekens, C. H., 1999. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am.J.Epidemiol.* 149, 162-167.
- Shimizu, M., Deguchi, A., Lim, J. T., Moriwaki, H., Kopelovich, L., Weinstein, I. B., 2005. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin.Cancer Res.* 11, 2735-2746.
- Shinoda, S., Schindler, C. K., Meller, R., So, N. K., Araki, T., Yamamoto, A., Lan, J. Q., Taki, W., Simon, R. P., Henshall, D. C., 2004. Bim regulation may determine hippocampal vulnerability after injurious seizures and in temporal lobe epilepsy. *J.Clin.Invest* 113, 1059-1068.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew.Chem.Int.EA.* 25, 1058-1071.
- Staal, S. P., Hartley, J. W., Rowe, W. P., 1977. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 3065-3067.
- Stangl, V., Lorenz, M., Stangl, K., 2006. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol.Nutr.Food Res.* 50, 218-228.
- Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2005. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J.Cell Biol.* 170, 295-304.
- Ternes W, Täufel A, Tunger L, Zobel M, 2005. *Lebensmittel-Lexikon*, Hamburg.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., Jr., DiStefano, P. S., Chiang, L. W., Greenberg, M. E., 2002. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296, 530-534.
- Tsai, K. L., Sun, Y. J., Huang, C. Y., Yang, J. Y., Hung, M. C., Hsiao, C. D., 2007. Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res.* 35, 6984-6994.

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2004. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 23, 1889-1899.

Van Der Heide, L. P., Jacobs, F. M., Burbach, J. P., Hoekman, M. F., Smidt, M. P., 2005. FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling. *Biochem.J.* 391, 623-629.

van der Horst, A., De Vries-Smits, A. M., Brenkman, A. B., van Triest, M. H., van den, B. N., Colland, F., Maurice, M. M., Burgering, B. M., 2006. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat.Cell Biol.* 8, 1064-1073.

Walter, P. L., Steinbrenner, H., Barthel, A., Klotz, L. O., 2008. Stimulation of selenoprotein P promoter activity in hepatoma cells by FoxO1a transcription factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 365, 316-321.

Waltner-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., Hall, R. K., Nawano, M., Granner, D. K., 2002. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J.Biol.Chem.* 277, 34933-34940.

Wan, S. B., Landis-Piwowar, K. R., Kuhn, D. J., Chen, D., Dou, Q. P., Chan, T. H., 2005. Structure-activity study of epi-gallocatechin gallate (EGCG) analogs as proteasome inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.* 13, 2177-2185.

Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., Reed, J. C., 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-343.

Wee, L. M., Long, L. H., Whiteman, M., Halliwell, B., 2003. Factors affecting the ascorbate- and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium. *Free Radic.Res.* 37, 1123-1130.

Woods, Y. L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T. G., Cohen, P., 2001. The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem.J.* 355, 597-607.

Yanase, S., Yasuda, K., Ishii, N., 2002. Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (age-1, mev-1 and daf-16) that affect life span. *Mech.Ageing Dev.* 123, 1579-1587.

Yang, C. S., 1997. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Nature* 389, 134-135.

Yang, C. S., Sang, S., Lambert, J. D., Hou, Z., Ju, J., Lu, G., 2006. Possible mechanisms of the cancer-preventive activities of green tea. *Mol.Nutr.Food Res.* 50, 170-175.

Yang, F., Oz, H. S., Barve, S., de Villiers, W. J., McClain, C. J., Varilek, G. W., 2001. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol.Pharmacol.* 60, 528-533.

Yu, C. X., Li, S., Whorton, A. R., 2005. Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols. *Mol.Pharmacol.* 68, 847-854.

Danksagung

Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz möchte ich vor allem für die interessante Themenstellung danken. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die fachliche Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und für die Ermöglichung meines Promotionsvorhabens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Paul M. Weber für die Übernahme des Korreferats.

Herrn PD Dr. Andreas Kampkötter danke ich für die Unterweisung in der Arbeit mit *C.elegans*, die Möglichkeit in seiner Gruppe zu arbeiten und für anregende fachliche Diskussionen.

Ich bedanke mich bei allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klotz für ihre großartige Hilfsbereitschaft und das angenehme humorvolle Arbeitsklima.

Allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I sei für die gesunde Arbeitsatmosphäre und das Gefühl nie wirklich fort gewesen zu sein gedankt.

Dr. Bodo Speckmann und Kerstin Reimann danke ich für die Unterstützung am Ende meiner Arbeit.

Ich danke allen Freunden und Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Alternsforschung des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung gGmbH für das freundliche und angenehme Arbeitsklima.

Schließlich danke ich meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern sowie meinen engsten Freunden.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 18.03.2010

(André Bartholome)