

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Kelm

Systemische Effekte von Flavanol-Einnahme: Einfluss der oralen Gabe von (-) Epicatechin auf die Regulation von antioxidativen Proteinen in Organen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Kim Weber
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Miriam M. Cortese-Krott

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christoph V. Suschek

In der Wissenschaft ist alles wichtig.

Heinrich Heine

Zusammenfassung

Das Risiko für kardiovaskulär bedingte Erkrankungen konnte durch den regelmäßigen Verzehr von flavanolhaltigen Produkten, wie Wein, Früchten und Kakao vermindert werden. Weiterhin lassen *in vitro* Versuche einen Einfluss von Flavanolen auf antioxidative Proteine wie Glutathion (GSH) und Enzyme der antioxidativen Antwort vermuten. Eine Theorie der Flavanolwirkung ist der Signalweg des redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 (*nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*). Die zugrunde liegenden protektiven Mechanismen oder die *in vivo* -Auswirkungen konnten noch nicht vollständig geklärt werden. Ziel der hier durchgeführten Untersuchung war, die Effekte der oralen Gabe des Flavanols (-) Epicatechin *in vivo* im Mausmodell zu messen.

Hierfür wurde nach vier Versuchstagen der GSH-Gehalt durch Fluoreszenzmessung in Herz, Lunge und Leber bestimmt. Die densitometrische Auswertung der Protein-expression der antioxidativen Antwort in der Western Blot Analyse erfolgte für folgende Enzyme: Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase, Glutathion-S-Transferase, Glutamatcysteinyligase (GCLM und GCLC), Katalase, Superoxiddismutase-1, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Dehydrogenase und Hämoxxygenase-1. Zusätzlich wurde die Expression des redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren Nrf2 untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die orale (-) Epicatechin-Gabe eine organabhängige Änderung des GSH-Gehaltes und der Synthese induzierte. In der Leber sank der GSH- Gehalt signifikant, dies korrelierte mit der verminderten Proteinexpression der GCLC und GCLM, während der GSH-Gehalt in der Lunge und die Expression der GCLC signifikant stieg. Es kam zu einer signifikanten Erniedrigung der GST-Isoform pi in der Leber und Erhöhung in der Lunge. Die Katalase wurde in allen drei Organen vermehrt exprimiert. Eine weiterführende Induktion der antioxidativen Antwort konnte jedoch nicht generell nachgewiesen werden. Die Expressionen der Transkriptionsfaktoren wurden überwiegend nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, dass in geringem Maße auch ohne das Vorliegen einer Schädigung eine flavanolreiche Ernährung *in vivo* organabhängig einen Schutz induzieren kann. Darüberhinaus sind weitere Fragen u.a. zur Aktivierung der redoxsensitiven Signalwege und dem Einfluss pathogener Stimuli bei der Wirkweise von flavanolreicher Ernährung zu erörtern. Zur Relevanz der Ergebnisse im Menschen, z.B. für den Einsatz bei kardiovaskulären Erkrankungen, bietet sich die klinische Untersuchung bei flavanolreicher Ernährung an.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungen	VI
Tabellen	VII
1. Einleitung	1
1.1 Flavanole und ihre Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen .	1
1.2 Flavanole	1
1.3 Redox-Status	4
1.4 Effekte von (-) Epicatechin auf ROS, oxidativen Stress, Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren, Antioxidantien und Redox-Status	12
2. Ziel der Arbeit	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Materialien	15
3.2 Methoden	20
3.2.1 Tierexperimentelles	20
3.2.2 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden (GSH Assay/ELISA)	21
3.2.3 Statistische Auswertung	25
4. Ergebnisse	26
4.1 Nach oraler (-) Epicatechin-Gabe induzierte Änderung des GSH Gehaltes	26
4.2 Nach oraler (-) Epicatechin-Gabe induzierte Änderung der Proteinexpression der Enzyme der antioxidativen Antwort	30
4.3 Nach oraler (-) Epicatechin-Gabe induzierte Änderung der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Nrf1	42
5. Diskussion	45

5.1 Die orale (-) Epicatechin-Gabe hat organanhängige Wirkungen auf den GSH-Gehalt.....	45
5.2 Die orale (-) Epicatechin-Gabe hat organabhängige Wirkungen auf die Proteinexpression der Enzyme der antioxidativen Antwort.....	48
5.3 Die orale (-) Epicatechin-Gabe hat organabhängige Wirkungen auf die Transkriptionsfaktoren	51
6. Schlussfolgerung	57
7. Literaturverzeichnis	59

Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
KAT	Katalase
DEN	N-Nitrosodiethylamine
DNA(S)	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FMD	<i>Flow mediated dilatation</i> (flussvermittelte Dilatation)
GCL	Glutamatcysteinyligase
GGT	γ -Glutamyltransferase (γ GT)
GPx	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion Reduktase
GSH	Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin)
GST	Glutathion-S-Transferase
GSSG	Glutathiondisulfid
H2O2	Wasserstoffperoxid
Hep G2	Hepatozelluläre Karzinom Zelllinie (<i>human liver hepatocellular carcinoma cell line</i>)
HO-1	Hämoxygenase-1
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen -Endothelzellen (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
IE	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
Keap 1	<i>Kelch-like ECH-associated protein</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAPK/ERK	<i>mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases</i>
mM	millimolar
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Proben
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)
NQO1	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Dehydrogenase, NAD(P)H Coenzym Q Oxidoreduktase (<i>NAD(P)H dehydrogenase [ubiquinone] 1</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf1	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i>
O2	Sauerstoff
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI3-K/Akt	Phosphoinositid 3-Kinasen (<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)/ Serin/Threonin Kinase Akt, bzw. Protein Kinase B (PKB)
RIPA	<i>Radio Immunoprecipitation Assay Buffer</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNA(S)	Ribonukleinsäure

TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
T-TBS	<i>Tris-buffered saline with Tween®20</i>
SD	Standardabweichung
SOD-1	Superoxiddismutase-1
WT	Wildtyp/ <i>wildtype</i>

Abbildungen

Abb. 1: Flavanol:	2
Abb. 2: (-) Epicatechin:	4
Abb. 3: Die antioxidative Antwort:	8
Abb. 4: Versuchsaufbau: Zur Analyse der systemischen Wirkung von (-) Epicatechin auf die antioxidativen Proteine in den Organen Herz, Lunge und Leber.	19
Abb. 5: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt im Herzen	27
Abb. 6: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt in der Lunge ...	28
Abb. 7: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt in der Leber	29
Abb. 8: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion-Homöostase im Herzen	30
Abb. 9: Densitometrische Auswertung der Glutathion-Homöostase im Herzen	31
Abb. 10: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme des antioxidativen Systems im Herzen	32
Abb. 11: Densitometrische Auswertung Enzyme des antioxidativen Systems im Herzen	33
Abb. 12: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion-Homöostase in der Lunge	34
Abb. 13: Densitometrische Auswertung der Glutathion-Homöostase in der Lunge	35
Abb. 14: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme des antioxidativen Systems in der Lunge	36
Abb. 15: Densitometrisch Auswertung Enzyme des antioxidativen Systems in der Lunge	37
Abb. 16: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion Homöostase in der Leber	38
Abb. 17: Densitometrisch Auswertung der Glutathion-Homöostase in der Leber	39
Abb. 18: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme des antioxidativen Systems in der Leber	40
Abb. 19: Densitometrisch Auswertung Enzyme des antioxidativen Systems in der Leber	41
Abb. 20: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Nrf1 in Herz, Lunge und Leber	42

Abb. 21: Densitometrisch Auswertung der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Nrf1 im Herzen, in der Lunge und in der Leber.....	43
--	----

Tabellen

Tabelle 1: Antikörper.....	15
Tabelle 2: Sekundär Antikörper (Verdünnung 1:5000).....	16
Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen I.....	16
Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen II	17
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 6: Assays	17
Tabelle 7: Geräte.....	18
Tabelle 8: Software.....	18
Tabelle 9: GSH Gehalt in den Geweben Herz, Lunge und Leber nach oraler (-) Epicatechin Gabe	26

1. Einleitung

1.1 Flavanole und ihre Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen

Auf Erkrankungserscheinungen wie ischämische Herzerkrankungen, Schlaganfälle, Diabetes mellitus und Krebs zeigen Genussmittel, wie Kakao, Wein und Tee eine benefizielle Wirkung [1][2–4]. Der positive Effekt wird auf den in ihnen erhaltenen hohen Flavanolanteil [5] zurückgeführt. In einer Kohortenstudie zeigte sich tendenziell eine verminderte Letalität bei ischämischen Herzerkrankungen in Bevölkerungsgruppen mit hohem Flavonoidkonsum [1,6–8].

In der (westlichen) Welt zählen besonders die nichtübertragbaren Krankheiten, wie Erkrankungen des Kreislaufsystems, besonders kardiovaskulärer Ursachen, zu den führenden Morbiditäts- und Mortalitätsursachen [9,10]. Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist oft Folge von atherosklerotischen Prozessen, die zu Gefäßstenosen oder -verschlüssen geführt haben. Galle *et al.* (2006) beschrieben die Gründe dafür unter anderem in der Entzündung der Gefäßwand, die durch oxidiertes LDL-Cholesterin verursacht wird [11]. Exogen oder endogen produzierte reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) können ungewollte Oxidationsvorgänge im Körper auslösen und zu vermehrten Oxidationen und Desoxyribonukleinsäure (DNA(S))-Schäden führen [12]. Umweltfaktoren wie Ernährung und körperliche Aktivität können die Prognose der KHK beeinflussen [10,13]. Flavanole sind durch ihre Beeinflussung der Stickstoffmonoxid (NO)-Bioverfügbarkeit und endothelabhängigen Dilatation [14,15] in der Forschung und unter dem Gesichtspunkt der Nahrungsergänzung in Bezug auf einen protektiven Effekt auf vaskuläre Erkrankungen von Interesse [16].

1.2 Flavanole

Vorkommen

Flavanole stammen aus der Gruppe der Flavonoide, sind Derivate des Flavans und finden sich vor allem in Früchten, Gemüse, Kakao, Tee und Kaffee [5,17]. Dabei kann sich der Gehalt, die Art und Bioverfügbarkeit des Flavanols zwischen den einzelnen Pflanzen unterscheiden [5,18]. An einigen Stellen wurde eine mögliche Toxizität von

Flavanolen durch ihre Metabolisierung *in vivo* diskutiert [19]. Diese These ist nicht ganz auszuschließen. Aufgrund der genannten Mechanismen und Unterschiede ist die Aufklärung der genauen Wirkung von Flavanolen *in vivo* ein wichtiger Teil der Forschung. Die Grundstruktur der Flavanole (Abb. 1) beziehungsweise Flavan-3-ole bestehen aus zwei aromatischen Ringen, diese sind über eine zum O-heterozyklischen Ring geschlossene C3-Brücke verbunden.

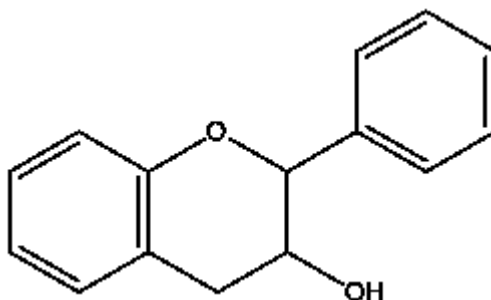


Abb. 1: Flavanol:

Grundgerüst des Flavanols, bestehend aus zwei aromatischen Ringen, verbunden über eine zum O-heterozyklischen Ring verbundene C3-Brücke, auch Flavan-3-ol genannt.

Die Hauptanteile aus der Gruppe der Flavan-3-ole sind Catechine, unter anderem Epicatechin, Catechin, Epicatechingallat, Epigallocatechingallat und Epigallocatechin und deren Oligomere, die Procyanidine [17]. Catechin und Epicatechin sind die mengenmäßig am stärksten vertretenen Flavanole in Kakaoprodukten [5]. In verschiedenen Studien konnte die stereometrische (-) Epicatechinform vor seinen Enantiomeren und den Catechin-Enantiomeren als Flavanol mit der höchsten Absorptionsrate identifiziert werden [20,21].

(-) Epicatechin

In vivo wird (-) Epicatechin im Intestinaltrakt aufgenommen [22,23] und metabolisiert. Wie in klinischen Studien gezeigt, wurde in Hepatozyten von Mäusen Epicatechin sulfoniert, methyliert und glucuronidiert [24] und gelangt von dort in den Blutkreislauf. Nach zwei Stunden konnten maximale Konzentrationen festgestellt werden [21,23]. (-) Epicatechin und seine Metaboliten werden größtenteils über die Niere ausgeschieden [21,22].

Für eine gezielte Anwendung auf dem Gebiet der Medizin ist eine ausreichende Kenntnis der maßgeblichen Substanz und ihrer Wirkungsweise nötig. Schroeter *et al.* (2006) konnten eine vermehrte NO-Bioverfügbarkeit und endothel-abhängige Dilatation nach der Einnahme von flavanolreichem Kakao vor allem auf (-) Epicatechin und seine Metaboliten zurückführen [14]. Aufgrund der protektiven Effekte auf die kardiovaskuläre Gesundheit wurde die Wirkungen von (-) Epicatechin *in vivo* und *in vitro* intensiv studiert. Nach bisheriger Kenntnisnahme deuten sich mehrere Mechanismen der (-) Epicatechin-Wirkung an: Eine gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit, Verringerung von Lipidoxidationsprodukten und die Induktion der antioxidativen Antwort, sowie die Hemmung der NAD(P)H-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)-Oxidase) [14,15,25–29]. Dabei konnte eine Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen beobachtet werden. Dies liegt vermutlich in der *in vivo*-Metabolisierung von Flavanolen begründet. Die Metabolisierung wird nur in wenigen *in vitro*-Studien berücksichtigt. Durch die geringen Plasmakonzentrationen des Reinstoffes bei oraler Gabe werden die *in vitro* verwendeten Konzentrationen nicht durch Nahrungsaufnahme in normalem Blutplasma erreicht. Die Relevanz der Ergebnisse ist somit für eine *in vivo*-Anwendung strittig [21,22,30]. Gleichzeitig scheint die Wirkung von (-) Epicatechin abhängig von einer Kurz- oder Langzeitgabe [31] und von der verwendeten Konzentration zu sein.

Empirisch messbare Effekte auf die vaskuläre Funktion *in vivo*, anhand der FMD (*flow mediated dilatation*) erreichten schon niedrige Dosierungen von 1-2 mg (-) Epicatechin/kg Körpergewicht und korrelierten mit dem Vorhandensein von (-) Epicatechin-Metaboliten im Plasma [14]. Die zelluläre Grundlage der (-) Epicatechin induzierten vermehrten NO-Bioverfügbarkeit [14,15] wurde in der Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase in Koronararterien-Endothelzellen [32] oder in der verminderten Degradation von NO durch O_2^- aufgrund der Hemmung der NADPH -Oxidase in Endothelzellen, vermutet [28].

Eine direkte antioxidative Kapazität von (-) Epicatechin, die es ermöglichen soll ROS zu neutralisieren, wurde kontrovers diskutiert [22,30,33,34]. Die antioxidative Kapazität ist assoziiert mit der Anzahl von Hydroxylgruppen und ihrer strukturellen Beziehung im Molekül, diese wird durch die Metabolisierung verändert. Daraus wurde bereits vermutet, dass (-) Epicatechin *in vivo* durch die strukturellen Veränderungen während

der Metabolisierung sehr wahrscheinlich Teile seiner antioxidativen Kapazität einbüßt [22].

In vitro führte die Behandlung mit (-) Epicatechin von neuronalen Zellen zu einer Induktion der Proteinexpression von antioxidativen Enzymen über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid-2 p45-related factor-2* (Nrf2) [35]. Es liegen zur Wirkung einer oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den Redox- Status und die Enzymexpression der Zellen im Gewebeverband *in vivo* nur unzureichende Daten vor.

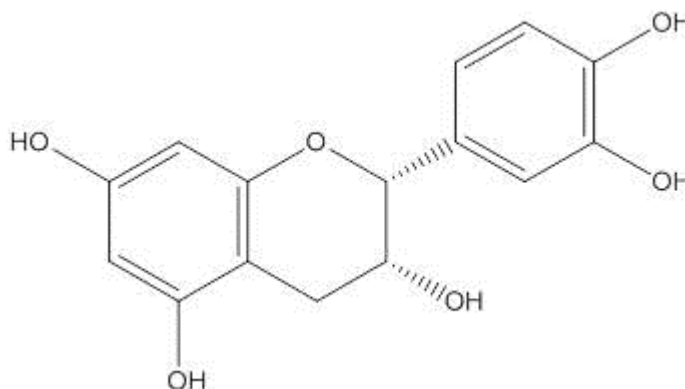


Abb. 2: (-) Epicatechin:

Grundgerüst des Flavan-3-ol mit zwei OH Gruppen (2R, 3R)

1.3 Redox-Status

Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein Peptid bestehend aus Glutamat, Cystein und Glycin. Es ist in allen Säugetierzellen vorhanden und ein wichtiger Teil des Schutzes der Zellen. Glutathion ist ein Antioxidans und steht in Zusammenhang mit dem Redox-Status. Es schützt nicht nur den Körper durch die Neutralisation von ROS, sondern ist auch als Kofaktor beim Entgiftungsstoffwechsel der Zelle und durch Metabolisierung von elektrophilen Verbindungen und Neutralisation/Konjugation von toxischen Metaboliten beteiligt. Besonders wichtig ist es außerdem in Organen der erhöhten Exposition zu Umweltreizen. Dabei sind vor allem die Lunge und der Intestinaltrakt zu nennen, die Kontakt mit der Außenwelt haben und somit verstärkt auch Umwelttoxinen ausgesetzt sind. Es kann außerdem zelluläre Prozesse wie DNA Synthese, Immunantwort und posttranslationale Modifikationen steuern, welche Einfluss auf die Enzymaktivität

haben. Der Anteil an Glutathion in den meisten Zellen ist im millimolaren (mM) Bereich. Es liegt natürlicherweise in seiner reduzierten (GSH)- und oxidierten (GSSG)-Form vor. Glutathion ist ein wichtiges Antioxidans, das die Zelle vor freien Radikalen schützt. Die GSH-Synthese hängt im Wesentlichen von zwei Enzymen ab (Abb. 3). Die Glutamatcysteinylgase (GCL) ist das produktionslimitierende Enzym für die GSH-Synthese und besteht aus zwei Untereinheiten (GCLC/GCLM). Davon besitzt die GCLC katalytische Aktivität, während die andere Untereinheit (GCLM) modulatorisch wirkt. Die Aktivität der GCLC ist entscheidend für die Produktion von Glutathion. Wie beschrieben gemäß DeLeve *et al.* (1991), Lu *et al.* (2009) und Forman *et al.* (2009) [36–38]. Es zeigte sich jedoch: Ist die GCLM in *knock-out* Mäusen nicht funktionsfähig, kommt es *in vivo* zu einer organspezifischen Verminderung des GSH-Gehalts durch Wegfall der modulatorischen Komponente [39]. Die GCL ist als heteromeres Holoenzym somit katalytisch effizienter. Sie reagiert auf Glutathion, im Sinne einer *feedback*-Hemmung, weniger sensibel, als die GCLC-Untereinheit alleine [40,41]. Die Enzymaktivität der GCL kann durch Modulation der beiden Untereinheiten durch posttranslationale Modifikation oder mRNA-Stabilität beeinflusst werden [42]. Verschiedenen Substanzen konnte ein Einfluss auf die Enzymexpression nachgewiesen werden: NO hemmte in *in vitro*-Studien die katalytische Untereinheit GCLC, dieser Effekt erwies sich stark abhängig vom Zelltyp [43].

Der GS-Gehalt der Zellen wird durch die Synthese und Rückgewinnung aus GSSG durch die Glutathion-Reduktase (GR) stabilisiert und reguliert. Die interorganische Homöostase reguliert sich durch den GSH-Plasmaspiegel und die Aufnahme von Glutathion aus dem Blut (GSH *clearance*). Durch ihre Funktion ist die Leber der Hauptproduzent von Glutathion und bestimmt dessen Abgabe ins Blut (GSH-Efflux) [44]. Die GSH-Plasmakonzentration wird dadurch vor allem durch den hepatischen GSH-Efflux und weniger durch den intrahepatischen GSH-Gehalt beeinflusst [44,45]. Verschiedene Substanzen können auf den GSH-Efflux und somit auch auf die Plasmalevel Einfluss nehmen. Zum Beispiel nahm der GSH-Gehalt in der Leber nach Gabe von Ethanol aufgrund einer vermehrten Ausschüttung ab [46]. Vasoaktive Substanzen und phenolische Antioxidantien konnten den Leber GSH-Efflux steigern. Die membranständige γ -Glutamyltransferase (γ GT bzw. GGT) spaltet extrazelluläres Glutathion an der äußeren Plasmazellmembran und stellt seine Komponenten zur Aufnahme und intrazellulären Resynthese von Glutathion zur Verfügung [47]. Die

Lunge und die Niere haben Hauptanteile an der GSH *clearance*. Sie hydrolysieren Glutathion durch ihre reichlich vorhandene GGT und nehmen die Komponenten auf. Diese Erkenntnisse wurden schon mehrfach beschrieben [36,37,44]. Die Lunge nimmt physiologisch einen Hauptanteil ihres benötigten Glutathions aus dem Plasma auf. Die GSH *clearance* aus dem Plasma konnte größer als in der Niere gemessen werden, eine Hemmung der GSH-Synthese oder -Aufnahme führt zu strukturellen Schädigungen, während in der Leber und den Nieren keine Abnormitäten zu beobachten waren [48]. Dies zeigt die besondere Stellung der Lunge in der GSH-Regulation.

Der Redox-Status ist das augenblickliche Verhältnis von Antioxidantien zu Oxidantien und schließt die Gesamtheit aller oxidativen und reduktiven Prozesse von Zellen ein. Änderungen im GSH-Gehalt können oxidativen Stress anzeigen. Die Gewährleistung eines balancierten Redox-Status ermöglicht den physiologischen Ablauf der Zellvorgänge.

Das komplexe System der Signaltransduktion auf Zellebene des Körpers besteht aus ständigen Aufbau-, Abbau- und Anpassungsvorgängen. Endogene Stressoren, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und exogene Stressoren, Xenobiotika, wie Flavanoole, und modulierende Faktoren wie zum Beispiel Glutathion tragen zur Änderung des Redox-Status bei und beeinflussen auf diese Weise zahlreiche Signalkaskaden [49].

Oxidantien

Zu den bedeutendsten Oxidantien zählen die ROS. ROS sind kurzlebige, reaktive Sauerstoffspezies, die durch ihr freies Elektron ein hohes oxidatives Potential besitzen. Zu den ROS zählen neben dem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) auch verschiedene Zwischenprodukte, darunter hauptsächlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanionen (alt: Hyperoxid-Anion) (O_2^-) und Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}^\cdot$) [12].

Zusammenfassend können ROS durch Oxidation ihres Interaktionspartners zu DNA-, Protein-Schäden und Störung von Signalkaskaden führen und sind dadurch nicht nur an der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt [12]. Die Produktion der endogenen ROS erfolgt vornehmlich durch die Mitochondrien, als Nebenprodukt der Zellatmung. Griendling *et al.* (2000) beschrieben den besonderen Anteil der

Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)-Oxidase (NAD(P)H-Oxidase) unter anderem an der Produktion von ROS besonders in vaskulärem Gewebe und in Herzzellen [50].

Neben ihrer schädigenden Wirkung übernehmen ROS auch wichtige *second messenger*-Funktionen bei der antioxidativen Antwort und sind Regulatoren des Redox-Status von Enzymen und Transkriptionsfaktoren [50]. So stimulierte H_2O_2 über den Transkriptionsfaktor Nrf2-Signalweg die GSH-Synthese und reguliert den Redox-Status während der Muskelzelldifferenzierung [51].

Die antioxidative Antwort

ROS-Entgiftung geschieht über die antioxidative Antwort. Ihre Fähigkeit anstelle von anderen Interakteuren speziell mit ROS zu reagieren, ermöglicht es ROS zu neutralisieren, abzubauen und somit zu regulieren und kontrolliert zu nutzen. Die antioxidative Antwort wird durch eine Vielzahl von direkten und indirekten Antioxidantien repräsentiert, darunter Enzyme, Proteinen und Glutathion. Diese synergistisch wirkenden Enzyme eliminieren reaktive Sauerstoffspezies.

Dabei kann zwischen einem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat) (NAD(P)H)-abhängigen und einem NAD(P)H-unabhängigen Schutzsystem unterschieden werden (Abb.3). Die antioxidativen Enzyme Katalase (KAT) und Superoxiddismutase-1 (SOD-1) gehören zu dem NAD(P)H-unabhängigem Schutzsystem. SOD-1 lässt $O_2^{\cdot-}$ zu Wasserstoffperoxid oxidieren, welches im Verlauf von KAT zu Wasser und Sauerstoff abgebaut.

Die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Dehydrogenase, beziehungsweise NAD(P)H Coenzym Q-Oxidoreduktase (*NAD(P)H dehydrogenase [ubiquinone]1* (NQO1)), die Hämoxxygenase-1 (HO-1) und das System der Glutathion-Homöostase sind NAD(P)H-abhängig und zählen zu den indirekt wirkenden Enzymen des Metabolismus/Stoffwechsels der antioxidativen Antwort.

NQO1 katalysiert die Reaktion, über die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol Elektronen von NAD(P)H in die Atmungskette einzuspeisen, somit verhindert es die Entstehung von ROS durch nur eine Elektronenübertragung.

Die HO-1 ist ein wichtiges Enzym für den Porphyrin-Abbau. Sie spaltet Häm, unter Verwendung von NAD(P)H, zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid (CO). Kohlenmonoxid ist an der Signaltransduktion beteiligt [52,53]. Seine Regulation erfolgt durch verschiedene Stimuli, darunter Transkriptionsfaktoren, Hypoxie und oxidativen Stress.

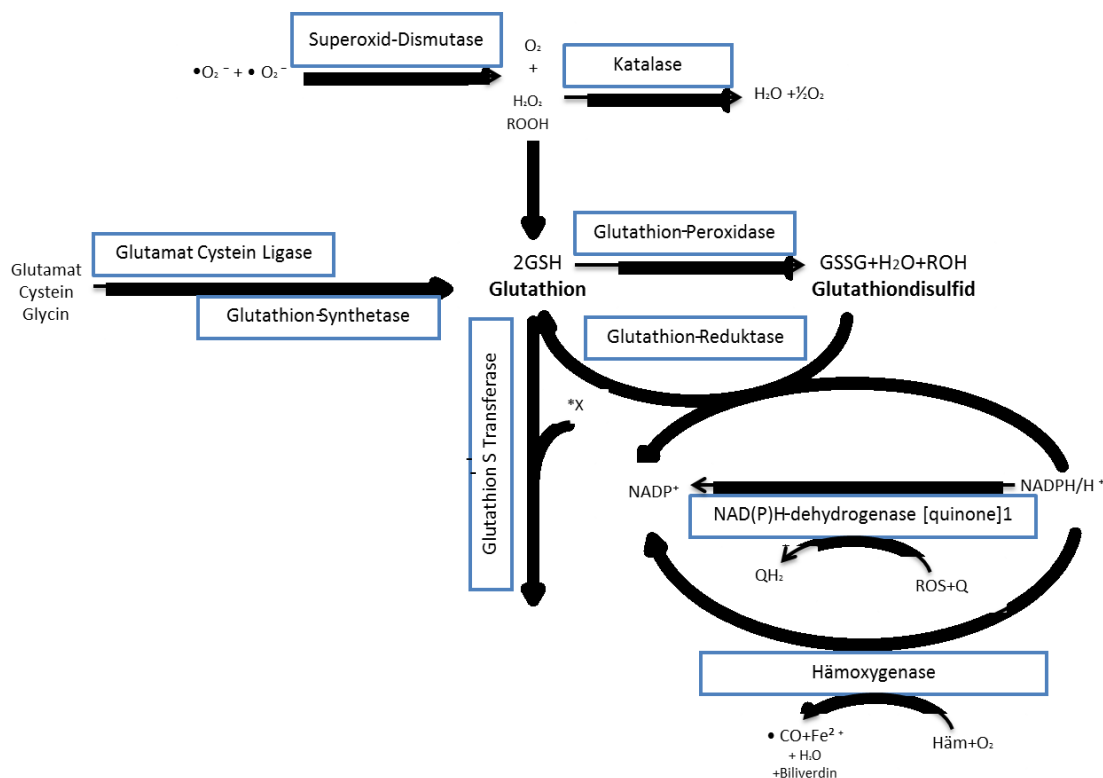


Abb. 3: Die antioxidative Antwort:

Das System der Glutathion-Homöostase bestehend aus Glutathion-Synthese und Glutathion abhängigem Schutzsystem. Die NAD(P)H-abhängigen und unabhängigen Schutzsysteme als Bestandteile des antioxidativen Systems. (ROS=reaktive Sauerstoffspezies, GSH=Glutathion, GSSG=Glutathiondisulfid, *X=glucuronidierende Komponente (toxische/xenobiotische Substanz) Modifiziert nach Wu *et al.* (2004) und Cortese *et al.* (2008) [54,55].

Der Glutathionstoffwechsel bildet das System der Glutathion-Homöostase. Es beinhaltet die Enzyme des Glutathion abhängigem Schutzsystems und der Glutathion-Synthese (Abb. 3).

Das Glutathion-abhängige Schutzsystem besteht aus den Enzymen Glutathion-Peroxidase (GPx) und Glutathion-Reduktase (GR) und Glutathion-S-Transferase (GST). Sie katalysieren Reaktionen mit Glutathion (GSH). GPx benutzt Glutathion zur Reduktion zelltoxischer Verbindungen, indem es zwei Elektronen von zwei GSH Molekülen überträgt, dabei entsteht Glutathiondisulfid (GSSG).

Ein Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG wird durch die GR gehalten, indem sie die Disulfidbrücken in GSSG löst und somit wieder zu GSH reduzieren kann. Das Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG ist stark auf Seite des GSH's. Normalerweise liegt lediglich 1% als GSSG vor. Ein Ungleichgewicht auf Seiten GSSG zeigt oxidativen Stress an. GST verwendet Glutathion bei der Konjugation von toxischen oder xenobiotischen Substanzen [56]. Die GST ist in den Geweben Leber, Lunge und Herz durch verschiedene Isoformen, unter anderem GST mu und pi, exprimiert [57–59].

Die Glutathion-Synthese aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin geschieht in zwei Schritten, katalysiert durch die Enzyme Glutamatcysteinligase (GCL) und Glutathion-Synthetase. Lu *et al.* (2009) beschrieben dabei die GCL als das produktionsentscheidendes Enzym, mit der katalytischen Untereinheit GCLC und der modulatorischen Untereinheit GCLM [37].

Zusammenfassend ist die ROS-Regulation Aufgabe der Schutzmechanismen der antioxidativen Antwort, dazu zählen die Glutathion-Homöostase und das antioxidative System. Eine anpassbare und feinmodulierte Kontrolle der Glutathion-Homöostase und des antioxidativen Systems ist demnach von essentieller Bedeutung.

Oxidativer Stress

Ist die antioxidative Antwort nicht mehr in der Lage ein adäquates Entgiftungssystem aufrecht zu erhalten und die schädigende Wirkung von ROS einzuschränken entsteht oxidativer Stress.

Oxidativer Stress spiegelt allgemein das Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien in einem Organismus wieder, wobei das Gleichgewicht in Richtung Oxidantien verschoben wird und somit den Redox-Status beeinflusst. Es wird ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem Gewebeschäden bei Herzinfarkten angenommen. Dabei spielen die Anfälligkeit und der Umfang der Schädigung durch Hypoxie und postischämischen Reperfusionsschadens eine Rolle [60,61]. Der postischämische Reperfusionsschaden tritt nachiedereinsetzender Durchblutung eines zuvor hypoxischen Gewebes auf. Oxidativer Stress induziert verschiedene Signalwege unter anderem Nrf2 vermittelt. [62]

Signalkaskaden/Adaption des Fremdstoffmetabolismus und Transkriptionsfaktoren

Die kontinuierliche Einwirkung endogener und exogener Faktoren setzt ein System voraus, das in der Lage ist die antioxidative Antwort redoxsensitiv zu steuern um auf oxidativen Stress adäquat zu reagieren. Signalkaskaden gewährleisten die Verarbeitung aller die Zelle betreffenden Informationen gleichzeitig. Sie verstärken Signale, sodass die ankommenden Informationen ihre Wirkung entfalten können und in der Lage sind die Zellreaktionen/-prozesse an die veränderten Zellzustände anzupassen. Ihre Wirkung wird durch Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel *nuclear factor erythroid-2 p45-related factor-2* (Nrf2), Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), Kinasen und ROS als *second messenger*, außerdem posttranslationale Proteinmodifikationen und redoxensitive Moleküle wie Glutathion gesteuert. So können gleichzeitig einlaufende Signale ähnliche oder auch entgegengesetzte Wirkungen haben, wenn das Zellmilieu durch zwischenzeitliche Prozesse verändert wurde. So kann Glutathion vor allem antioxidative Prozesse fördern, jedoch unter bestimmten Bedingungen, wie der Bindung mit NO, auch pro-oxidative Vorgänge bewirken [63]. Die Expression von Antioxidantien und Phase II -Enzymen des Entgiftungsstoffwechsels (*drug metabolism*) kann oxidativem Stress angepasst werden [64].

Die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und *nuclear respiratory factor 1* (Nrf1) zählen zu den redoxsensitiven nukleären Rezeptoren. ROS (physiologische oder in Form von oxidativem Stress) und Xenobiotika, darunter auch Flavanole induzieren durch verschiedene noch nicht vollständig aufgeklärte Prozesse die Spaltung der Transkriptionsfaktoren von ihren Bindeproteinen. Nach der Verlagerung der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und Bindung an DNA-Promotoren werden deren Zielgenen transkribiert. Sie greifen in den Kreislauf der Zellsignale ein und können als Mediatoren wirken.

Der redoxensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 liegt im Zytosol gebunden an Keap1 vor und wird durch das Proteasom S 26 abgebaut. Nach Induktion des Nrf2 Signalweges bindet der Transkriptionsfaktor Nrf2 [65] an der *Antioxidant Response Element* (ARE)-Rezeptorstelle, einer hoch kondensierten Genregion der DNA, an und reguliert die ARE-abhängige Genexpression von Enzymen [62,66]. Das Bindeprotein Keap 1 unterdrückt die Verlagerung von Nrf2 in den Zellkern und infolgedessen die nukleäre

Aktivierung von ARE's [67]. Es wurden verschiedene chemische Substrate identifiziert, die eine Dissoziation von Keap1 und Nrf2 ermöglichen und die Induktion von Phase II - Enzymen einleiten [49]. Verschiedene Mechanismen stehen zur Debatte. Neben der direkten Wirkung von oxidativem Stress an der Bindung Keap1/Nrf2 wurde auch die Oxidation von möglichen reaktiven Cystein Resten in Keap1 diskutiert. Eine solche Oxidation sollte zu Veränderungen in der Proteinstruktur führen und folgend zur Freisetzung von Nrf2 [67].

Der redoxensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 ist ubiquitär vorhanden, zeigt sich jedoch in Geweben mit besonderer Exposition zu ROS am stärksten ausgeprägt, dazu zählen Intestinaltrakt, Lunge, Muskel und Niere [65,66]. Die Enzyme der Glutathion-Homöostase sind Ziele der Regulation durch den Nrf2 Signalweg [51]. In Nrf2 *knockout*-Modell stellte sich eine signifikante Erniedrigung von Phase II antioxidativen Enzymen (NQO1, GST und HO1) und deren katalytischen Aktivität dar [68,69].

Die Induktion einer Wirkung von Nrf2 beruht nicht auf einer vermehrten Transkription, gemessen anhand gleichbleibender mRNA Level bei elektrophiler Exposition [64,69], sondern auf der Regulation von Neusynthese und Abbau. An einigen Stellen wurde schon über eine Wirkung des Transkriptionsfaktors Nrf2 über eine verlängerte Proteinstabilität und somit Akkumulation von Nrf2 spekuliert [42,70]. An anderen Stellen stand ein *cross-talk* zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren im Vordergrund. Speziell zu nennen ist dabei AhR [71].

Der redoxensitive Transkriptionsfaktor *nuclear respiratory factor* 1 (Nrf1) wurde erstmals von Evans *et al.* (1989) [68] beschrieben und hat in seiner Funktion starken Einfluss auf die mitochondriale DNA-Transkription, -Replikation, den Zellzyklus und das Zellwachstum. Letzteres, so Roy *et al.* (2009), hat einen Stellenwert in der Entstehung von Brustkrebs, Diabetes mellitus Typ 2 und kolorektalen Karzinomen [72]. In Neuronen reguliert Nrf1 die Gene des Cytochrom C 57 und wurde durch HO-1 aktiviert, dies zeigt seine Verbindung zum Metabolismus und den Enzymen NQO1 und HO1 [52]. Nrf1 wird zusätzlich durch den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert [52].

1.4 Effekte von (-) Epicatechin auf ROS, oxidativen Stress, Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren, Antioxidantien und Redox-Status

Flavanolreiche Ernährung hat positive Effekte auf die Gesundheit. (-) Epicatechin ist einer der Hauptbestandteile von Kakao [17]. Die positiven Effekte könnten auf (-) Epicatechin zurückführbar und somit bei ausschließlicher Gabe reproduzierbar sein.

Eine Stimulation der körpereigenen antioxidativen Antwort bewirkte (-) Epicatechin *in vitro* durch die vermehrte Expression von Phase II-Enzymen. Epicatechin steigerte in HepG2 Zellen die Verlagerung von Nrf2 in den Zellkern und induzierte über verschiedene Signalwege (*mitogen-activated protein kinases* (MAPK)/*extracellular signal-regulated kinases* (ERK), Phosphoinositid 3-Kinasen (*phosphatidylinositol 3-kinase*) (PI3K)/ Serin/Threonin Kinase Akt, bzw. Protein Kinase B (PKB) (AKT)) die Translokation und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 [73]. Besonders die Regulation der antioxidativen Antwort zeigt eine zytoprotektive Wirkung von Epicatechin auf HepG2 Zellen [74] und Astrozyten [75]. Dabei wurden Konzentrationen im micro- bis nanomolaren Bereich eingesetzt. Konzentrationen dieser Größenordnung konnten unter physiologischen Bedingungen auch in einer klinischen Studie erzielt werden [23]. Zu berücksichtigen bleibt zusätzlich der Effekt der *in vivo*-Metabolisierung von Epicatechin.

In *in vivo*-Versuchen beeinflusst (-) Epicatechin die Infarktgröße und den myokardialen ischämischen Reperfusionsschaden im Rattenmodell [31,61] und zeigte in diabetischen Ratten eine Induktion der antioxidativen Antwort [26].

Klinisch konnte als Hauptfaktor der protektiven Wirkung von Flavanolen NO-vermittelte Effekte beobachtet werden. Diese Effekte wurden anhand der *flow mediate dilatation* (FMD), einem Marker für die vaskuläre Funktion, gemessen. Eine Veränderung der *flow mediated dilatation* wurde nach oralen (-) Epicatechin-Gabe beobachtet [14,15].

Es ist noch unklar, welchen Einfluss die orale Gabe auf die Organe hat. Bisher fehlen in der klinischen Anwendung weitere Studien zu den physiologischen Auswirkungen auf gesunde Organgewebe.

2. Ziel der Arbeit

In klinischen Studien konnten bei flavanolhaltigen Nahrungsmitteln, wie Kakao, Früchten und Wein, eine protektive Wirkung auf Herz-Kreislaufkrankungen nachgewiesen werden. Die verantwortlichen Mechanismen werden besonders in der Regulation der antioxidativen Proteine (z.B. GSH und Enzyme der antioxidativen Antwort) und der NO-Bioverfügbarkeit durch Flavanole vermutet.

Das Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, die Veränderungen des GSH-Gehaltes und der antioxidativen Antwort bei oraler (-) Epicatechin-Gabe *in vivo* im Mausmodell zu untersuchen. Die alleinige Substitution von (-) Epicatechin ermöglicht dabei einen Ausschluss von Nebenfaktoren und Wechselwirkungen. Bisher wurden oben genannte Mechanismen in kultivierten Zelllinien *in vitro* untersucht [75–77]. In den meisten Fällen wird dabei die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung der Flavanole im Organismus nicht berücksichtigt. Klinisch wurde eine vermehrte NO-Bioverfügbarkeit nachgewiesen, aber die Auswirkungen auf die antioxidative Antwort und den GSH-Gehalt *in vivo* bleiben unklar. In dieser Arbeit sollen aus diesem Grund die *in vivo* Effekte der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt und die antioxidative Antwort im *wildtyp*-Mausmodell untersucht werden. Sie soll eine Ergänzung zu einem besseren Verständnis der protektiven Wirkung von Flavanolten bilden. Ein Vorteil: Durch die orale Gabe werden alle durch die Metabolisierung physiologisch anfallenden (-) Epicatechin-Metaboliten berücksichtigt. Zusätzlich wird eine Konzentration verwendet, die auch schon in klinischen Untersuchungen einen Effekt erzielte. Außerdem können die verschiedenen Organe und die Enzyme der antioxidativen Antwort untereinander verglichen werden.

Zu diesem Zweck wird nach fünftägiger oraler (-) Epicatechin Gabe in Herz, Lunge und Leber der GSH Gehalt gemessen werden. Zur Feststellung einer Wirkung auf die antioxidative Antwort werden die Proteinexpressionen der GPx, GR, GST mu und pi, als Teil des Glutathionstoffwechsels, GCL mit ihrer katalytischen und modulatorischen Untereinheit (GCLM und GCLC), als Teil der Glutathion-Synthese und KAT, SOD-1, NQO1 und HO-1, als Teil des NAD(P)H-unabhängigen und abhängige Schutzsystem untersucht.

Daneben wird die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Nrf2 evaluiert. Bei einem Effekt in der Regulation der antioxidativen Antwort durch Flavanole, in diesem Fall (-) Epicatechin, wird die Signalvermittlung über den Transkriptionsfaktor Nrf2 diskutiert [73,78]. Eine Beteiligung weiterer redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren, z.B. Nrf1, wird bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt und durch Messung der Proteinexpressionen von Nrf1 untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Antikörper

Tabelle 1: Antikörper

Primär Antikörper	ID	Verdünnung		
		Herz	Lunge	Leber
<i>Anti-Glutathione Peroxidase 1</i>	(ab22604)	1:300	1:300	1:300
<i>Anti-Glutathione S Transferase mu</i>	(ab108524)	1:4000	1:2000	1:5000
<i>Anti-GST3/GST pi</i>	(ab53943)	1:500	1:500	1:700
<i>Anti-Glutathion Reduktase</i>	(ab16801)	1:2500	1:2500	1:2500
<i>Anti-GCLM</i>	(sc22754)	1:200	1:200	1:200
<i>Rabbit polyclonal to GCLC</i>	(ab41463)	1:400	1:200	1:500
<i>Rabbit polyclonal to Superoxide Dismutase 1</i>	(ab13498)	1:5000	1:5000	1:10000
<i>Anti- Catalase</i>	(ab1877)	1:10000	1:10000	1:10000
<i>Anti-NQO1</i>	(ab2346)	1:250	1:250	1:250
<i>Rabbit polyclonal to Heme Oxygenase 1</i>	(ab13243)	1:250	1:250	1:250
<i>Anti-α Tubulin</i>	(ab4074)	1:5000	1:5000	1:5000
<i>Anti-Nrf2</i>	(sc-722)	1:200	1:200	1:200
<i>Anti-Nrf1</i>	(sc-33771)	1:1000	1:400	1:400

Die primären Antikörper wurden erworben bei Acam, Cambridge, USA (ab) und Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg, Deutschland (sc).

Tabelle 2: Sekundär Antikörper (Verdünnung 1:5000)

<i>Fab Anti-RABBIT IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated (811-1320)</i>
<i>Fab Anti-MOUSE IgG (H&L) (GOAT) Antibody Peroxidase Conjugated (811-1320)</i>

Die sekundären Antikörper wurden erworben bei ROCKLAND (Gilbertsville, PA)

Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen I

Aqua dest.	Millipore, Darmstadt, Deutschland
<i>Bovine serum albumin (BSA)</i>	Sigma, St. Louis, USA
<i>Deoxycholic acid sodium salt</i>	(Fluka-SIGMA-Aldrich™)
<i>Dimethyl sulfoxide (DMSO)</i>	Sigma, St. Louis, USA
<i>Dodecylsulfat *NaCl (SDS)</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
(-) Epicatechin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Hybond P Membran</i>	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>MagicMark™ XP Western Protein Standard</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
Methanol	Merck, New York, USA
<i>Milchpulver- Blotting grade</i>	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid (0,9%)	Braun, Melsungen, Deutschland
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® MES running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Transfer Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Tris-acetate running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	PAA, Pasching, Österreich
Ponceau S Lösung	Sigma, St. Louis, USA

Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen II

<i>Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail</i>	Halt™ Thermo Scientific Pierce Protein Research Prod. Merck, New York, USA
Rompun (10 mg/kg Körpergewicht)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (HCl)	Sigma, St. Louis, USA
<i>Sodium chloride</i> (NaCl)	Merck, New York, USA
<i>Sulfo Salicylic Acid (SSA)</i>	Merck, New York, USA
Trinkwasser für Mäuse	San Benedetto, San Benedetto, Italien
<i>Trishydrochlorid</i>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Tween®20 for molecular biology</i> (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate)	Sigma, St. Louis, USA

Verbrauchs- und andere Materialien**Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien**

Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml (<i>Safe-Lock Tubes</i>)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Futter	<i>Sniff standard mice diet</i>
Mikrofilter	Millipore, Eschborn
NuPAGE® Novex Gel 10% Bis-Tris Mini Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Novex Gel 7% Tris-acetate Mini Gel	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>XCell SureLock™ Mini Cell</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>XCell II™ Blot Module Kit</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 6: Assays

DC™ Protein Assay	BioRad, Hercules, USA
<i>Glutathione Fluorescent Detection Kit</i> <i>DetectX®</i> (KOO6-F5)	Arbor Assay, Ann Arbor, Michigan (USA)
<i>SuperSignal® West Femto</i> <i>Chemiluminescent Substrate (CS)</i>	Pierce, Bonn, Deutschland
<i>SuperSignal® West Pico CS</i>	Pierce, Bonn, Deutschland

Geräte

Tabelle 7: Geräte

<i>2100 Chip Bioanalyzer</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
<i>FLUOstar Omega Fluorescence Intensity - including FRET</i>	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
<i>ImageQuant LAS 4000</i>	GE Lifesciences, Little Chalfont, UK
<i>Infrared light source</i>	Beurer, Ulm, Deutschland
KG -Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. Schwabach, Deutschland
MS 1 Minishaker IKA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Operationsbesteck	FST, Heidelberg, Deutschland
Operationstisch für Nager	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Perfusionspumpe	Isma Tec, Glattbrugg, Schweiz
Reagenzglasschüttler (444-1372)	VWR, West Chester USA
<i>TissueRuptor (+TissueRuptor Disposable Probes)</i>	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Zentrifuge Micro 200 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 38 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Software

Tabelle 8: Software

Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond USA
GraphPad Prism 5 bzw. 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Image J	Rasband, ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/ , 1997-2015.
MARS Analyse Software	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
IBM SPSS Statistics 18	IBM Corporation, Armonk, USA

Versuchsaufbau

Die Experimente dieser Arbeit wurden zur Beantwortung der Frage nach einem Einfluss der oralen (-) Epicatechin auf antioxidative Proteine *in vivo* vorgenommen. Zu antioxidativen Proteinen zählen neben GSH, auch Enzyme der antioxidativen Systems, KAT, SOD-1, NQO1, HO-1. Der GSH-Gehalt wird durch die GSH-Homöostase (GPx, GR, GST mu und pi, GCLM, GCLC) bestimmt. Die Organe wurden auf ihren GSH-Gehalt und die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion-Homöostase und des antioxidativen Systems untersucht (Abb. 4).

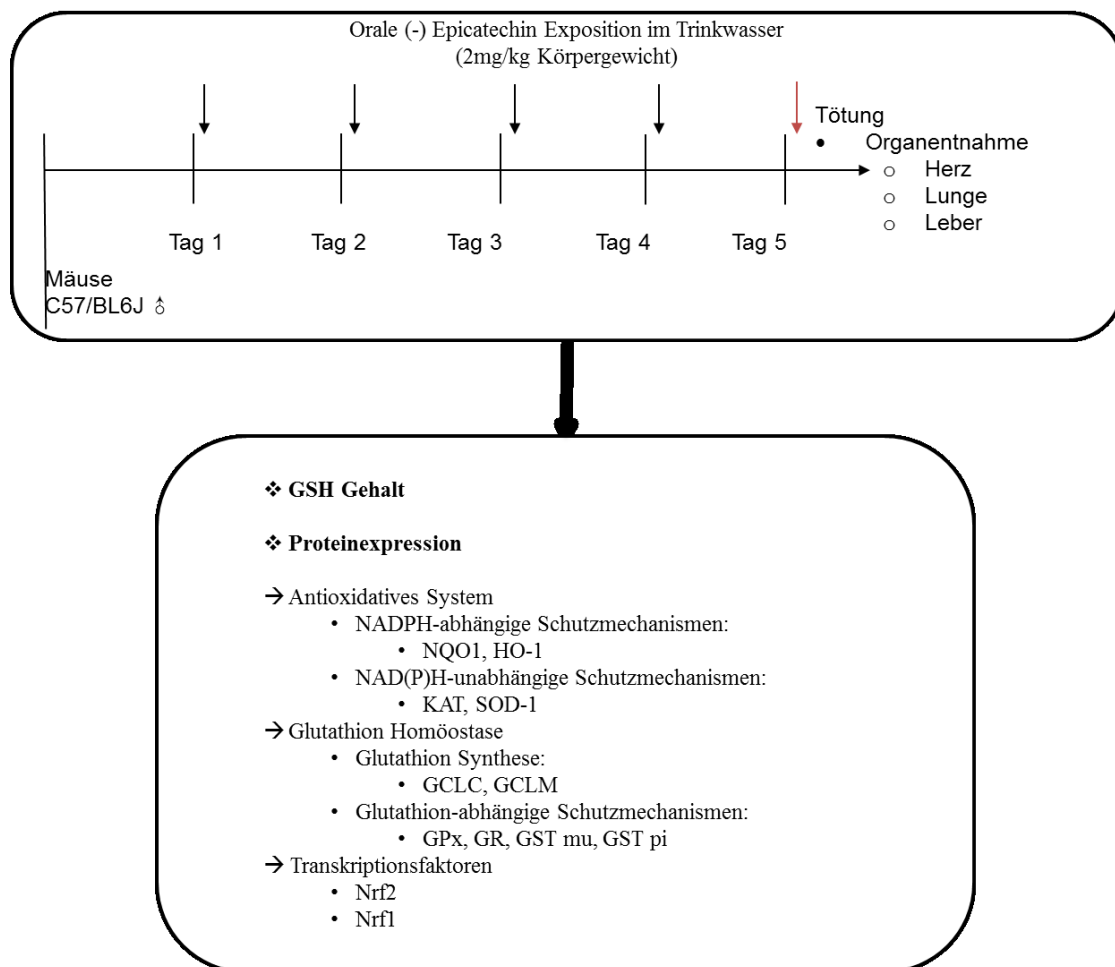


Abb. 4: Versuchsaufbau: Zur Analyse der systemischen Wirkung von (-) Epicatechin auf die antioxidativen Proteine in den Organen Herz, Lunge und Leber.

Im Tierversuch mit männlichen Mäusen vom Stamm C57/BL6J wurde nach 4-tägiger oraler (-) Epicatechin -Gabe von 2 mg/kg Körpergewicht im Trinkwasser die Tötung mit anschließender Organentnahme vorgenommen. Die Proben wurden auf die Auswirkungen der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt und die antioxidative Antwort untersucht. Es wurde dazu die Proteinexpression der betreffenden Enzyme untersucht. (GPx= Glutathion-Peroxidase, GST mu/GST pi= Isotypen mu und pi der Glutathion-S-Transferase, GR= Glutathion Reduktase, GCLM/GCLC= modulatorische/katalytische Untereinheit der Glutamatcysteinligase, SOD-1= Superoxiddismutase-1, KAT= Katalase, NQO1= NAD(P)H Dehydrogenase 1, HO1= Hämoxygenase-1, GSH=Glutathion)

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelles

Alle durchgeführten Experimente standen im Einklang mit dem Tierschutzgesetz und wurden nach den vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) anerkannten Richtlinien der Tierversuchs-Verordnung des US Nationalen Instituts für Gesundheit durchgeführt. Die Experimente waren Teil der Projekte mit der Tierversuchsgenehmigung, Aktenzeichen der Bezirksregierung 047/90 TO und G227-11.

Die Tiere waren Teil des Flavanol-Projekts: Die verwendeten Proben stammen aus einem Versuch, der die Auswirkung auf die vaskuläre Funktion, darunter die Fluss vermittelte Dilatation (FMD) nach einer oralen Langzeitbehandlung im (-) Epicatechin-Mausmodell untersucht. Die Untersuchungen wurden von den in der Versuchsgenehmigung angegebenen Personen an männlichen Wildtypmäusen vom Stamm C57/BL6J (Janvier SAS Le Genest, Frankreich oder Tierversuchsanlagen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen in Gruppenhaltung zwischen 5-8 in Makrolonschalen-Käfigen in der Tierversuchsanlage Düsseldorf im Klima-Schrank bei Raumtemperaturen zwischen 19-21°C und Luftfeuchtigkeit von 50-60% (*humidified atmosphere*) bei einem Tag/Nacht Zyklus von 12 Stunden gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Sie erhielten eine Standarddiät (SNIFF, S.P.A, Italy, niedrig im Gehalt an NO_3^- und NO_2^-) und Zugang zu NO_3^- und NO_2^- -armen Trinkwasser (S. Benedetto Wasser), bei täglichem Wasserwechsel. Die Tiere konnten sich akklimatisieren. Insgesamt umfasste der Versuch 20 Tiere ($N_{\text{Gesamt}}=20$). Für den chronischen Langzeit-Versuch mit 2 mg/kg Körpergewicht wurden die Tiere in zwei Gruppen, Kontrolle und (-) Epicatechin, von jeweils 10 Tieren unterteilt. Das im Trinkwasser substituierte (-) Epicatechin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde als Stocklösungen auf Basis 70%-igen Ethanol zum Erreichen der Konzentration von 100 mM (29 mg/ml) angesetzt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten die gleiche Stocklösung im Trinkwasser ohne (-) Epicatechin. Bei einer durchschnittlichen täglichen Trinkmenge von fünf Milliliter pro Tier wurde den Mäusen (-) Epicatechin über fünf Tage kontinuierlich mit dem Trinkwasser zugeführt (Abb. 4). Die Substitution

mit (-) Epicatechin hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht oder die Trinkgewohnheiten der Mäuse.

Vor der Tötung wurde Ketamin (100 mg/kg) und Rompun (10 mg/kg) körpertgewichtsadaptiert intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die spätere Tötung zur Organentnahme erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Die Sicherstellung der Wirkung wurde nach einigen Minuten über Setzen eines Schmerzreizes getestet und falls nötig zusätzlich Ketamin appliziert. Im Folgenden wurde die Maus für den Versuch des Flavanolprojektes vorbereitet und mit Klebeband an allen vier Extremitäten auf eine Plastikschielle fixiert, woran sich die Organentnahme anschloss.

Die Organentnahme erfolgte schematisch, nach gleichem Vorgehen. Schräge Schnitte (Strabismusschere) bis in die Achseln eröffneten das Abdomen und den Thorax, wobei das Sternum mit einer Pinzette fixiert wurde. Nach Durchtrennen der Hohlvene perfundierte gekühlte (4°C) PBS Lösung das Herz von der Herzspitze aus, bis die Lungen und die Leber entfärbt waren und der Kreislauf von Blut ausgewaschen war. Die Organe Herz, Lunge und Leber wurden dieser Reihe nach entnommen, in jeweils ein Eppendorf-Röhrchen überführt, sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Mäuse wurden vorschriftsgemäß entsorgt.

3.2.2 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden (GSH Assay/ELISA)

Lyse der Gewebeproben

Die auf Eis platzierten Gewebeproben von Herz, Lunge und Leber wurden nach Zugabe von 500 µl kalter, 0,9% NaCl Lösung mit Hilfe des *Tissue Ruptors* dreimal 10 Sekunden lang zerkleinert und im Wasserbad sonifiziert. Zur Normierung der Proben auf 100 mg/ml erfolgte eine gewichtsadaptierte Verdünnung von 250 µl des Gewebelysats mit 0,9% NaCl-Lsg. Nach 15-minütiger Zentrifugation, bei 4°C mit 14000 rpm, Abnahme des Überstandes. Die Proben wurden für Western Blot-Analysen und ein GSH Assay verwendet und dementsprechend für die weiteren Experimente aufgeteilt. Zur Analyse der Proteine aus den Gewebeproben wurden die Proteine aufgereinigt.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Angabe des Herstellers DC Protein Assay Kits von Bio-Rad (München, Deutschland). Die Gewebeproben lagerten für den gesamten Versuch auf Eis. Die Proben wurden mit Lysebuffer (entsprechend *radio immunoprecipitations assay* Lyse-Buffer + *Protease and Phosphatase Inhibitor* für Western Blot und HCl für GSH Assay) verdünnt um einen Vergleich mit der Standardreihe gewährleisten zu können. Die Standardreihe wurde nach oben genanntem Schema aus einer 2mg/ml BSA-Stocklösung hergestellt. Die Proben und Standardreihe erfolgt in Doppelbestimmung.

Es inkubierten 5 µl des Proteinlysats der Gewebeproben nach Zugabe von 250 µl der zur Verfügung gestellten Assay-Arbeitslösung A, 15 min. bei Raumtemperatur mit anschließender Messung der Absorption bei 740 nm. Die Auswertung erfolgt unter Berücksichtigung der Verdünnung auf Grundlage der Standardkurve mit der MARS Analyse Software (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland).

Glutathionbestimmung

Die GSH-Bestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Arbor Assay Kit, Michigan, USA). Zur Feststellung des Redox-Status in Leber, Lunge und Herz wurden die entnommen Organe von WT C57/BL6J anhand der Fluoreszenzmessmethode des DetectX® Fluorescent Detection Kit (Arbor Assays, Michigan, USA) auf ihren quantitativen Glutathion-Gehalt untersucht. Die freien und totalen GSH-Menge in den Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle wurden bestimmt. Die Gruppengröße entsprach jeweils N=10.

Der Überstand des Homogenats wurde 1:1 mit 0,2 M HCl versetzt und sorgfältig durchmischt. Zur Fällung der Proteine erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens an eiskaltem 5%-igem SSA (*sulfo salicylic Acid*) und 10-minütige Inkubation bei 4°C mit anschließender Zentrifugation 10 min bei 4°C und 14000 rpm zur Entfernung der ausgefällten Proteine. Der Überstand mit Assay-Buffer 1:2,5-fach auf eine 1%-ige SSA Lösung verdünnt, Assay-Buffer wurde auch zu weiteren Verdünnungsschritten benutzt. Nach Vorgaben des DetectX® *Fluorescent Detection Kit* (Arbor Assays, Michigan, USA) wurde der GSH Gehalt der Proben gemessen. Die Bestimmung der Glutathion-Menge erfolgte mit Hilfe eines nicht- fluoreszierenden Moleküls, welches kovalent an

die freie Thiolgruppe des GSH's bindet und ein hoch fluoreszentes Produkt aktiviert. Die Proben wurde mit Arbeitslösung durchmischt und GSH nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, im *FLUOstar Omega Fluorescence Intensity* (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bei 510 nm mit einer Exzitation bei 390 nm gemessen. Über die Zugabe einer weiteren Arbeitslösung wurde das gesamte vorhandene GSSG in GSH während einer weiteren 15-minütigen Inkubation umgewandelt mit folgender erneuter Messung des totalen GSH's. Die erhaltenen Werte wurden mittels 4-Parameter Fit mit der MARS Analyse Software (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) ausgewertet. Die Darstellung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) und den im Protokoll angegebenen Auswertestrategien.

Western Blot Analyse

Alle Materialien, inklusive der Western Blot Minikammern XCell SureLock wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA) erworben und nach Anweisungen des Herstellers gebraucht.

RIPA (*radio immunoprecipitations assay*) Lyse-Buffer wurde zur Denaturierung der Proteine für den Western Blot verwendet und frisch angesetzt, es enthielt 1% NP40, 0,5% Desoxycholate sodium, und 1% SDS in PBS gelöst. Nach 30 Sekunden vortexen und sonifizieren wurde die Lösung 15 Minuten bei 4°C, 14000 rpm zentrifugiert und bei 4°C gelagert. Die Endlösung wurde mit dem Proteaseinhibitor (1:100 Verdünnung) immer frisch vor der Verwendung angesetzt. Das Gewebehomogenat wurde 1:1 mit 2-fach RIPA+1:100 -Proteaseinhibitor versetzt und sorgfältig vermengt. Die mit RIPA+PPI versetzten Gewebeproben inkubierten zwei Stunden bei 4°C im Kühlraum auf einem Drehrad. Nach dreimaligem Vortexen, Zentrifugation bei 4°C 20 Minuten und 12000 rpm erfolgte die Abnahme des Überstandes. Die Lagerung erfolgte nach Abnahme eines Aliquot zur Proteinbestimmung bei -20°C. Das Extrakt der Gewebeproben lag bei 100 µg Protein für die Leber, 80 µg Protein für das Herz und 20 µg Protein für die Lunge (siehe Proteinbestimmung). Es wurde jeweils mit NuPAGE *LDS sample buffer* (1:4), NuPAGE *sample reducing agent* (SRA) (1:3) und dem entsprechenden Volumen an H₂O Milipore für ein Endvolumen von 30 µl/Kammer versetzt. Die Proben denaturierten 10 Minuten bei 95°C und lagerten danach kurz auf

Eis bis zum Auftragen in 10%-igem NuPAGE Novex Bis-Tris Gele/MES-Buffer (Proteinnachweis <50 Kilodalton (kDa)) oder 7%-igem NuPAGE Novex Tris Acetat Gel/TrisAcetat Puffer (Proteinnachweis >50 kDa). Bei N=8 Proben wurden jeweils zwei Gele und folgend zwei Membranen erstellt. Neben den Proben wurde als Proteingrößenmarker 5 µl MagicMark XP (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Die Positivkontrolle stellten humane Nabelschnurgefäßendothelzellen (HUVEC-*human umbilical vein endothelial cells*) bei Herz- und Lungengewebeproben und humane hepatozellulären Karzinom-Zellen (HepG2-*human hepatocellular carcinoma cells*) bei Lebergewebeproben (PromoCell, Heidelberg, Deutschland). Die auf das Gel geladenen Positivkontrollen hatten eine Proteinkonzentration von jeweils 30 µg. Die Laufdauer bei 130 V war 60 Minuten.

Es wurden die Proteine der Glutathion-Homöostase, GPx, GR, GST mu und pi, GCLM und GCLC, sowie die Proteine des antioxidativen Systems, KAT, SOD-1, NQO1 und HO-1 detektiert. Die Proteine wurden per Elektrotransfer, eine Stunde bei 30 V, in 10% Methanol 1x NuPAGE Transferbuffer (Invitrogen) auf eine Asham Hypond-P Membran (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) übertragen. Zur Kontrolle der Transfereffektivität fixierte die Membran in PoceauS. Die Membran blockte über Nacht oder alternativ zwei Stunden bei Raumtemperatur in 5% nicht-fetter Milch in T-TBS (*Tris buffered saline with Tween®20*: 0,1% Tween in TBS; TBS: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) und wusch anschließend 15 Minuten mit 1xTBS. Die Membran inkubierte eine Stunde mit einem primären Antikörper (3% oder 5% Milch/T-TBS, verschiedene Verdünnungen, vgl. Tabelle 1Tabelle 1). Es folgte dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit 1xT-TBS und anschließende Inkubation mit einem sekundär *horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit* oder *rabbit anti- goat* Antikörper, bei einer Verdünnung von 1:5000 in *blocking* Puffer (3% oder 5% Milch/T-TBS) für eine Stunde mit wiederholten dreimaligem 10-minütigem Waschen in T-TBS (Western Blot Handbuch von Abcam empfohlen, 2011). Zur Proteinladekontrolle, *loading control*, wurde α Tubulin, 1:5000 verdünnt, verwendet. Die Messung der immunoreaktiven Banden erfolgte mittels Chemilumineszenz. Zeitabhängig inkubierte die Membran eine Minute mit Super Signal Lösung (West Femto oder West Pico, Pierce, Bonn, Deutschland) auf Codak Filmpapier (Pierce, Bonn, Deutschland) und anschließender Entwicklung. Später wurde dieser Vorgang durch *ImageQuant LAS 4000* (GE Lifesciences, Little Chalfont, UK) ersetzt. Die Western Blot Filme wurden eingescannt bzw. mit Hilfe des *ImageQuant LAS 4000* (GE Lifesciences, Little

Chalfont, UK) als Bild/Geldatei (Photoshop/tiff/Bmp/jpg) gespeichert. Die weitere Quantifizierung/densitometrische Auswertung der Western Blot Banden erfolgte mit dem Programm Image J (Rasband, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015). Die Darstellung der ermittelten Daten erfolgte, nach Normierung auf α Tubulin und Kontrollproben, in GraphPad Prism5 bzw. 6.

3.2.3 Statistische Auswertung

GSH

Statistische Analysen wurden in SPSS 18 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt. In der statistischen Auswertung wurde eine deskriptive Statistik aufgestellt mit der Probenmenge N=20 (N=10 pro Gruppe), Messdaten wurden als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben, falls nicht anders beschrieben und im Balkendiagramm dargestellt. Das Durchführen des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (K-S-Test) diente der Kontrolle auf Normalverteilung. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde ein zweiseitiger *Student's t-Test* für unabhängige Stichproben durchgeführt. Aufgrund der kleinen Stichprobe (N=10 pro Gruppe) wurde außerdem als nonparametrischer Test, der Mann-Whitney U Test angefügt. Die statistische Signifikanz wurde bei einem Niveau von $*p < 0,05$ definiert.

Western Blot

Zur statistischen Analyse der Daten wurde GraphPad Prism 5 bzw. 6 (AD instruments, El Paso, USA) verwendet. In der statistischen Auswertung wurden die densitometrischen Daten der mit (-) Epicatechin behandelten Proben und Kontrollproben aus Image J auf α Tubulin normiert. Die Daten wurden mittels Boxplot dargestellt. Die Probenmenge betrug N=16 (N=8 pro Gruppe).

Für alle untersuchten Proteinexpressionen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Der *Student's t-Test* zeigte, zweiseitig getestet, bei einem Wert von $p < 0,05$ eine signifikante Veränderung an.

4. Ergebnisse

4.1 Nach oraler (-) Epicatechin-Gabe induzierte Änderung des GSH Gehaltes

Student's t-Test

Der GSH-Gehalt in den Organen wurde durch die orale (-) Epicatechin-Gabe in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Nach Anwendung des *Student's t-Test*, zeigten sich organspezifische Änderungen (Tabelle 2).

Tabelle 9: GSH Gehalt in den Geweben Herz, Lunge und Leber nach oraler (-) Epicatechin Gabe

Der GSH-Gehalt ist nach (-) Epicatechin-Gabe in der Lunge erhöht und in der Leber verringert. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit und ohne (-) Epicatechinexposition in der Leber festgestellt werden. Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei $p < 0,05$

	Kontrolle MW+SD ($\mu\text{mol/g}$)	(-) Epicatechin MW+SD ($\mu\text{mol/g}$)	T(x)	Signifikanz ($p < 0,05$), zweiseitig getestet
Herz	$1,987 \pm 0,19$	$1,92 \pm 0,22$	$t(18)=0,76$	$p=0,457$
Lunge	$6,65 \pm 1,19$	$10,38 \pm 4,07$	$t(10,536)=-2,78$	$p=0,19$
Leber	$15,18 \pm 1,52$	$9,76 \pm 3,49$	$t(17)=4,48$	$p=0,0003$

(MW= Mittelwert, SD= Standardabweichung, T(x)= Freiheitsgrade, GSH Glutathion, (-) Epicatechin 2mg/kg Körpergewicht)

Aufgrund der kleinen Stichprobengrößen wurde zusätzlich jeweils ein Mann-Whitney U-Test zur Überprüfung der Ergebnisse durchgeführt. Im Mann-Whitney U-Test bestätigten sich die Ergebnisse des *Student's t-Tests*.

Im Herzen lag keine Signifikanz vor, $U=44$, $z=-0,454$, $p=0,65$.

Die Auswertung zeigte beim GSH-Gehalt der Lunge im Gegensatz zum *Student's t-Test* eine Signifikanz, $U=16$, $z=-2,57$ und $p=0,01$.

In der Leber war die statistische Auswertung signifikant: $U=7$, $z=-3,103$ und $p=0,002$ waren.

GSH-Gehalt im Herzen

Der GSH-Gehalt im Herzen änderte sich nicht unter oraler (-) Epicatechin-Gabe.

Die GSH-Menge war nicht signifikant kleiner oder größer als bei der Kontrollgruppe (Abb. 5).

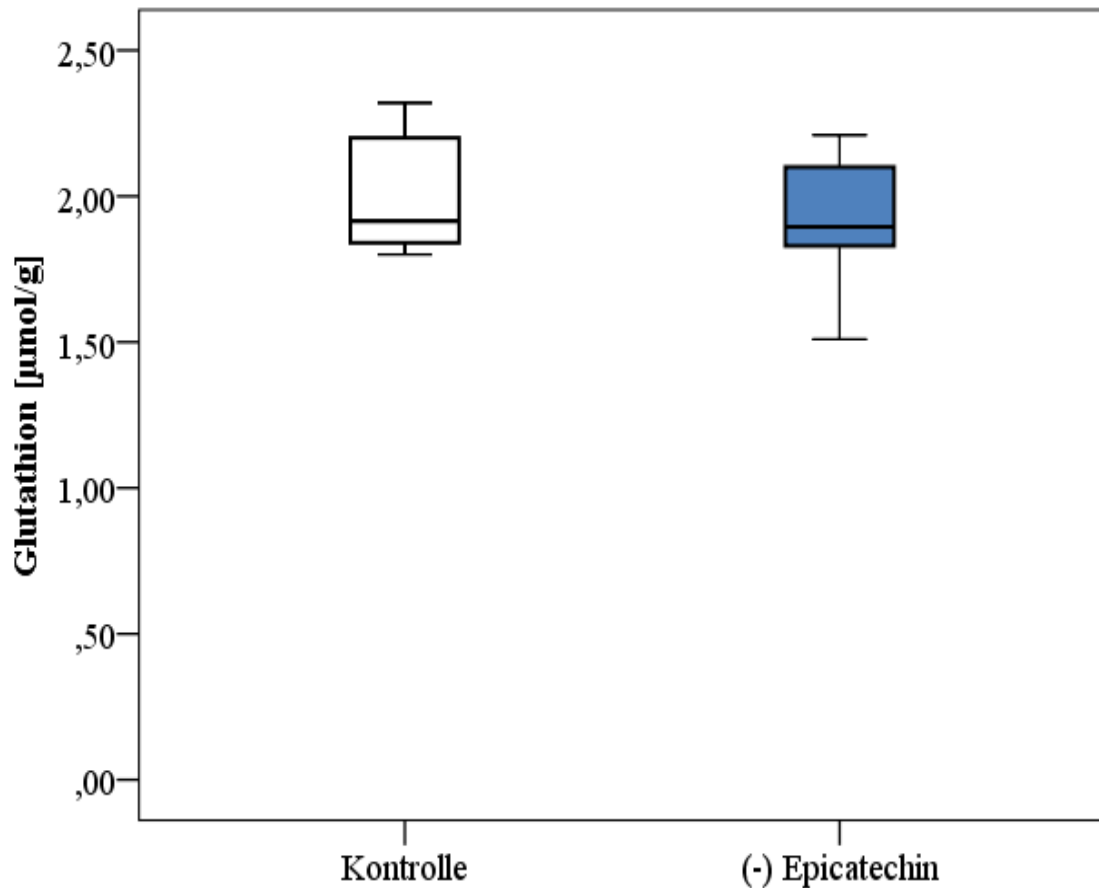


Abb. 5: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt im Herzen

Nach *in vivo*-Exposition von (-) Epicatechin (2mg/kg Körpergewicht) fand keine Regulation des GSH-Gehaltes im Herzen statt. Die statistische Auswertung ergab im Histogramm und im K-S-Test normalverteilte Daten für die GSH-Messwerte (Daten nicht aufgeführt). Gemessen wurde der GSH-Gehalt in [μmol/g], Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei $*=p<0,05$. (GSH=Glutathion).

GSH-Gehalt in der Lunge

Unter oraler (-) Epicatechin-Gabe konnte ein höherer GSH-Gehalt in der Lunge gemessen werden (Abb. 6).

Aufgrund der Probenmenge wurde zusätzlich ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Dort stellte sich dieser Unterschied signifikant dar.

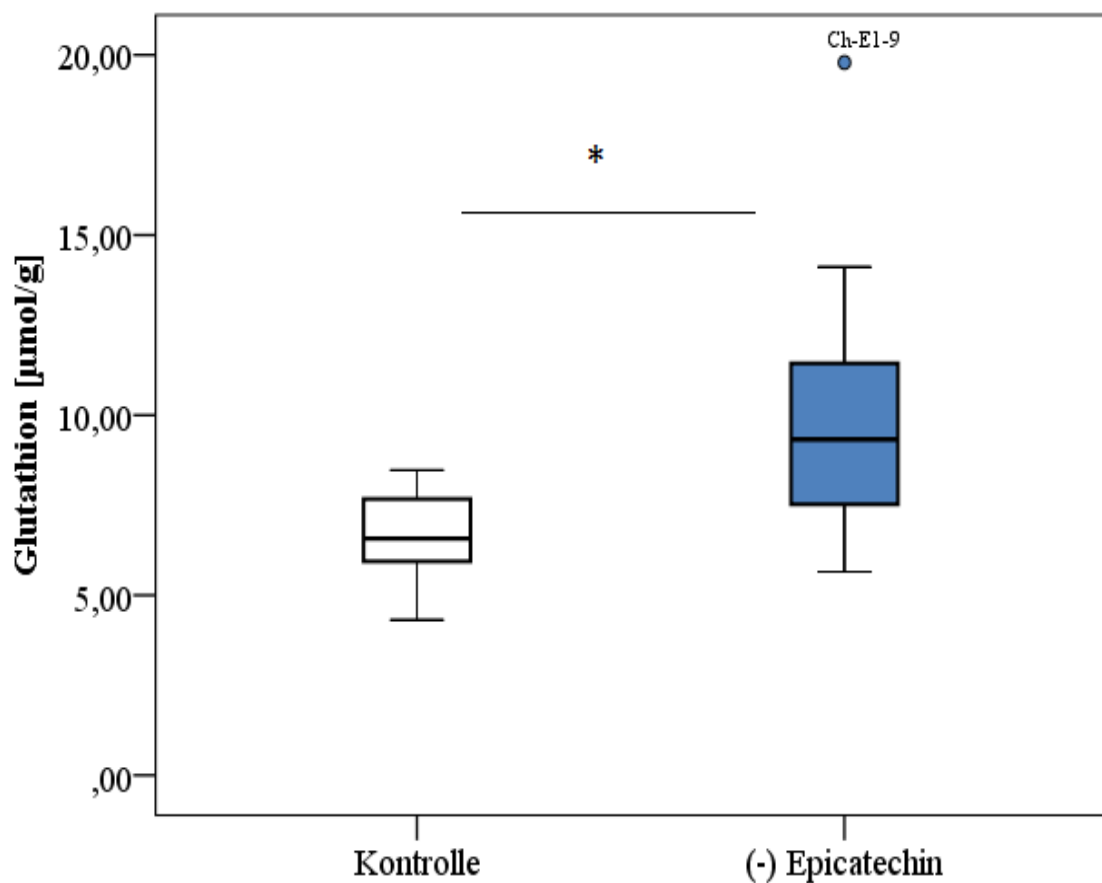


Abb. 6: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt in der Lunge

Nach *in vivo*-Exposition von (-) Epicatechin (2mg/kg Körpergewicht) fand eine signifikante Regulation mit Steigerung des GSH-Gehaltes in der Lunge statt. Die statistische Auswertung ergab im Histogramm und im K-S-Test normalverteilte Daten für die GSH-Messwerte (Daten nicht aufgeführt). Gemessen wurde der GSH-Gehalt in [µmol/g], Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei *=p<0,05. (GSH=Glutathion, °= Ausreißer, Probe).

GSH-Gehalt in der Leber

In der Leber von Mäusen sank der GSH-Gehalt signifikant unter der oralen (-) Epicatechin-Gabe (Abb. 7).

Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe zeigte sich außerdem in der Gruppe der oralen (-) Epicatechin-Gabe eine breitere Streuung der Ergebnisse.

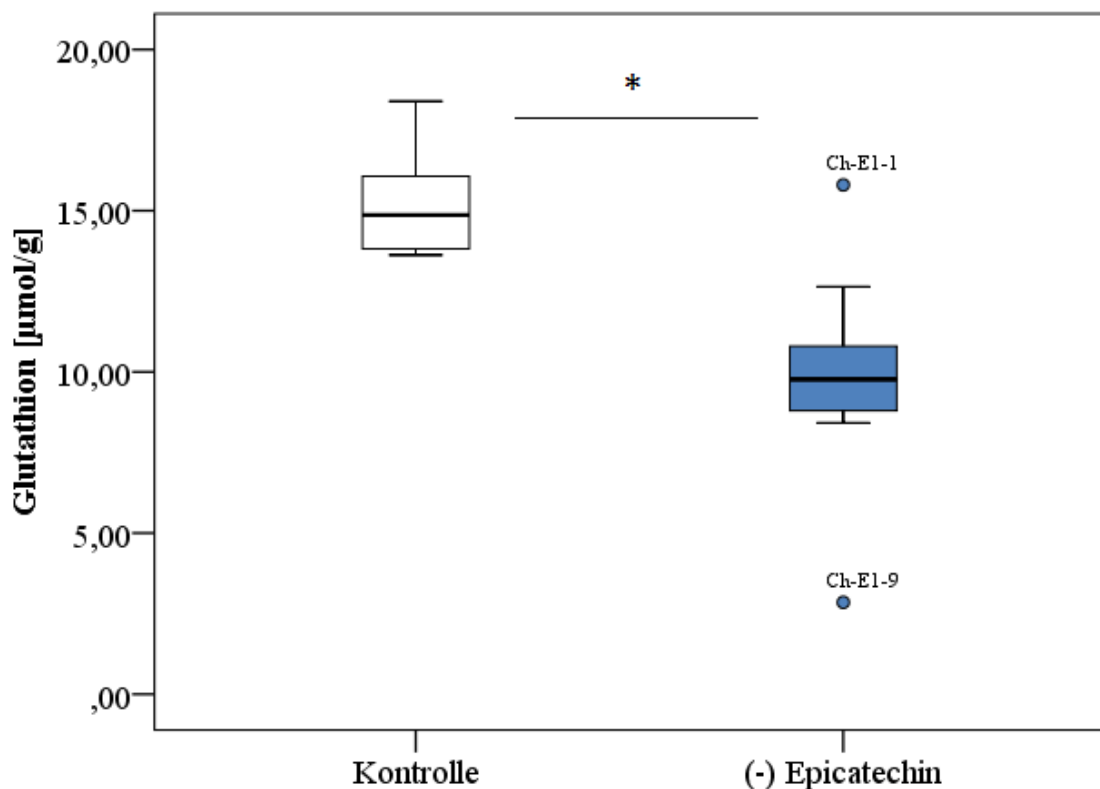


Abb. 7: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf den GSH-Gehalt in der Leber

Nach *in vivo*-Exposition von (-) Epicatechin (2 mg/kg Körpergewicht) fand eine Regulation mit signifikanter Senkung des GSH-Gehaltes in der Leber statt. Die statistische Auswertung ergab im Histogramm und im K-S-Test normalverteilte Daten für die GSH-Messwerte (Daten nicht aufgeführt). Gemessen wurde der GSH-Gehalt in [µmol/g], Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei $*=p<0,05$. (GSH=Glutathion, °= Ausreißer, Probe)

4.2 Nach oraler (-) Epicatechin-Gabe induzierte Änderung der Proteinexpression der Enzyme der antioxidativen Antwort

Herz

Die Western Blot Analyse der Proteinexpressionen der Enzyme der antioxidativen Antwort, welche zur Glutathion-Homöostase gehören, im Herzen.

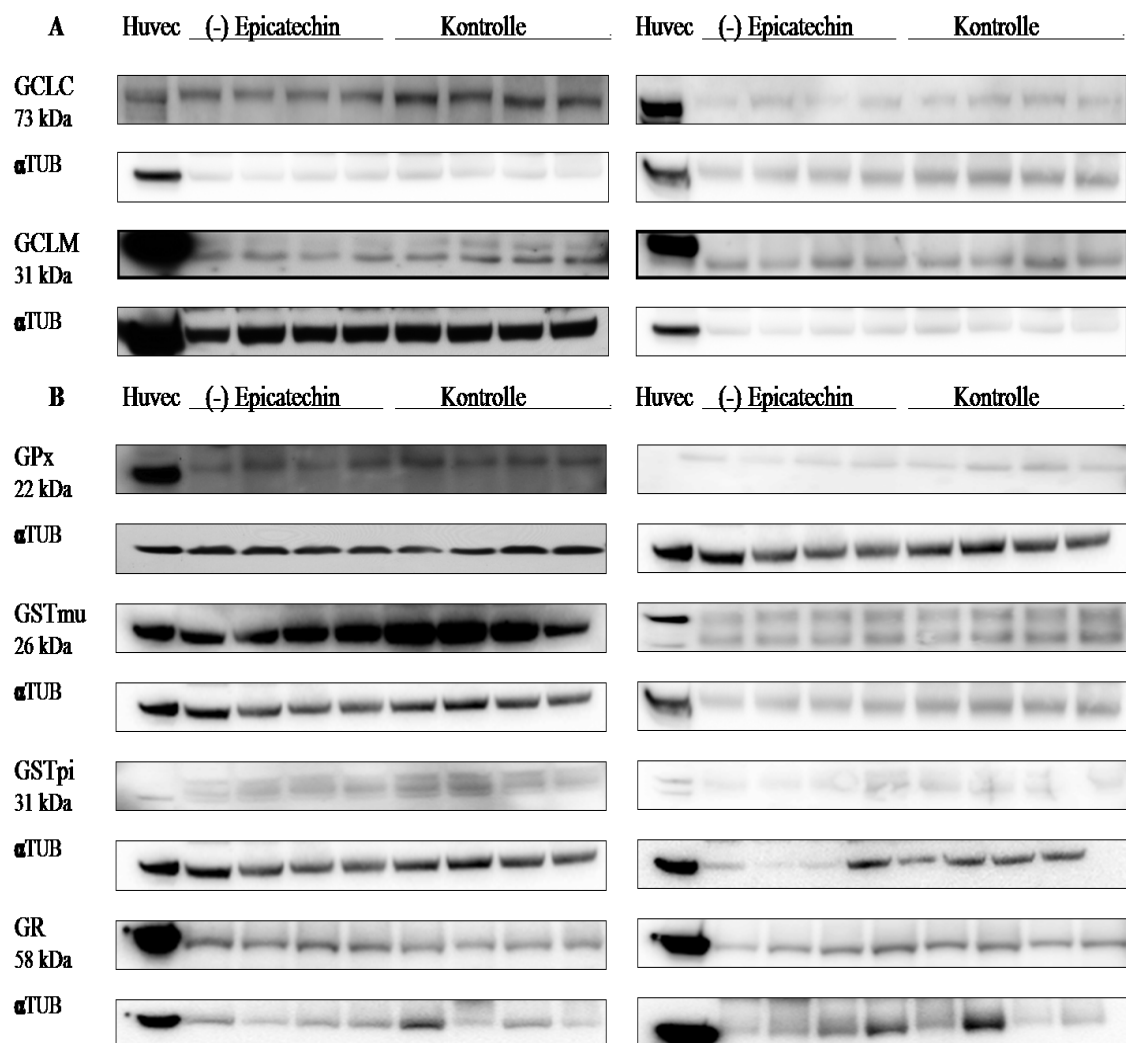


Abb. 8: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion-Homöostase im Herzen

Die Proben wurden in der Western Blot Analyse in zwei Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle mit α Tubulin als *loading control* aufgetragen. (A) Western Blot Analyse der Glutathion-Synthase. (B) Western Blot Analyse des Glutathion abhängigen Schutzsystems. (HUVEC= *human umbilical vein endothelial cells*, (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50 kDa), GPx= Glutathion-Peroxidase, GST mu/GST pi= Isotypen mu und pi der Glutathion-S-Transferase, GR= Glutathion-Reduktase, GCLM/GCLC= modulatorische/katalytische Untereinheit der Glutamacysteinligase) Verdünnungen siehe Tabelle 1.

In der densitometrischen Auswertung zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Proteinexpression der GCLM und GCLC in der mit oraler (-) Epicatechin-Gabe behandelten Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Interessanterweise zeigte sich im Herzen, nach gepaarter Analyse im zweiseitigen *Student's t-Test*, dass die Untereinheiten der GCL, GCLM und GCLC reguliert wurden (Abb. 8) (Abb.9). Dies steht im Gegensatz zum unveränderten GSH-Gehalt.

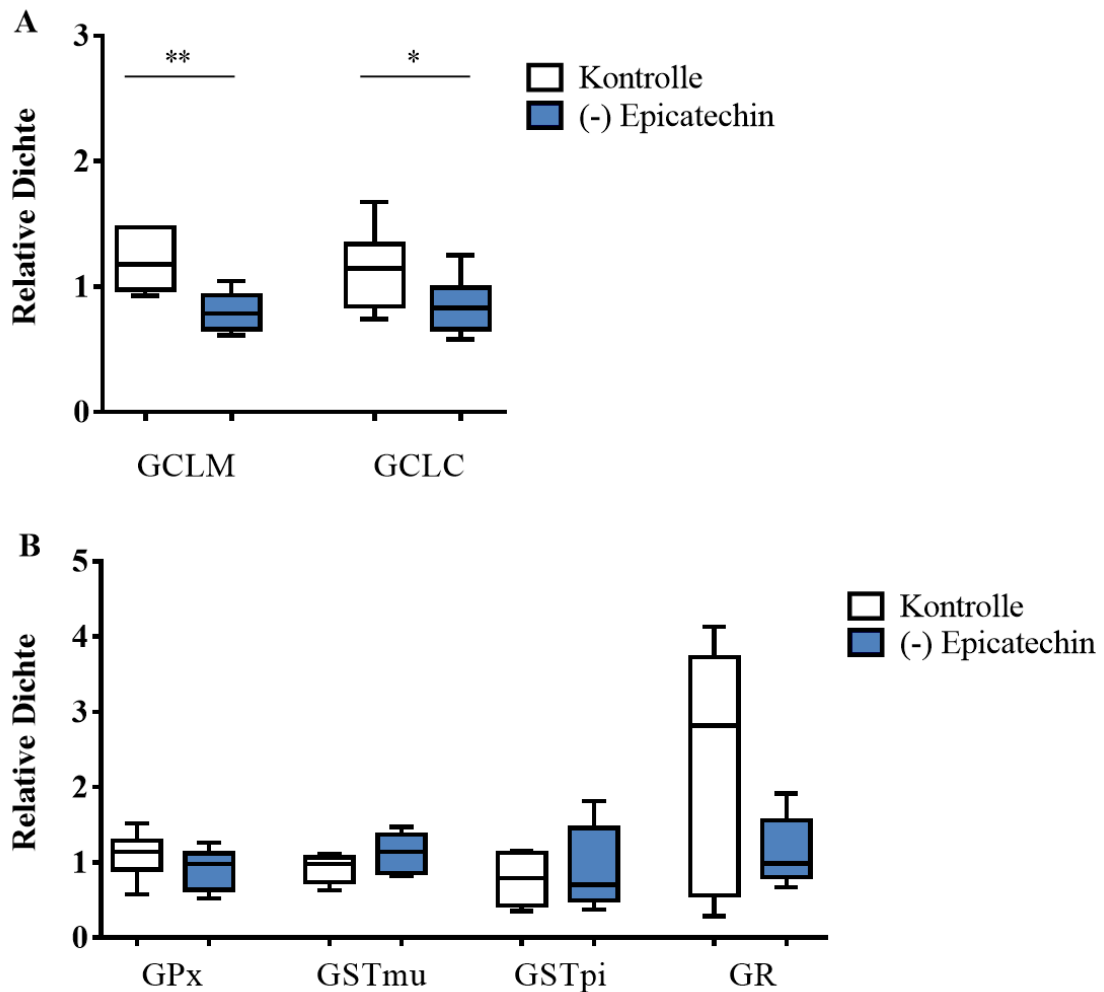


Abb. 9: Densitometrische Auswertung der Glutathion-Homöostase im Herzen

Die Western Blot Analyse wurde mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die (-) Epicatechin- und Kontrollproben wurden mit Hilfe von α Tubulin normiert und mittels Boxplot dargestellt. (A) Western Blot Analyse der Glutathion-Synthese. (B) Western Blot Analyse des Glutathion abhängigen Schutzsystems. (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, GPx= Glutathion-Peroxidase, GST mu/GST pi= Isotypen mu und pi der Glutathion-S-Transferase, GR= Glutathion-Reduktase, GCLM/GCLC= modulatorische/katalytische Untereinheit der Glutamatcysteinligase; Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei $*=p<0,05$.)

Die Western Blot Analyse der Proteinexpressionen der Enzyme der antioxidativen Antwort, welche zum NAD(P)H abhängigen und unabhängigen System gehören, im Herzen: NQO1 und HO-1 im NADPH abhängigen und KAT und SOD im NAD(P)H unabhängigen System.

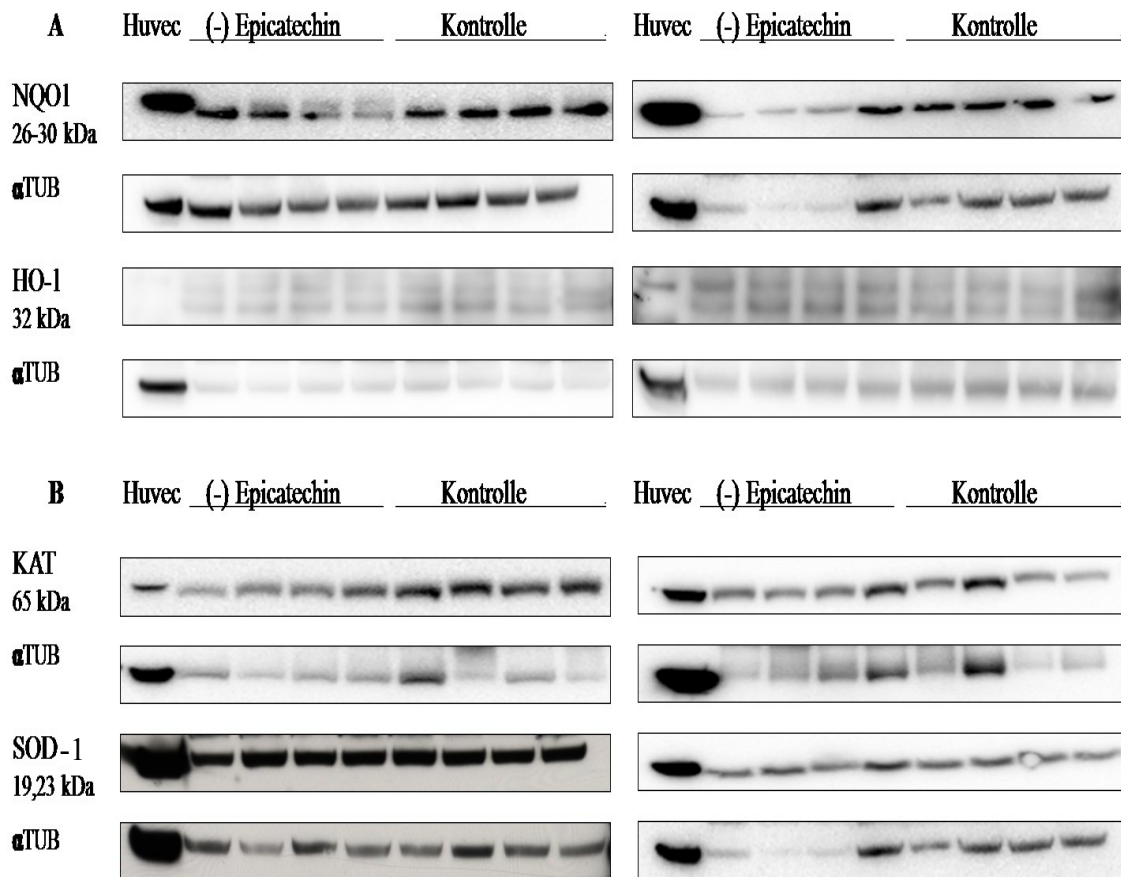


Abb. 10: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme des antioxidativen Systems im Herzen

Die Proben wurden in der Western Blot Analyse in zwei Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle mit α Tubulin als *loading control* aufgetragen. (A) Western Blot Analyse des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems. (B) Western Blot Analyse des NAD(P)H unabhängigen Schutzsystems. (HUVEC= *human umbilical vein endothelial cells*, (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50 kDa), SOD-1= Superoxiddismutase-1, KAT= Katalase, NQO1= NAD(P)H Dehydrogenase 1, HO1= Hämoxygenase-1) Verdünnungen siehe Tabelle 1.

In der densitometrischen Auswertung zeigten, nach der Normierung auf α Tubulin, die Enzyme des NAD(P)H abhängigen Systems, NQO1 und HO-1, im *Student's t-Test* keine signifikante Änderung.

Die normierte Proteinexpression der SOD-1 des NAD(P)H unabhängigen Systems zeigte ebenfalls keine signifikante Regulation. Die Proteinexpression der KAT hingegen wurde im Vergleich zur Kontrolle nach (-) Epicatechin-Gabe signifikant erniedrigt. Im Vergleich mit den (-) Epicatechinproben zeigte die Kontrollproben eine breitere Streuung (Abb. 10) (Abb. 11).

In der Western Blot Analyse wurde nach Färbung mit HO-1 Antikörpern ein weniger starkes Signal detektiert als bei den anderen Antikörpern. Dieser Unterschied spiegelte sich in der densitometrischen Auswertung wieder. Die Werte der normierten Daten zeigten eine breite Streuung für die Proteinexpression der HO-1.

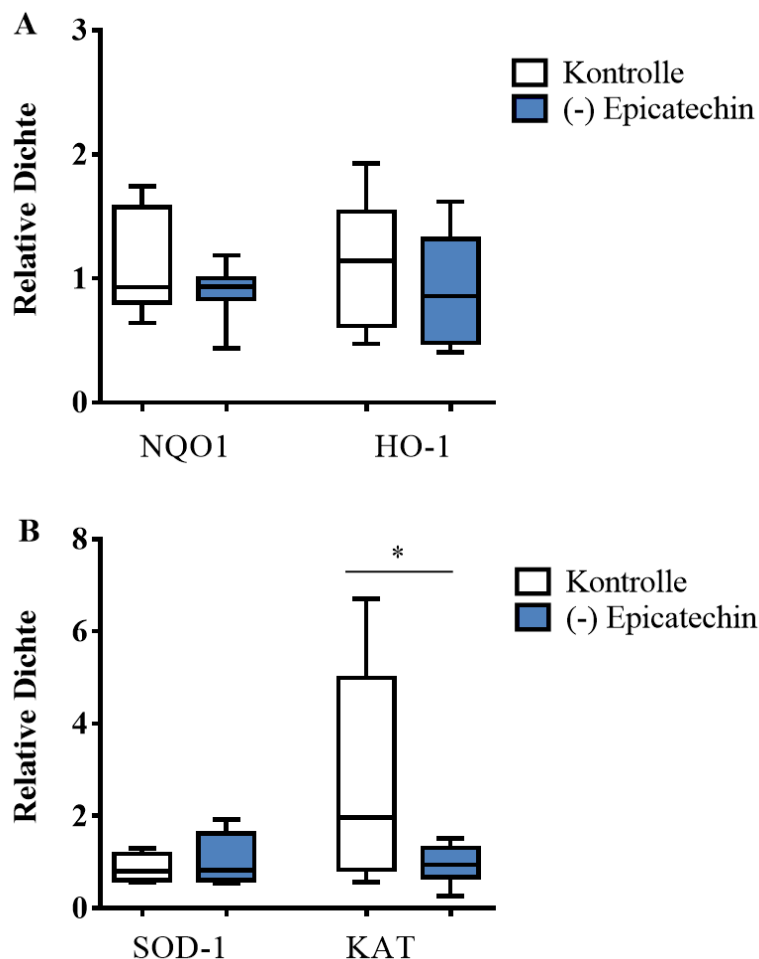


Abb. 11: Densitometrische Auswertung Enzyme des antioxidativen Systems im Herzen

Die Western Blot Analyse wurde mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die (-) Epicatechin- und Kontrollproben wurden mit Hilfe von α Tubulin normiert und mittels Boxplot dargestellt. (A) Western Blot Analyse des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems, NQO1 und HO-1. (B) Western Blot Analyse des NAD(P)H unabhängigen Schutzsystems, SOD-1 und KAT. ((-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, SOD-1= Superoxiddismutase-1, KAT= Katalase, NQO1= NAD(P)H Dehydrogenase 1, HO1= Hämoxygenase-1; Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei $*=p<0,05$.)

Lunge

Die Western Blot Analyse der Proteinexpression der Glutathion Homöostase in der Lunge.

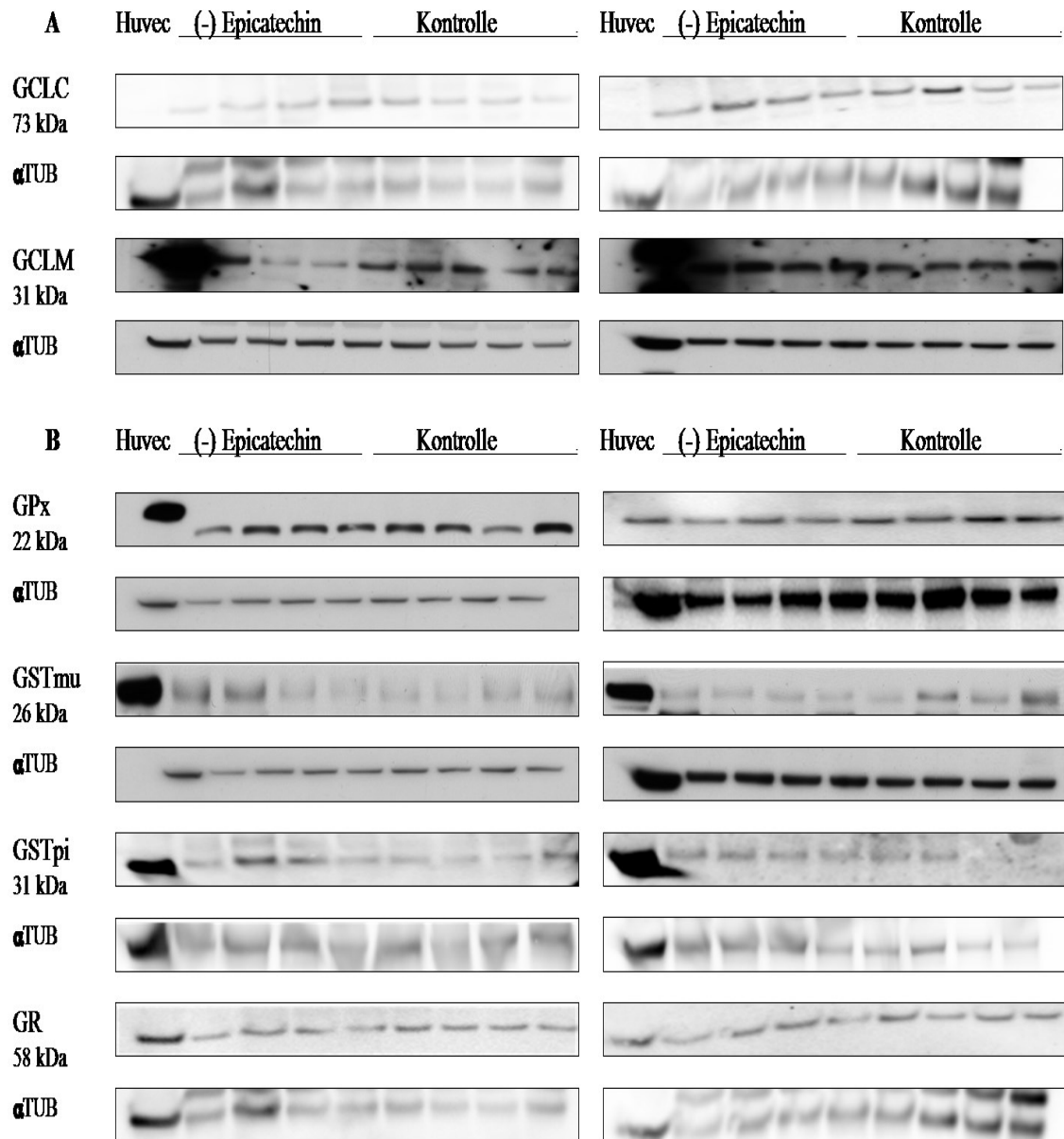


Abb. 12: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion-Homöostase in der Lunge

Die Proben wurden in der Western Blot Analyse in zwei Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle mit α Tubulin als *loading control* aufgetragen. (A) Western Blot Analyse der Glutathion Synthese. (B) Western Blot Analyse des Glutathion abhängigen Schutzsystems. (HUVEC= *human umbilical vein endothelial cells*, (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50 kDa), GPx= Glutathion-Peroxidase, GST mu/GST pi= Isotypen mu und pi der Glutathion-S-Transferase, GR= Glutathion-Reduktase, GCLM/GCLC= modulatorische/katalytische Untereinheit der Glutamatcysteinylase) Verdünnungen siehe Tabelle 1.

In der Lunge wurden nach der densitometrischen Auswertung die Enzyme der Glutathion-Homöostase, GCLM, GPx, GST mu und GR durch die orale (-) Epicatechin-Gabe nicht signifikant beeinflusst (Abb. 12) (Abb. 13).

Die GCL Untereinheiten, GCLC zeigte eine tendenzielle Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die GST Isoform pi, von den Enzymen des GSH abhängigen Schutzsystems wurde nach (-) Epicatechin-Gabe signifikant hochreguliert (Abb. 13).

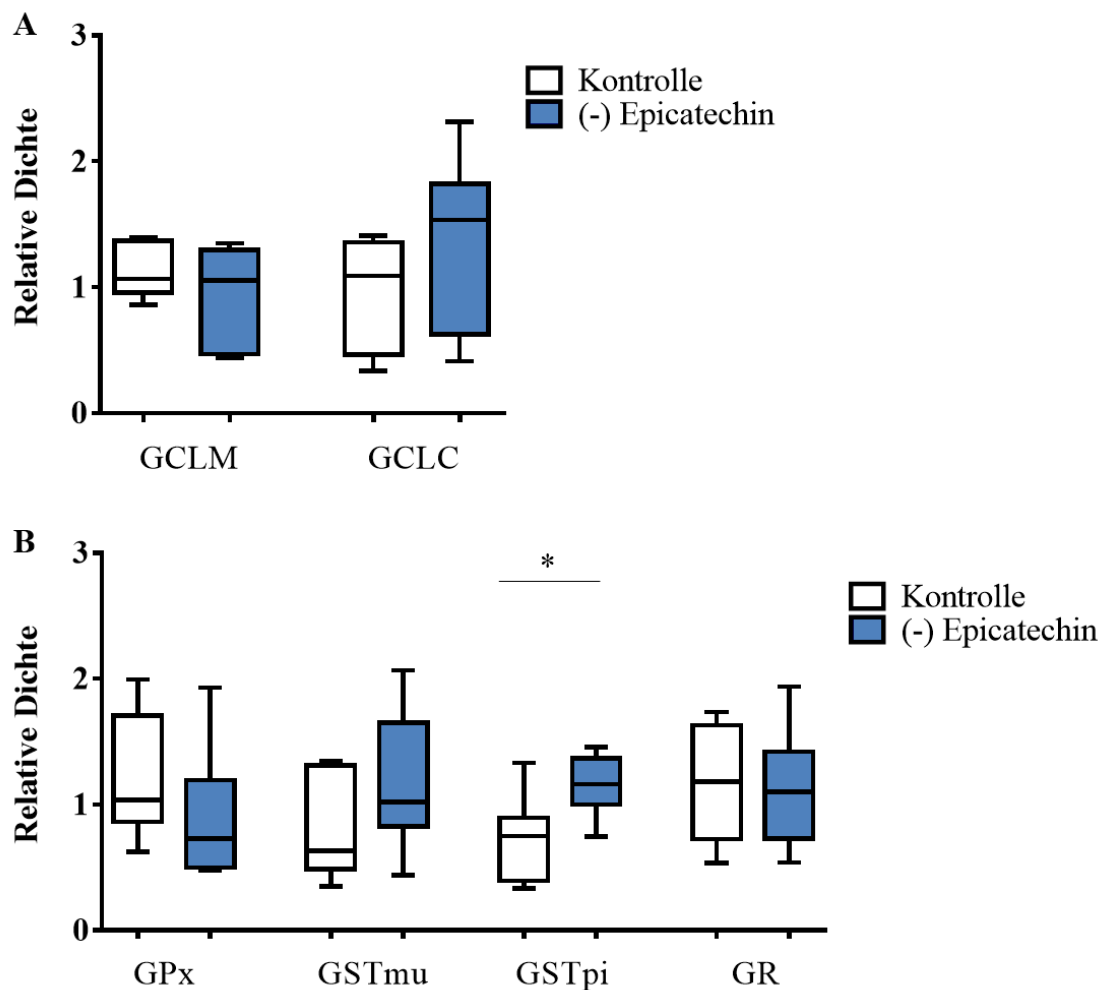


Abb. 13: Densitometrische Auswertung der Glutathion-Homöostase in der Lunge

Die Western Blot Analyse wurde mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die (-) Epicatechin- und Kontrollproben wurden mit Hilfe von α Tubulin normiert und mittels Boxplot dargestellt. (A) Western Blot Analyse der Glutathion-Synthese. (B) Western Blot Analyse des Glutathion abhängigen Schutzsystems. (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, GPx= Glutathion-Peroxidase, GST mu, GST pi= Isotypen mu und pi der Glutathion-S-Transferase, GR= Glutathion-Reduktase, GCLM/GCLC= modulatorische/katalytische Untereinheit der Glutamatcysteinligase; Mittelwertvergleich anhand des Student's *t*-Test von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei *= $p < 0,05$).

Die Western Blot Analyse der Proteinexpressionen der Enzyme der antioxidativen Antwort, NQO1 und HO-1 im NAD(P)H abhängigen und KAT und SOD im NAD(P)H unabhängigen System in der Lunge.

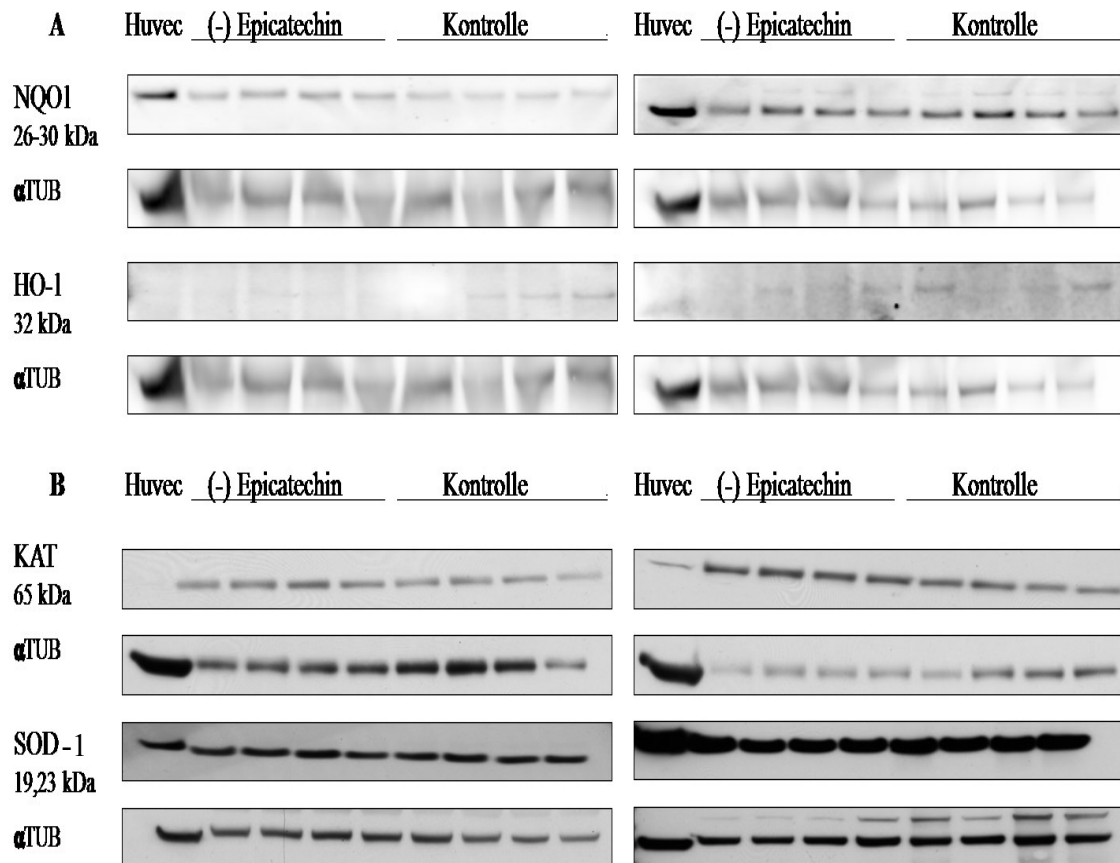


Abb. 14: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme des antioxidativen Systems in der Lunge

Die Proben wurden in der Western Blot Analyse in zwei Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle mit α Tubulin als *loading control* aufgetragen. (A) Western Blot Analyse des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems, NQO1 und HO-1. (B) Western Blot Analyse des NAD(P)H unabhängigen Schutzsystems, KAT und SOD-1. (HUVEC= *human umbilical vein endothelial cells*, (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50 kDa), SOD-1= Superoxiddismutase-1, KAT= Katalase, NQO1= NAD(P)H Dehydrogenase 1, HO1= Hämoxygenase-1) Verdünnungen siehe Tabelle 1.

In der Lunge waren die Proteinexpressionen der Enzyme des antioxidativen Systems nach Normierung auf α Tubulin, in der densitometrisch Auswertung, größtenteils nicht beeinflusst.

Die NQO1 und HO-1 des NADPH abhängigen Schutzsystems zeigte keine signifikant veränderte Expression. Ebenso wurde die Proteinexpression der SOD-1 des NAD(P)H unabhängigen Systems nicht signifikant reguliert.

Im Gegensatz wurde die Proteinexpression der KAT durch die (-) Epicatechin-Gabe im *Student's t-Test* signifikant hochreguliert (Abb. 14) (Abb. 15).

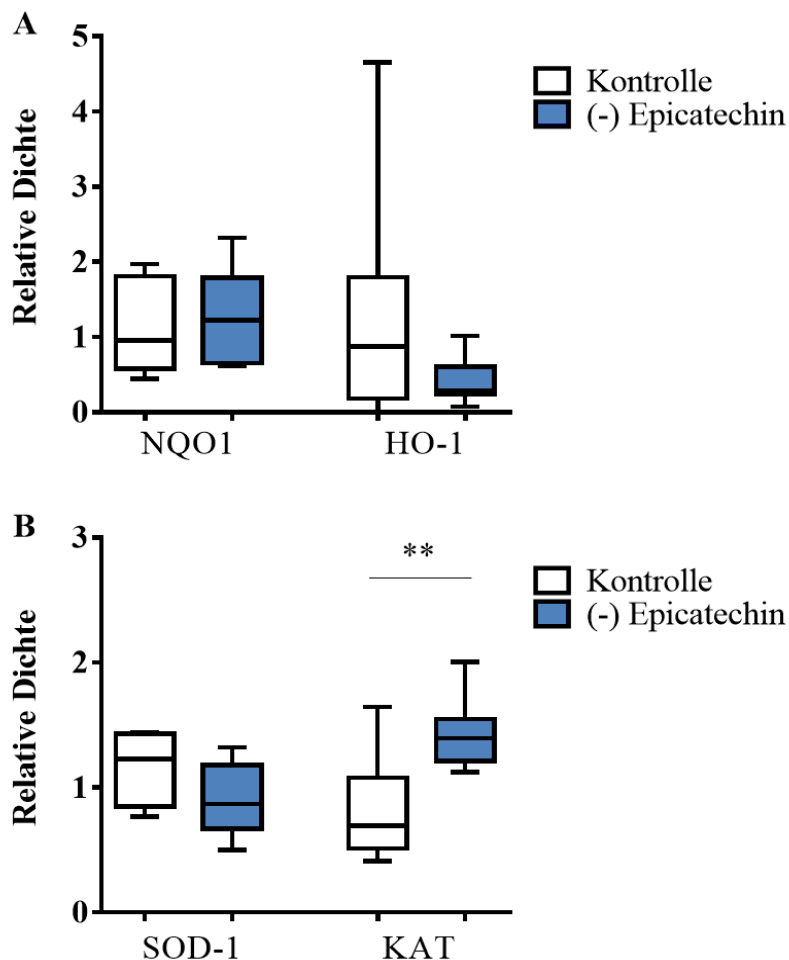


Abb. 15: Densitometrisch Auswertung Enzyme des antioxidativen Systems in der Lunge

Die Western Blot Analyse wurde mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die (-) Epicatechin- und Kontrollproben wurden mit Hilfe von α Tubulin normiert und mittels Boxplot dargestellt. (A) Western Blot Analyse des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems, NQO1 und HO-1. (B) Western Blot Analyse des NAD(P)H unabhängigen Schutzsystems, KAT und SOD-1. ((-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50 kDa), SOD-1= Superoxiddismutase-1, CAT= Katalase, NQO1= NAD(P)H Dehydrogenase 1, HO1= Hämoxygenase-1; Mittelwertvergleich anhand des *student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei *= $p < 0,05$.)

Leber

In der Western Blot Analyse der Leber zeigt sich die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion-Homöostase.

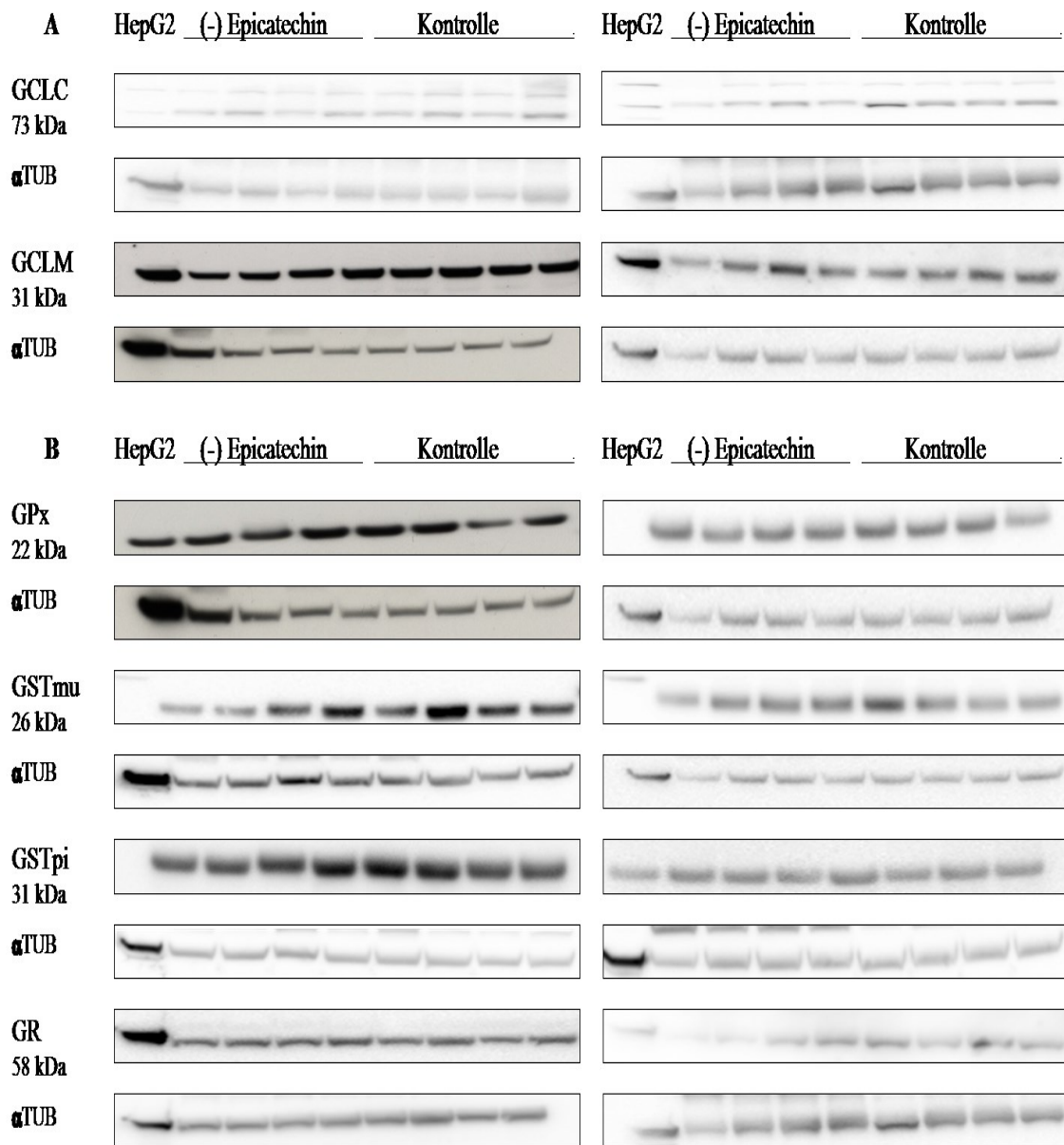


Abb. 16: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme der Glutathion Homöostase in der Leber

Die Proben wurden in der Western Blot Analyse in zwei Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle mit α Tubulin als *loading control* aufgetragen. (A) Western Blot Analyse der Glutathion Synthese. (B) Western Blot Analyse des Glutathion abhängigen Schutzsystems. (HepG2= *human liver hepatocellular carcinoma cell line*, (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50 kDa), GPx= Glutathion-Peroxidase, GST mu/GST pi= Isotypen mu und pi der Glutathion-S-Transferase, GR= Glutathion-Reduktase, GCLM/GCLC= modulatorische/katalytische Untereinheit der Glutamatcysteinylgase) Verdünnungen siehe Tabelle 1.

Die orale (-) Epicatechin-Gabe verminderte die Expression der Enzyme, GCLC und GST pi der GSH Homöostase.

Im *Student's t-Test* der densitometrisch Auswertung waren die Änderungen signifikant vermindert. Die Proteinexpression der GPx, GST mu, GR und GCLM wurde nicht signifikant reguliert (Abb. 16) (Abb. 17).

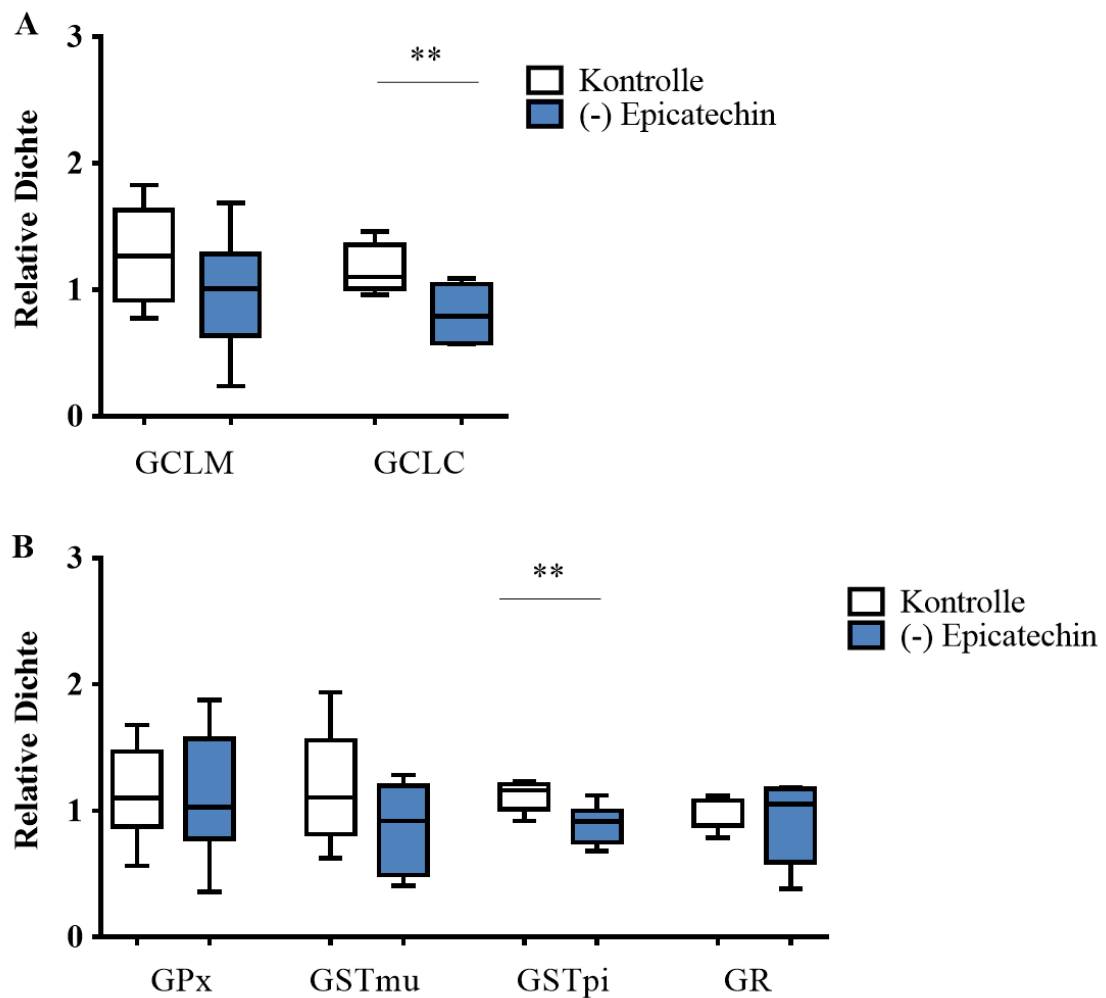


Abb. 17: Densitometrisch Auswertung der Glutathion-Homöostase in der Leber

Die Western Blot Analyse wurde mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die (-) Epicatechin- und Kontrollproben wurden mit Hilfe von α Tubulin normiert und mittels Boxplot dargestellt. (A) Western Blot Analyse der Glutathion-Synthese. (B) Western Blot Analyse des Glutathion abhängigen Schutzsystems. (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, GPx= Glutathion-Peroxidase, GST mu, GST pi= Isotypen mu und pi der Glutathion-S-Transferase, GR= Glutathion-Reduktase, GCLM/GCLC= modulatorische/katalytische Untereinheit der Glutamatcysteinligase; Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei $*=p<0,05$.)

Die Proteinexpression der NQO1 und HO-1 im NADPH abhängigen und KAT und SOD im NADPH unabhängigen System in der Western Blot Analyse.

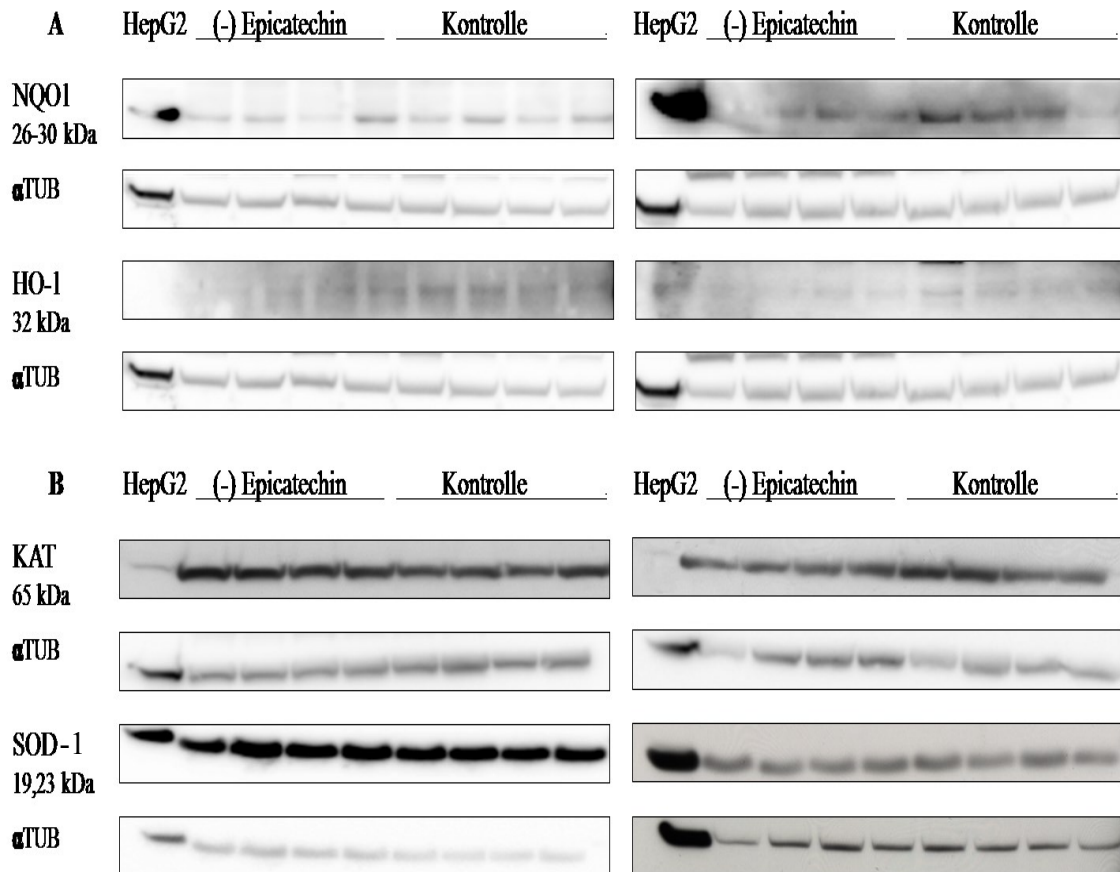


Abb. 18: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Enzyme des antioxidativen Systems in der Leber

Die Proben wurden in der Western Blot Analyse in zwei Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle mit α Tubulin als *loading control* aufgetragen. (A) Western Blot Analyse des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems. (B) Western Blot Analyse des NAD(P)H unabhängigen Schutzsystems. (HepG2= *human liver hepatocellular carcinoma cell line*, (-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50kDa), SOD-1= Superoxiddismutase-1, KAT= Katalase, NQO1= NAD(P)H Dehydrogenase 1, HO1= Hämoxygenase-1) Verdünnungen siehe Tabelle 1.

Nach densitometrisch Auswertung der Western Blot Analyse in der Leber zeigten sich im *Student's t-Test* die Proteinexpression der Enzyme des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems, NQO1 und HO-1 nicht signifikant nicht verändert.

Ebenso zeigte sich bei der Proteinexpression der SOD-1 des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems keine Regulation.

Dagegen konnte im *Student's t-Test* bei der Proteinexpression der KAT eine

signifikante Hochregulation unter der oralen (-) Epicatechin-Gabe festgestellt werden (Abb. 18) (Abb. 19).

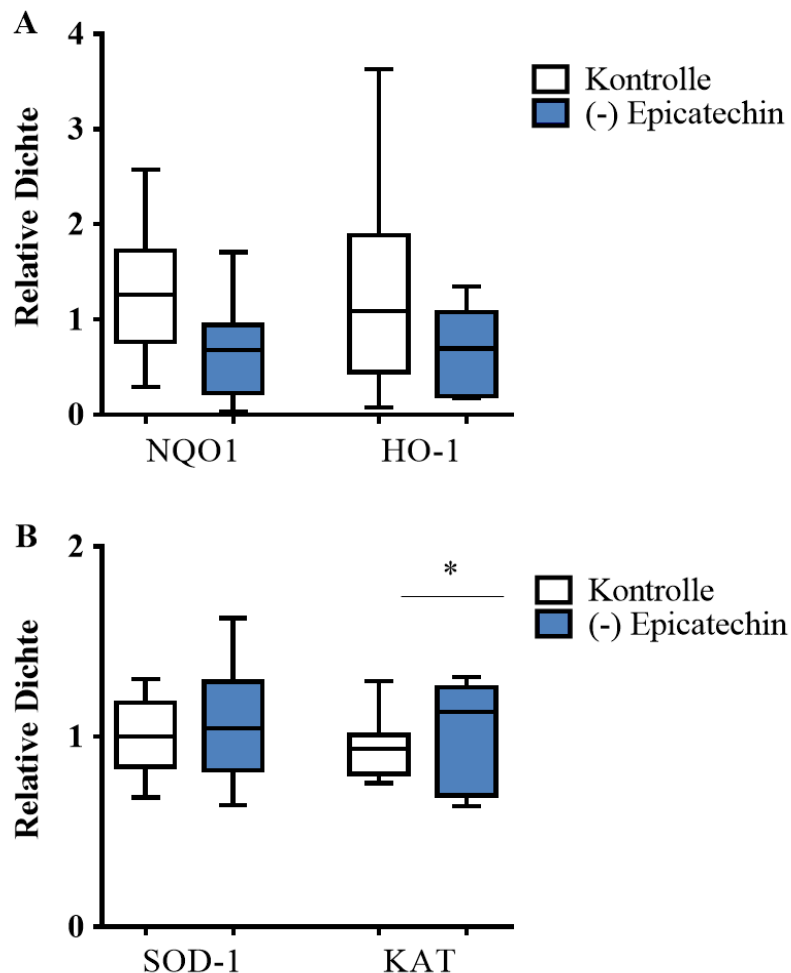


Abb. 19: Densitometrisch Auswertung Enzyme des antioxidativen Systems in der Leber

Die Western Blot Analyse wurde mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die (-) Epicatechin- und Kontrollproben wurden mit Hilfe von α Tubulin normiert und mittels Boxplot dargestellt. (A) Western Blot Analyse des NAD(P)H abhängigen Schutzsystems. (B) Western Blot Analyse des NAD(P)H unabhängigen Schutzsystems. ((-) Epicatechin 2 mg/kg Körpergewicht, SOD-1= Superoxiddismutase-1, KAT= Katalase, NQO1= NAD(P)H Dehydrogenase 1, HO1= Hämoxygenase-1; Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei *= $p<0,05$.)

4.3 Nach oraler (-) Epicatechin-Gabe induzierte Änderung der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Nrf1

Zur Evaluation der Auswirkungen der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren wurden die behandelten Proben aus Herz, Lunge und Leber mit Kontrollen verglichen.

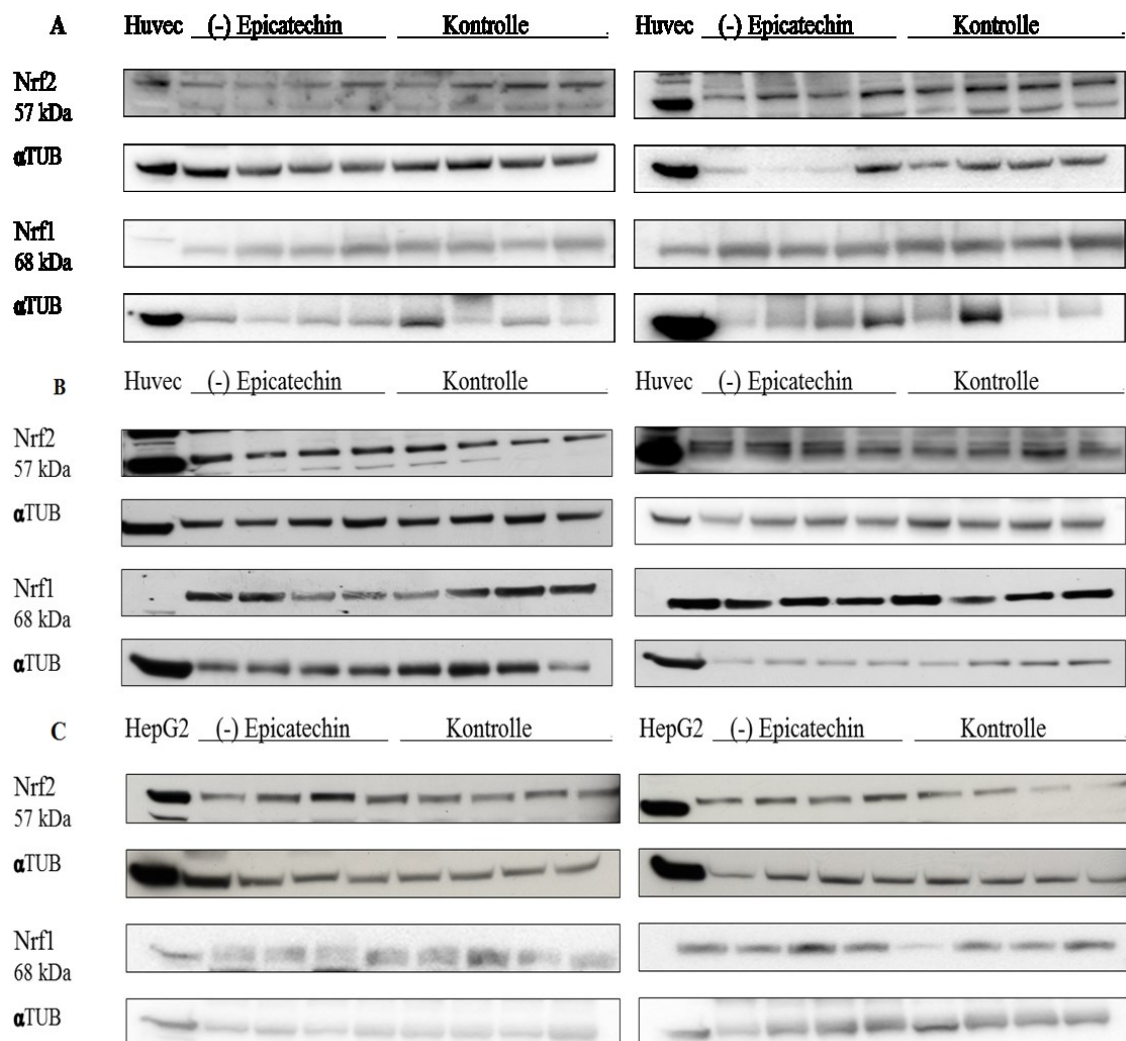


Abb. 20: Einfluss der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Nrf1 in Herz, Lunge und Leber

Die Proben wurden in der Western Blot Analyse in zwei Gruppen (-) Epicatechin und Kontrolle mit α Tubulin als *loading control* aufgetragen. (A-C) Darstellung der Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Nrf2 und Nrf1 (A) im Herzen, (B) in der Lunge und (C) in der Leber in der Western Blot Analyse. (Nrf2= *nuclear factor erythroid derived2-like-2*, Nrf1= *Nuclear respiratory factor 1*, HUVEC= *human umbilical vein endothelial cells*, HepG2= *human liver hepatocellular carcinoma cell line*, (-) Epicatechin 2mg/kg Körpergewicht, α TUB= α Tubulin (50kDa)) Verdünnungen siehe Tabelle 1.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse. im Herzen, der Lunge und der Leber

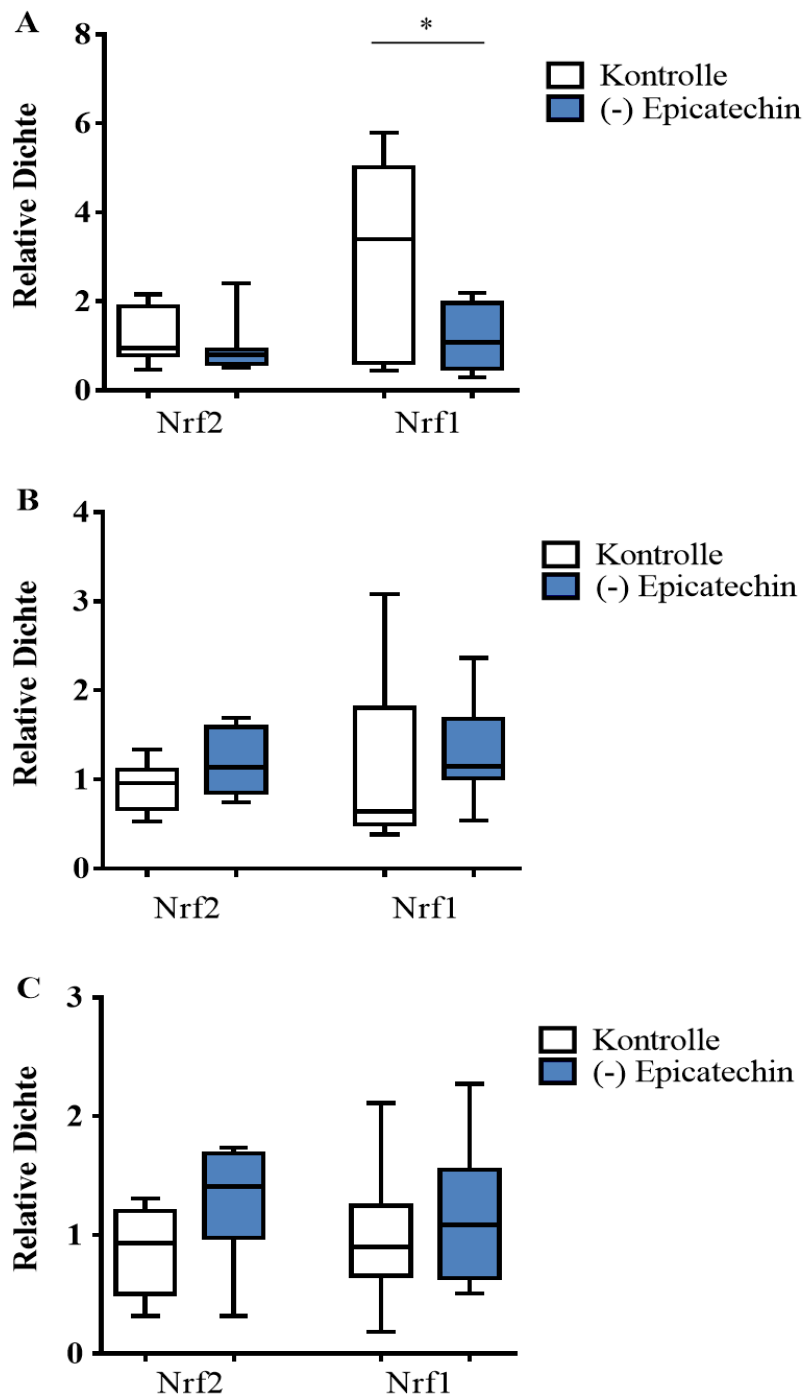


Abb. 21: Densitometrisch Auswertung der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren Nrf2 und Nrf1 im Herzen, in der Lunge und in der Leber

Die Western Blot Analyse wurde mittels Image J densitometrisch ausgewertet. Die (-)Epicatechin und Kontrollproben wurden mit Hilfe von α Tubulin normiert und mittels Boxplot dargestellt. (A) Im Herzen, (B) in der Lunge und (C) in der Leber. (Nrf2= *nuclear factor erythroid derived2-like-2*, Nrf1= *Nuclear respiratory factor 1*; Mittelwertvergleich anhand des *Student's t-Test* von zwei unabhängigen Gruppen, Gruppengröße je N=10, Signifikanz bei $*=p<0,05$.)

Es zeigten sich die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Nrf2 nicht signifikant verändert. Im Herzen war die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Nrf1 im *Student's t-Test* signifikant unter (-) Epicatechin-Gabe herunterreguliert, allerdings zeigten die Kontrollproben eine deutlich breitere Streuung als die (-) Epicatechinproben. In der Lunge und der Leber wurde die Proteinexpression von Nrf1 nicht signifikant reguliert. (Abb. 20) (Abb. 21).

5. Diskussion

In epidemiologischen Studien zeigte ein hoher Konsum flavanolreicher Nahrung einen protektiven Effekt auf die Inzidenz von Herzerkrankungen [6–8,79]. *In vitro* haben Polyphenole, darunter auch Flavanole, einen Effekt auf antioxidative Proteine gezeigt [75,76,80]. Klinisch konnte bereits eine vermehrte NO-Bioverfügbarkeit nachgewiesen werden [14]. Es besteht Bedarf bei der Frage, ob auch *in vivo* ein Effekt auf antioxidative Proteine nachgewiesen werden kann. Mit dieser *in vivo*-Arbeit liegt jetzt die Wirkung der oralen Gabe von (-) Epicatechin (2mg/kg Körpergewicht) im *wildtype*-Mausmodell durch Bestimmung des GSH-Gehaltes und der Enzyme der antioxidativen Antwort von ausgesuchten Organen vor. Neben der Messung des GSH-Gehaltes erfolgte die Bestimmung der Proteinexpression der Enzyme der antioxidativen Antwort: GPx, GST mu, GST pi, GR, GCLC, GCLM, NQO1, HO-1, SOD-1 und KAT.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit unter der oralen (-) Epicatechin-Gabe eine organabhängige Beeinflussung des GSH-Gehaltes und der GSH-Synthese. Eine generelle Beeinflussung der antioxidativen Antwort war nicht nachzuweisen.

Obwohl die Proteinexpressionen der Transkriptionsfaktoren nicht beeinflusst waren, scheint die organabhängige Aktivierung des Nrf2 Signalweges eine Rolle zu spielen. Vermutlich liegen zusätzlich noch nicht untersuchte Mechanismen vor. Diese sind möglicherweise zeit-, und organ-, sowie umweltabhängig. Die orale (-) Epicatechin-Gabe kann zu den protektiven Effekten flavanolreicher Ernährung beitragen.

5.1 Die orale (-) Epicatechin-Gabe hat organanhängige Wirkungen auf den GSH-Gehalt

Der GSH Gehalt

Unter der oralen Gabe von (-) Epicatechin für vier Tage zeigte sich im C57/B6 Mausmodell ein organabhängiger Effekt auf den GSH-Gehalt der Organe.

In dieser Arbeit änderte sich der GSH-Gehalt unter oraler (-) Epicatechin-Gabe im Herzen nicht, während der GSH-Gehalt in der Lunge tendenziell nach Mann-Whitney U signifikant stieg und in der Leber signifikant sank. Aufgrund der kleinen

Stichprobengröße wird hier eine signifikante Änderung des GSH-Gehaltes in der Lunge angenommen.

GSH ist ein antioxidatives Protein. Es ist in der Zelle als Antioxidans und als Radikalfänger wirksam [38,63]. Der GSH-Gehalt wird u.a. durch die *de novo*-Synthese stabil gehalten [81]. Das Enzym für die GSH-Synthese ist die Glutamatcysteinligase (GCL).

In der durchgeführte Western Blot Analyse wurden die GCL-Untereinheiten, GCLC und GCLM untersucht. Die Proteinexpressionen der GCL-Untereinheiten zeigte sich, entsprechend dem GSH Gehalt, in der Lunge vermehrt und in der Leber vermindert. Im Herzen führte die verminderte Proteinexpression der GCL Untereinheiten dagegen nicht zu einem GSH-Abfall. Daraus folgt: Neben der Änderung der GSH-Synthese durch die (-) Epicatechin-Gabe scheinen noch weitere Mechanismen beteiligt zu sein, die zu einer relevanten Änderung des GSH-Gehaltes in der Lunge und der Leber, jedoch nicht im Herzen, führten.

Die Änderungen in dieser Arbeit zeigen eine kleine Amplitude. Vergleichbare Ergebnisse finden sich zumeist bei den Kontrollen bei Versuchen zu toxisch induzierten Schädigungen. Im Vergleich zeigte sich nach (-) Epicatechin-Gabe bei Kleintieren ohne toxische Schädigung in Herz, Leber und Niere ebenfalls kleine Amplituden bis keine Änderung im GSH-Gehalt der Organe [26,82]. Ähnlich den Ergebnissen der Leber in dieser Arbeit nahm der GSH-Gehalt in den Nieren von nur mit 10 mg/kg Körpergewicht (-) Epicatechin behandelten Ratten leicht ab [82]. Die Konzentration scheint dabei ein in geringem Maße einflussnehmender Faktor zu sein, auch bei Konzentrationen von 10, 15 und 30 mg/kg Körpergewicht zeigten sich keine größeren Amplituden bei Änderungen des GSH-Gehaltes [26,82]. Es ist jedoch nicht vollkommen auszuschließen, dass die Effekte durch eine höhere Dosierung leicht verändert werden.

Im Plasma von neu diagnostizierten Lungentuberkulosepatienten dagegen stieg der GSH-Gehalt nach (-) Epicatechin Gabe an [83]. Es ist nicht auszuschließen, dass die Pathophysiologie der Erkrankung zu diesem Ergebnis beiträgt und somit erst die Vorraussetzung schafft, dass (-) Epicatechin wirken kann.

Es bleibt festzuhalten, dass die Organe nicht nur untereinander unterschiedlich auf die orale (-) Epicatechin-Gabe reagieren, sondern dass scheinbar auch ein Unterschied zwischen den Organen und der Wirkung im Plasma besteht.

Was sind die hinter den Ergebnissen stehenden Mechanismen?

Ausgehend von der Hypothese einer organabhängigen Reaktion auf die (-) Epicatechin-Gabe könnte der GSH-Gehalt im Herzen zusätzlich stabilisiert worden sein. Krzywanski *et al.* (2004) beschrieben neben der Stabilisation des GSH-Gehaltes durch die *de novo* GSH-Synthese die Reduktion von GSSG über die GR [81]. Jedoch war die Proteinexpression der GR in dieser Arbeit nicht gesteigert. Prince *et al.* (2011) zeigten außerdem in Ratten, dass im Herzen eine Aktivitätssteigerung der GR durch (-) Epicatechin (20 mg/kg Körpergewicht) nicht eintritt [84]. Es ist wahrscheinlich, dass der Unterschied durch einen höheren Verbrauch von GSH in der Leber verursacht wurde.

Griffith *et al.* (1999) formulierten in diesem Zusammenhang, dass die Rate des GSH-Abfalls zwischen den Geweben mit der Höhe ihres Verbrauchs variiert [85]. Die Leber würde bei Inhibition der GSH-Synthese schneller Glutathion verlieren als andere Gewebe [85]. Ein weiterer beschriebener Einflussfaktor ist die Steigerung des biliären hepatischen GSH-Effluxes durch polyphenolische Antioxidantien [86], es bleibt jedoch fraglich, ob auch Flavanole diesen Effekt erzielen können. In Endothelzellen wurde eine Wirkung von (-) Epicatechin über den Proteinkinase A (PKA)-Signalweg vermutet [32]. Aufgrund der Steigerung des hepatischen Effluxes über den PKA-Signalweg könnten durch den gesteigerten Efflux auch geringe Änderungen der GSH-Synthese den GSH-Gehalt relevant beeinflussen [87,88].

Die daraus folgende Schlussfolgerung ist, eine verringerte Synthese im Herzen und in der Leber, wie sie in dieser Arbeit vorlag, bewirkt bei gleichbleibendem Verbrauch eine schnellere Leerung der intrahepatischen Vorräte. Ein gesteigerter hepatischer GSH-Efflux der Leber wäre ein weiterer Faktor, der im Gegensatz zum Herzen zu einem zusätzlichen intrahepatischen GSH-Verlust führen würde.

Diese Mechanismen könnten einen Anstieg des GSH-Gehaltes im Plasma, wie er bei Lungentuberkulosepatienten auftrat, trotz des Einflusses der Erkrankung erklären [83].

Wie beschrieben bestimmt der hepatische Efflux (GSH-Efflux) vorrangig den Plasma-GSH-Gehalt und der Großteil des Verbrauchs an Glutathion in der Leber entsteht durch die Abgabe in die Zirkulation [44,85,89]. Trotz der verminderten GSH-Synthese käme es zu einem messbaren GSH-Anstieg im Plasma. Des Weiteren ist ein Anstieg im Plasma immer auch mit Blick auf den möglicherweise durch polyphenolische Antioxidantien gesteigerten hepatischen Efflux zu betrachten [86].

Die Unterschiede werden neben der Konzentration und der intestinalen und hepatischen Metabolisierung durch die orale Gabe vermutlich auch durch die Dauer der Anwendung beeinflusst.

5.2 Die orale (-) Epicatechin-Gabe hat organabhängige Wirkungen auf die Proteinexpression der Enzyme der antioxidativen Antwort

Die antioxidative Antwort

Mit der Untersuchung der Proteinexpression von den Enzymen GCLM, GCLC, GPx, GST mu und pi, GR, NQO1, HO-1, SOD-1 und KAT in den Organen, Herz, Lunge und Leber wurden die systemischen Auswirkungen der oraler (-) Epicatechin-Gabe auf die antioxidative Antwort verfolgt. Insgesamt konnte organabhängig eine signifikante Änderung der Proteinexpression der Enzyme GCLM, GCLC, GST pi und KAT beobachtet werden. Jedoch war keine signifikante Änderung der Proteinexpression der Enzyme GPx, GST mu, GR, NQO1, HO-1 und SOD-1 in allen drei Organen zu beobachten. Es lässt sich in dieser Hinsicht nicht generell eine Wirkung der oralen (-) Epicatechin-Gabe (2 mg/kg Körpergewicht) auf die antioxidative Antwort nachweisen. Vielmehr spielen die im Organismus zur Zeit der Anwendung vorherrschenden Mechanismen eine Rolle.

GSH abhängige Schutzsystem

Der zelluläre GSH Gehalt der Organe wurde durch die GSH-Synthese reguliert. Die densitometrisch Auswertung der Proteinexpression der Glutamatcysteinylgase (GCL)-

Untereinheiten GCLC und GCLM stellt sich im Herzen signifikant vermindert dar, ohne Einfluss auf den GSH-Gehalt zu nehmen. In der Lunge war die Proteinexpression der GCL Untereinheit, GCLC, gesteigert und in Leber signifikant vermindert. Die aus GCLC und GCLM zusammengesetzte GCL wird als das Enzym der GSH-Synthese beschrieben, wobei die GCLC als katalytische Einheit und syntheseslimitierend identifiziert werden konnte [85].

In Astrozyten konnte *in vitro* die Induktion der GSH-Synthese über den PI3K/Nrf2 Signalweg [75] und die Induktion des Nrf2-Signalweges durch Epicatechin [73] gezeigt werden. Nrf2 ist ein Induktor von ARE-abhängigen Genen, zu denen auch die GCL-Untereinheiten zählen [66,78]. Eine *in vivo*-Wirkung wurde aufgrund der starken Konzentrationsunterschiede durch die Bioverfügbarkeit von Flavanolen kontrovers diskutiert [5,18]. In dieser Arbeit konnte ein ähnlicher Effekt nur in der Lunge gezeigt werden. Der redoxensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 könnte die Änderung der Proteinexpression der GCL in der Lunge bewirkt haben. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht so eindrucklich, wie sie *in vitro* in Astrozyten vorbeschrieben wurden. Es scheinen andere Effekte im Herzen und der Leber zu wirken. Möglicherweise ist die Metabolisation von (-) Epicatechin in dieser Hinsicht von Bedeutung. Die Ergebnisse in Herz und Leber deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor organabhängig beeinflusst wurde.

Korrelierend zur vermehrten GSH-Synthese ist die Proteinexpression der GST-Isoform pi des GSH abhängigen Schutzsystems in der densitometrischen Auswertung in der Lunge vermehrt exprimiert, während in der Leber der gegenteilige Effekt zu beobachten ist.

In Lungenzellen kam es *in vitro* durch diätische phytochemischen Substanzen, darunter auch ein Flavanol, zu einer Induktion von Enzymen der antioxidativen Antwort, darunter auch GST pi [90]. Die orale (-) Epicatechin-Gabe könnte die Induktion der GST pi durch den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor Nrf2 bewirkt haben. Itoh *et al.* (1997) konnten eine Nrf2 abhängige Induktion von Enzymen der antioxidativen Antwort, darunter auch GST, durch ARE zeigen [66]. Die organabhängigen Unterschiede in der Induktion könnten durch gewebespezifisch ausgeprägten Isoformen der GST zusammenhängen [58].

Ein weiterer zu berücksichtigender Mechanismus ist die GSH-Gehalt abhängige Regulation der Expression der GST pi. GST benutzt GSH als Kofaktor zur Konjugation von Fremdstoffen und wird zusätzlich durch den Redox-Status der Zelle reguliert [91]. Der Redox-Status entspricht dem Verhältnis von GSH zu GSSG, womit Änderungen im GSH-Gehalt entsprechend den Redox-Status und folglich auch die GST pi beeinflussen. In der Lunge und Leber wäre dieser Effekt durch den tendenziell aufgetretenen Anstieg bzw. Abfall des GSH-Gehaltes ebenfalls gegeben. Die Proteinexpression der GST pi im Herzen wäre durch den gleichbleibenden GSH-Gehalt nicht verändert.

NAD(P)H abhängiges und unabhängiges Schutzsystem

In allen drei Organen zeigte sich ein Anstieg der Katalase (KAT). In einer klinischen Studien mit neu diagnostizierten Lungentuberkulose-Patienten konnte im Plasma ein Abfall der Katalase unter der (-) Epicatechin-Behandlung gezeigt werden [83]. Die Autoren vermuteten eine Verminderung von oxidativem Stress. In dieser Arbeit lag keine Schädigung vor, vermehrter oxidativer Stress war nicht zu erwarten. Ein Einfluss der Erkrankung auf die Ergebnisse ist nicht auszuschließen. *In vitro* wurde die Proteinexpression der Katalase über den Nrf2-Transkriptionsfaktor durch Epicatechin gesteigert [92]. (-) Epicatechin zeigte in verschiedenen Studien, sowohl einen aktivierenden als auch inhibitorischen oder keinen Effekt auf die Katalase [82,83,93,94]. Möglicherweise wirken in dieser Arbeit zusätzliche Nrf2 unabhängige Mechanismen, die zu einer Steigerung der Proteinexpression der Katalase in allen Organen geführt hat.

Eine weiterführende Induktion der Enzyme der antioxidativen Antwort konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. In dieser Dosierung wurde die Proteinexpression der SOD-1, HO-1 und NQO1, als Nrf2 abhängige Enzyme [62], nicht beeinflusst. Im Vergleich mit anderen Studien finden sich sowohl vergleichbare, als auch widersprechende Ergebnisse.

In der Aorta von Ratten, nach einer Gabe von (-) Epicatechin (fünf Wochen, oral (Gavage), 10mg/kg Körpergewicht, Aorta), kam es zu einer Steigerung der Nrf2-abhängigen Enzyme, NQO1 und HO-1, der antioxidativen Antwort. Andere Versuche zeigten: Nach Gabe einer (-) Epicatechin/Catechin-Mischung wurde die Expression der Enzyme der antioxidativen Antwort unterschiedlich beeinflusst (SOD ↑, KAT, GPx ↓, Mensch, 4 Monate, 3 x wöchentlich, oral, 500 µg, Lungentuberkulose, Blut) [83,95],

(HO-1 ↓, SOD-1, NQO1 ↑, Mäuse, 3 Stunden, täglich bis 72 Stunden, oral, 5, 15, 45 mg/kg KG, interzerebrale Blutung, Gehirn) [93].

Vergleichbar zeigte die antioxidative Antwort in Nieren von (-) Epicatechin behandelten Ratten kaum eine Veränderung der Expressionen von SOD, KAT und GPx (Ratte 10 Tage, i.p., 10 mg/kg KG, *wildtyp*, Niere) [82]. GPx konnte *in vitro* auch unter Ausschaltung von Nrf2 weiterhin induziert werden [96] und blieb in der Expression stabil.

Es scheint eine selektive Beeinflussung Nrf2 abhängiger Enzyme stattzufinden. Noch nicht untersuchte Mechanismen oder die unterschiedlichen Versuchsaufbauten könnten auf die Ergebnisse Einfluss gehabt haben.

Insgesamt zeigte sich in Abhängigkeit von der Dauer, dem Einfluss einer Schädigung, der Applikationsart und der Spezies ein sehr unterschiedliches Wirkspektrum der oralen (-) Epicatechin-Gabe.

5.3 Die orale (-) Epicatechin-Gabe hat organabhängige Wirkungen auf die Transkriptionsfaktoren

Nrf2

Die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Nrf2 wurde durch die orale (-) Epicatechin-Gabe im Herzen, in der Lunge und Leber nicht reguliert.

Im Zellkern findet die Bindung von Nrf2 an Enzyme der antioxidativen Antwort kodierende ARE-Genregionen und deren Induktion statt [66]. Leonardo *et al.* (2013) beschrieben eine Wirkung von (-) Epicatechin über Nrf2, als bei ihren Versuchen mit Nrf2- *knockout*-Mäusen die Wirkung ausblieb [35]. Die Aktivität von Nrf2 ist über die Proteinexpression Nrf2-abhängigen Proteine der antioxidativen Antwort evaluierbar.

Lunge

In der Lunge kann, aufgrund der Steigerung des GSH-Gehaltes durch eine vermehrte Synthese, von einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges ausgegangen werden. Ebenso ist eine Nrf2 abhängige Induktion von GST pi durch ARE nicht auszuschließen [66].

Ein dem (-) Epicatechin verwandtes Flavanol, Epigallocatechingallat, konnte in der Lunge bei einer intraperitonealen Gabe von täglich 20 mg/kg Körpergewicht über 28 Tage die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Nrf2 und die Induktion von Nrf2 abhängigen Phase II-Enzymen steigern [97]. Jedoch ist neben der höheren Dosis und Applikationsart auch die Wirkung der Flavane untereinander verschieden - alleine ihre stereometrische Struktur verändert den Effekt [21]. In HepG2-Zellen konnte eine (-) Epicatechin induzierte Steigerung der Mechanismen gegen oxidativen Stress über den Nrf2-Signalweg beschrieben werden [73]. Die Autoren wiesen schon dort auf die Regulation der Signalwege in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Natur des Stimulus hin.

Herz und Leber

Die Proteinexpressionen der GCL Untereinheiten, GCLC und GCLM (nur Herz), waren vermindert. Diese Enzyme gehören zu den Nrf2 abhängig induzierbaren Enzymen der antioxidativen Antwort, mit einer ARE-kodierten Genregion [66]. Eine verminderte Expression ist somit auf die Beeinflussung des Nrf2-Signalweges zurückzuführen.

In dieser Arbeit kam es folglich in der Leber und im Herzen zu einer verminderten Aktivierung des Nrf2-Signalweges.

Die Änderung des GSH-Gehaltes und der antioxidativen Antwort war abhängig von der organabhängigen Aktivierung des Nrf2-abhängigen Signalweges. Dies spiegelte sich in den Organen in der vermehrten (Lunge) oder verminderten Proteinexpression (Herz und Leber) der antioxidativen Enzyme wieder. Es stellt sich die Frage, wie es zu diesem Unterschied kommen konnte.

Was sind die hinter den Ergebnissen stehenden Mechanismen?

Wie kam es zu einer Steigerung der GSH Synthese ohne sichtbare Veränderung der Proteinexpression von Nrf2?

In der Lunge wurde die GSH-Synthese gesteigert, trotz gleichbleibender Proteinexpression des Transkriptionsfaktors Nrf2. Möglicherweise war der Effekt auf den Transkriptionsfaktor vorübergehend und konnte zum Zeitpunkt der Erhebung der Ergebnisse nicht beobachtet werden. Nach Nguyen *et al.* (2003) ist eine Steigerung der

Nrf2-abhängigen Proteine durch eine verlängerte Proteinstabilität von Nrf2 möglich [42]. Dieses kurzfristige Ansteigen von Nrf2, durch orale (-) Epicatechin-Gabe, könnte zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges geführt haben. Die Aktivierung erfolgt über die Dissoziation des Keap1/Nrf2-Komplexes im Zytosol und anschließender nukleäre Translokation [75]. Ein vorübergehender Anstieg von Nrf2, durch Anreicherung und nicht durch vermehrte Bildung, könnte eine Steigerung der Proteinexpression der GCL-Untereinheiten bewirken. Durch einen schnellen Abbau wäre die Steigerung nur anhand der Proteinexpression der Nrf2-abhängigen Proteine nachvollziehbar.

Wie könnte der Nrf2-Signalweg in den Organen unterschiedlich beeinflusst werden?

Um diese Frage zu beantworten, scheint es wichtig zu sein, zuerst zu erörtern, wie es zu dieser nicht erwarteten verminderten Aktivierung von Nrf2 im Herzen und der Leber kommen konnte.

In der Leber kam es aufgrund der verminderten Expression der GCL zu einem Abfall des GSH-Gehaltes. Es ist anzunehmen, dass die verminderte Aktivierung des Nrf2-Signalweges diese Ergebnisse verursachte. Wie bereits beschrieben wird Nrf2 als redoxsensitiver Transkriptionsfaktor durch ROS induziert [98,99]. Neben (-) Epicatechin können verschiedene Klassen von chemischen Substanzen die Enzyme der antioxidativen Antwort induzieren [49], darunter nahmen auch ROS *in vitro* auf die Genexpression von verschiedenen Enzymen Einfluss [100]. Granado-Serrano *et al.* (2010) formulierten, dass *in vitro* in HepG2-Zellen eine durch (-) Epicatechin induzierte ROS regulierte Induktion des Nrf2-Signalweges über PI3K und ERK stattfindet [73].

Interessanterweise sind von (-) Epicatechin-Wirkungen beschrieben- die oxidativen Stress reduzieren. Epicatechin konnte *in vitro* die endogene ROS-Produktion durch Hemmung der NAD(P)H-Oxidase vermindern [28]. Dieser Effekt zeigte sich auch nach fünf Wochen Behandlung, *in vivo*, in der Aorta von Ratten [101]. Gomez-Guzman *et al.* (2012) schlussfolgerten jedoch, dass in der Aorta von mit (-) Epicatechin behandelten, Ratten die Regulation des Nrf2-Signalweges unabhängig von der ROS-Produktion sei [101]. Jedoch reagieren die Organe sehr unterschiedlich und die Dauer der Anwendung war verlängert, im Gegensatz zu dieser Arbeit, sodass ein zeitabhängiger Unterschied nicht auszuschließen ist. Zusätzlich könnte sich der Effekt in der Aorta durch die hohen Druckverhältnisse und einhergehend höheren Belastungen anders ausgewirkt haben.

Gleichwohl spricht für eine protektive Wirkung der (-) Epicatechin-Gabe bei Gomez-Guzman *et al.* (2012) eine Verminderung von systemischen Markern von oxidativem Stress [101]. Ebenso zeigten sich unter (-) Epicatechin verminderte Lipidoxidationsprodukte im Plasma von neudiagnostizierten Lungentuberkulosepatienten [83]. Eine Verminderung von oxidativem Stress könnte im Herzen und der Leber zu einer herabgesetzten Aktivierung des Nrf2-Signalweges führen. Im Folgenden resultierend in einer verminderten Induktion der antioxidativen Antwort (GCL↓, GST pi↓), wie sie im Herzen und der Leber beobachtet werden konnte. Die Interaktion mit dem Nrf2 Signalweg, infolge der oralen Gabe von (-) Epicatechin, wäre somit gleichbedeutend mit einer Verminderung der antioxidativen Antwort. Die Effekte haben jedoch eine kleine Amplitude, sodass nicht von einem daraus resultierenden Schaden für den Organismus ausgegangen werden kann.

Bei zusätzlichem oxidativem Stress, der zu Schädigungen im Gefäßsystem führen und letztendlich in einem Herzinfarkt münden würde, wäre dieser Mechanismus durch z.B. vermehrte ROS-Spezies nachrangig. Die variable Wirkung auf z.B. den Nrf2-Signalweg bietet eine Erklärung, weshalb (-) Epicatechin zum einen protektiv auf die Entstehung eines Herzinfarktes wirkt und somit die Inzidenz senkt. Zum anderen, weshalb auftretende Schäden oder Herzinfarkte unter (-) Epicatechin-Gabe weniger massive Folgen haben, z.B. konnten Reperfusionsschäden durch die Gabe von (-) Epicatechin vermindert werden [31]. In weiteren Versuchen konnte (-) Epicatechin die Schädigungen in Streptomycin induzierten diabetischen Ratten, Nicotin induzierten oxidativem Stress und Cyclosporin A induzierter Nierentoxizität vermindern [26,82,94]. Klinisch profitierten neu diagnostizierte Lungentuberkulosepatienten von der (-) Epicatechin-Gabe [83].

Die orale (-) Epicatechin-Gabe konnte in der Lunge den Nrf2-Signalweg aktivieren (GCLC↑, GSTpi↑). Der Nrf2-Signalweg schützt die Lunge vor oxidativem Stress [62]. Nach dem oben genannten Mechanismus schien die exogene ROS-Exposition auszureichen um die antioxidative Antwort induzierende (-) Epicatechin-Wirkung auszulösen. Die Lunge ist, ihrer weiten Oberfläche und Blutfluss geschuldet, das einzige Organen im ganzen Organismus, welches die größte Exposition zu atmosphärischem Sauerstoff und anderen Umwelttoxinen hat [102]. Dadurch ist die Lunge, ebenso wie die Aorta, durch die ständigen Druckverhältnisse gegenüber oxidativer Schädigung durch ROS besonders verwundbar und erfordert besondere

Schutzmechanismen. Einer davon ist der redoxensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 [62]. Nrf2 ist ubiquitär in den Geweben exprimiert, aber besonders reichlich in Lunge. [65,66]. Die in der Lunge physiologisch vermehrte Expression von Nrf2 im Gegensatz zu den anderen Organen könnte zu einer bevorzugten Aktivierung dieses Signalweges beitragen.

Nrf1

Der Transkriptionsfaktor Nrf1 wurde durch die orale (-) Epicatechin-Gabe in Lunge und Leber nicht in seiner Proteinexpression reguliert. Im Herzen zeigte sich eine gesteigerte Proteinexpression von Nrf1.

Was sind die hinter den Ergebnissen stehenden Mechanismen?

Die Expression von Nrf1 im Herzen könnte durch die orale (-) Epicatechin-Gabe verursacht worden sein. Gesteigerte NO - oder H₂O₂ -Produktion ist in der Lage das Transkriptionsprogramm für die Mitochondrien-Biogenese zu induzieren und führt darüber zu einer Steigerung der Proteinexpression von Nrf1, wie bei Bartz *et al.* (2015) und Nisoli *et al.* (2006) zusammengefasst [103,104]. Die vermehrte Proteinexpression der Katalase, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, spricht für eine gesteigerte H₂O₂ -Produktion. Außerdem konnte (-) Epicatechin die Steigerung der NO-Synthese bewirken [14,15,76]. Eine Induktion des Transkriptionsfaktors Nrf1 über die gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit wäre möglicherweise zu erörtern. Die Rolle von NO bei der Expression von Nrf2 und Nrf1 wurde von Merry *et al.* (2016) in Muskelgewebe von Mäusen sowie *in vitro* beschrieben [105]. Des Weiteren verhinderten Suliman *et al.* (2007) bewusst eine Synthese von NO um ihre Ergebnisse für die CO induzierte Steigerung von Nrf2 und Nrf1 auszuschließen [53]. Sie zeigten auch, dass in eNOS(-/-) *knockout*-Mäusen die Transkription der Faktoren niedriger war [53].

Die orale (-) Epicatechin-Gabe trägt zum Schutz des Herzen bei durch Steigerung des Transkriptionsfaktors Nrf1, welcher die Mitochondrienbiogenese induziert. Dieser Effekt scheint ein Indiz dafür zu sein, dass die Wirkung der oralen (-) Epicatechin-Gabe auf das Herz weniger durch Induktion der antioxidativen Antwort,

sondern vielmehr durch die vermehrte NO-Bioverfügbarkeit herbeigeführt werden könnte.

6. Schlussfolgerung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der *in vivo* Auswirkungen auf den GSH-Gehalt und die antioxidative Antwort in *wildtype*-Mäusen. Es wurde eine klinisch relevante Dosierung von 2mg/kg Körpergewicht verwendet, die in Studien bereits protektive Effekte auf das kardiovaskuläre System zeigte [14].

In dieser Arbeit konnten gezeigt werden, dass die orale (-) Epicatechin-Gabe den GSH-Gehalt organabhängig beeinflusst werden (Herz=, Lunge↑, Leber↓). Von der antioxidativen Antwort konnte die Glutathion-Synthese in Form einer vermehrten Proteinexpression der GST pi und GCLC gesteigert werden. Die übrigen Enzyme der antioxidativen Antwort, mit Ausnahme der Katalase, zeigten in allen Organen keine veränderte Proteinexpression.

Die organabhängige Beeinflussung ist vermutlich auf die unterschiedliche Aktivierung von Signalwegen zurückzuführen. Dies hat zur Folge, dass sich im Herzen, der Lunge und der Leber ein gegenteiliger Effekt zeigte. Vermutlich ist eine verminderte Aktivierung von Nrf2 im Herzen und der Leber ausschlaggebend für die interorganischen Unterschiede. Eine Aktivierung anderer Signalwege (z.B. PKA, PI3-Akt, MAPK, ERK, AhR, u.a.) ist nicht auszuschließen [53,73]. Besonders im Herzen könnten auch NO induzierte Effekte, wie z.B. auf den Transkriptionsfaktor Nrfl, überwiegen.

In der Lunge kam es zu einer organabhängigen Aktivierung des Nrf2-Signalweges unter der oralen (-) Epicatechin-Gabe. Im Vergleich mit Studien scheinen die Auswirkungen der (-) Epicatechin-Gabe abhängig vom Vorliegen einer Schädigung oder zumindest ROS-Exposition zu sein. Mechanismen wie eine Hemmung der NAD(P)H-Oxidase durch (-) Epicatechin, wie sie *in vitro* gezeigt werden konnte, [28] und damit der endogenen ROS-Produktion, könnten in den Organen Herz und Leber zu einer verminderten Induktion des Nrf2-Signalweges geführt haben. Demzufolge werden die Signalwege in den Geweben und Organen abhängig von ihrer ROS Exposition unterschiedlich stark induziert.

Bezugnehmend darauf war auffällig zu beobachten, dass in der Lunge, als Organ der besonderen ROS-Exposition, ein anderes Ergebnis auftrat als in Herz und Leber. Dieses

Ergebnis ähnelte den Ergebnissen von Studien, in denen medikamentös oder physiologisch induzierten oxidativen Stress ausgeübt wurde [26,31,82].

Schlussfolgernd unterscheiden sich die gezeigten Effekte dieser Arbeit durch die organabhängigen Eigenschaften. Die genauen Mechanismen, die Interaktionen der Signalwege in den einzelnen Organen, bleiben jedoch fraglich. Diese Mechanismen haben, konkurrierend oder synergistisch, zu den beobachteten Änderungen im GSH-Gehalt und Regulation der antioxidativen Antwort in den Organen geführt. Es ist anzunehmen, dass umwelt-, applikations- und organabhängige Effekte die Wirkung bestimmen.

Ausblick

Trotz jahrelanger Forschung sind vor allem die *in vivo*-Auswirkungen der (-) Epicatechin-Gabe noch nicht vollständig ergründet. Insbesondere werfen die Interaktionen der beteiligten Signalwege noch Fragen auf. Teilweise liefern aktuelle Forschungen uneinheitliche Ergebnisse. Diese Arbeit zeigt einen protektiven Effekt der oralen (-) Epicatechin-Gabe, gibt aber auch neue Fragen auf. Sollte sich eine ROS sensible Wirkung bestätigen, könnte ein präventiver Einsatz bei der Inzidenz von Herzinfarkten oder eine Gegenregulation zu oxidativen Stress nach einer Schädigung Ziel weiterer Forschung sein. Bis dahin werden noch weitere Daten über den komplexen, weitreichenden Effekt der (-) Epicatechin-Wirkung *in vivo* und im Folgenden auch in klinischen Studien benötigt werden

7. Literaturverzeichnis

- [1] V. Bayard, F. Chamorro, J. Motta, N.K. Hollenberg, Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes?: Ischemic heart disease, stroke, diabetes mellitus, and cancer in Panama, *International journal of medical sciences* 4 (2007) 53–58.
- [2] S.O. Keli, M.G. Hertog, E.J. Feskens, D. Kromhout, Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study, *Archives of internal medicine* 156 (1996) 637–642.
- [3] J. Mursu, S. Voutilainen, T. Nurmi, T.P. Tuomainen, S. Kurl, J.T. Salonen, Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, *The British journal of nutrition* 100 (2008) 890–895.
- [4] M.A. Martin, L. Goya, S. Ramos, Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer, *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 56 (2013) 336–351.
- [5] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American journal of clinical nutrition* 79 (2004) 727–747.
- [6] I.C. Arts, P.C. Hollman, E.J. Feskens, Bueno de Mesquita, H. B., D. Kromhout, Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study, *The American journal of clinical nutrition* 74 (2001) 227–232.
- [7] I.C. Arts, Jacobs, D. R., Jr., L.J. Harnack, M. Gross, A.R. Folsom, Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women, *Epidemiology* 12 (2001) 668–675.
- [8] M.G. Hertog, E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet* 342 (1993) 1007–1011.
- [9] Statistisches Bundesamt (Destatis), *Statistisches Jahrbuch Deutschland 2014: Kapitel 4 Gesundheit. Todesursachen in Deutschland*, 1st ed., Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2014.
- [10] *Global status report on noncommunicable diseases 2014*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014.

-
- [11] J. Galle, T. Hansen-Hagge, C. Wanner, S. Seibold, Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells, *Atherosclerosis* 185 (2006) 219–226.
- [12] B. Halliwell, Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis, *British journal of experimental pathology* 70 (1989) 737–757.
- [13] J.H. Weisburger, Eat to live, not live to eat, *Nutrition* 16 (2000) 767–773.
- [14] H. Schroeter, C. Heiss, J. Balzer, P. Kleinbongard, C.L. Keen, N.K. Hollenberg, H. Sies, C. Kwik-Urbe, H.H. Schmitz, M. Kelm, (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) 1024–1029.
- [15] C. Heiss, P. Kleinbongard, A. Dejam, S. Perre, H. Schroeter, H. Sies, M. Kelm, Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers, *Journal of the American College of Cardiology* 46 (2005) 1276–1283.
- [16] R. Corti, A.J. Flammer, N.K. Hollenberg, T.F. Luscher, Cocoa and cardiovascular health, *Circulation* 119 (2009) 1433–1441.
- [17] A. Scalbert, G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *The Journal of nutrition* 130 (2000) 2073S–2085.
- [18] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Remesy, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies, *The American journal of clinical nutrition* 81 (2005) 230S–242.
- [19] M.Y. Moridani, H. Scobie, P. Salehi, P.J. O'Brien, Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450, *Chemical research in toxicology* 14 (2001) 841–848.
- [20] S. Baba, N. Osakabe, M. Natsume, Y. Muto, T. Takizawa, J. Terao, In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats, *The Journal of nutrition* 131 (2001) 2885–2891.
- [21] J.I. Ottaviani, T.Y. Momma, C. Heiss, C. Kwik-Urbe, H. Schroeter, C.L. Keen, The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo, *Free radical biology & medicine* 50 (2011) 237–244.
- [22] M.K. Piskula, J. Terao, Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues, *The Journal of nutrition* 128 (1998) 1172–1178.

- [23] R.R. Holt, S.A. Lazarus, M.C. Sullards, Q.Y. Zhu, D.D. Schramm, J.F. Hammerstone, C.G. Fraga, H.H. Schmitz, C.L. Keen, Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa, *The American journal of clinical nutrition* 76 (2002) 798–804.
- [24] W.W. Chen, G.Y. Qin, T. Zhang, W.Y. Feng, In vitro drug metabolism of green tea catechins in human, monkey, dog, rat and mouse hepatocytes, *Drug metabolism letters* 6 (2012) 73–93.
- [25] T. Schewe, Y. Steffen, H. Sies, How do dietary flavanols improve vascular function?: A position paper, *Archives of biochemistry and biophysics* 476 (2008) 102–106.
- [26] S.D. Quine, P.S. Raghu, Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart, *Pharmacological reports PR* 57 (2005) 610–615.
- [27] Y. Steffen, T. Schewe, H. Sies, Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase, *Biochemical and biophysical research communications* 331 (2005) 1277–1283.
- [28] Y. Steffen, T. Schewe, H. Sies, (-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase, *Biochemical and biophysical research communications* 359 (2007) 828–833.
- [29] Y. Steffen, T. Jung, L.O. Klotz, T. Schewe, T. Grune, H. Sies, Protein modification elicited by oxidized low-density lipoprotein (LDL) in endothelial cells: protection by (-)-epicatechin, *Free radical biology & medicine* 42 (2007) 955–970.
- [30] J.I. Ottaviani, T.Y. Momma, G.K. Kuhnle, C.L. Keen, H. Schroeter, Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards, *Free radical biology & medicine* 52 (2012) 1403–1412.
- [31] K.G. Yamazaki, D. Romero-Perez, M. Barraza-Hidalgo, M. Cruz, M. Rivas, B. Cortez-Gomez, G. Ceballos, F. Villarreal, Short- and long-term effects of (-)-epicatechin on myocardial ischemia-reperfusion injury, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 295 (2008) H761-7.
- [32] I. Ramirez-Sanchez, L. Maya, G. Ceballos, F. Villarreal, (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways, *Hypertension* 55 (2010) 1398–1405.

- [33] D. Rein, S. Lotito, R.R. Holt, C.L. Keen, H.H. Schmitz, C.G. Fraga, Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status, *The Journal of nutrition* 130 (2000) 2109S–2114.
- [34] C.G. Fraga, L. Actis-Goretti, J.I. Ottaviani, F. Carrasquedo, S.B. Lotito, S. Lazarus, H.H. Schmitz, C.L. Keen, Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players, *Clinical & developmental immunology* 12 (2005) 11–17.
- [35] C.C. Leonardo, M. Agrawal, N. Singh, J.R. Moore, S. Biswal, S. Dore, Oral administration of the flavanol (-)-epicatechin bolsters endogenous protection against focal ischemia through the Nrf2 cytoprotective pathway, *The European journal of neuroscience* 38 (2013) 3659–3668.
- [36] L.D. DeLeve, N. Kaplowitz, Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, *Pharmacology & therapeutics* 52 (1991) 287–305.
- [37] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Molecular aspects of medicine* 30 (2009) 42–59.
- [38] H.J. Forman, H. Zhang, A. Rinna, Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, *Molecular aspects of medicine* 30 (2009) 1–12.
- [39] Y. Yang, M.Z. Dieter, Y. Chen, H.G. Shertzer, D.W. Nebert, T.P. Dalton, Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response, *The Journal of biological chemistry* 277 (2002) 49446–49452.
- [40] C.S. Huang, L.S. Chang, M.E. Anderson, A. Meister, Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase, *The Journal of biological chemistry* 268 (1993) 19675–19680.
- [41] G.F. Seelig, Simonsen R. P., Reversible Dissociation of Reversible Dissociation of γ -Glutamylcysteine Synthetase into Two Subunits*, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (1984) pp. 9345–9347.
- [42] T. Nguyen, P.J. Sherratt, H.C. Huang, C.S. Yang, C.B. Pickett, Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome, *The Journal of biological chemistry* 278 (2003) 4536–4541.

- [43] S. Payabvash, M.H. Ghahremani, A. Goliaei, A. Mandegary, H. Shafaroodi, M. Amanlou, A.R. Dehpour, Nitric oxide modulates glutathione synthesis during endotoxemia, *Free radical biology & medicine* 41 (2006) 1817–1828.
- [44] M. Ookhtens, N. Kaplowitz, Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine, *Seminars in liver disease* 18 (1998) 313–329.
- [45] B.H. Lauterburg, S. Davies, J.R. Mitchell, Ethanol suppresses hepatic glutathione synthesis in rats in vivo, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 230 (1984) 7–11.
- [46] H. Speisky, A. MacDonald, G. Giles, H. Orrego, Y. Israel, Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies, *The Biochemical journal* 225 (1985) 565–572.
- [47] A. Pompella, A. Corti, A. Paolicchi, C. Giommarelli, F. Zunino, Gamma-glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance, *Current opinion in pharmacology* 7 (2007) 360–366.
- [48] J. Martensson, A. Jain, W. Frayer, A. Meister, Glutathione metabolism in the lung: inhibition of its synthesis leads to lamellar body and mitochondrial defects, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989) 5296–5300.
- [49] J.W. Fahey, P. Talalay, Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes, *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 37 (1999) 973–979.
- [50] K.K. Griendling, D. Sorescu, M. Ushio-Fukai, NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease, *Circulation research* 86 (2000) 494–501.
- [51] Y. Ding, K.J. Choi, J.H. Kim, X. Han, Y. Piao, J.H. Jeong, W. Choe, I. Kang, J. Ha, H.J. Forman, J. Lee, K.S. Yoon, S.S. Kim, Endogenous hydrogen peroxide regulates glutathione redox via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 downstream of phosphatidylinositol 3-kinase during muscle differentiation, *The American journal of pathology* 172 (2008) 1529–1541.
- [52] C.A. Piantadosi, M.S. Carraway, A. Babiker, H.B. Suliman, Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1, *Circulation research* 103 (2008) 1232–1240.
- [53] H.B. Suliman, M.S. Carraway, L.G. Tatro, C.A. Piantadosi, A new activating role for CO in cardiac mitochondrial biogenesis, *Journal of cell science* 120 (2007) 299–308.

- [54] G. Wu, Y.Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton, N.D. Turner, Glutathione metabolism and its implications for health, *The Journal of nutrition* 134 (2004) 489–492.
- [55] M.M. Cortese, C.V. Suschek, W. Wetzel, K.D. Kroncke, V. Kolb-Bachofen, Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis, *Free radical biology & medicine* 44 (2008) 2002–2012.
- [56] J.D. Hayes, D.J. Pulford, The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 30 (1995) 445–600.
- [57] A.E. Mitchell, S.A. Burns, J.L. Rudolf, Isozyme- and gender-specific induction of glutathione S-transferases by flavonoids, *Archives of toxicology* 81 (2007) 777–784.
- [58] A.E. Mitchell, D. Morin, J. Lakritz, A.D. Jones, Quantitative profiling of tissue- and gender-related expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the mouse, *The Biochemical journal* 325 (Pt 1) (1997) 207–216.
- [59] T.R. Knight, S. Choudhuri, C.D. Klaassen, Constitutive mRNA expression of various glutathione S-transferase isoforms in different tissues of mice, *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology* 100 (2007) 513–524.
- [60] A. Ramond, D. Godin-Ribuot, C. Ribaut, P. Totoson, I. Koritchneva, S. Cachot, P. Levy, M. Joyeux-Faure, Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia, *Fundamental & clinical pharmacology* 27 (2013) 252–261.
- [61] K.G. Yamazaki, P.R. Taub, M. Barraza-Hidalgo, M.M. Rivas, A.C. Zambon, G. Ceballos, F.J. Villarreal, Effects of (-)-epicatechin on myocardial infarct size and left ventricular remodeling after permanent coronary occlusion, *Journal of the American College of Cardiology* 55 (2010) 2869–2876.
- [62] H.Y. Cho, S.P. Reddy, S.R. Kleeberger, Nrf2 defends the lung from oxidative stress, *Antioxidants & redox signaling* 8 (2006) 76–87.
- [63] A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V.D. Tata, A.F. Casini, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochemical pharmacology* 66 (2003) 1499–1503.
- [64] K. Itoh, T. Ishii, N. Wakabayashi, M. Yamamoto, Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress, *Free radical research* 31 (1999) 319–324.
- [65] P. Moï, K. Chan, I. Asunis, A. Cao, Y.W. Kan, Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994) 9926–9930.

- [66] K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, Y. Nabeshima, An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochemical and biophysical research communications* 236 (1997) 313–322.
- [67] K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel, M. Yamamoto, Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes & development* 13 (1999) 76–86.
- [68] M.J. Evans, R.C. Scarpulla, Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences, *The Journal of biological chemistry* 264 (1989) 14361–14368.
- [69] T. Ishii, Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-inducible Genes in Macrophages, *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 16023–16029.
- [70] M.K. Kwak, K. Itoh, M. Yamamoto, T.R. Sutter, T.W. Kensler, Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione, *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 7 (2001) 135–145.
- [71] S. Shin, N. Wakabayashi, V. Misra, S. Biswal, G.H. Lee, E.S. Agoston, M. Yamamoto, T.W. Kensler, NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: influence on adipogenesis, *Molecular and cellular biology* 27 (2007) 7188–7197.
- [72] D. Roy, R. Tamuli, NRF1 (nuclear respiratory factor 1), *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2009;13(11):861-864. 13 (2009) 4.
- [73] A.B. Granado-Serrano, M.A. Martin, G. Haegeman, L. Goya, L. Bravo, S. Ramos, Epicatechin induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells, *The British journal of nutrition* 103 (2010) 168–179.
- [74] M.A. Martin, S. Ramos, R. Mateos, M. Izquierdo-Pulido, L. Bravo, L. Goya, Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by the flavonoid epicatechin, *Phytotherapy research PTR* 24 (2010) 503–509.
- [75] P.K. Bahia, M. Rattray, R.J. Williams, Dietary flavonoid (-)epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant response element activity and up-

- regulates glutathione in cortical astrocytes, *Journal of neurochemistry* 106 (2008) 2194–2204.
- [76] T. Brossette, C. Hundsdorfer, K.D. Kroncke, H. Sies, W. Stahl, Direct evidence that (-)-epicatechin increases nitric oxide levels in human endothelial cells, *European journal of nutrition* 50 (2011) 595–599.
- [77] H. Dreger, M. Lorenz, A. Kehrer, G. Baumann, K. Stangl, V. Stangl, Characteristics of catechin- and theaflavin-mediated cardioprotection, *Exp Biol Med (Maywood)* 233 (2008) 427–433.
- [78] A. Anwar-Mohamed, O.S. Degenhardt, El Gendy, M. A., J.M. Seubert, S.R. Kleeberger, A.O. El-Kadi, The effect of Nrf2 knockout on the constitutive expression of drug metabolizing enzymes and transporters in C57Bl/6 mice livers, *Toxicology in vitro an international journal published in association with BIBRA* 25 (2011) 785–795.
- [79] M.G. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic, et al., Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study, *Archives of internal medicine* 155 (1995) 381–386.
- [80] H. Zhang, A. Shih, A. Rinna, H.J. Forman, Resveratrol and 4-hydroxynonenal act in concert to increase glutamate cysteine ligase expression and glutathione in human bronchial epithelial cells, *Archives of biochemistry and biophysics* 481 (2009) 110–115.
- [81] D.M. Krzywanski, D.A. Dickinson, K.E. Iles, A.F. Wigley, C.C. Franklin, R.M. Liu, T.J. Kavanagh, H.J. Forman, Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress, *Archives of biochemistry and biophysics* 423 (2004) 116–125.
- [82] A.L. Al-Malki, S.S. Moselhy, The protective effect of epicatechin against oxidative stress and nephrotoxicity in rats induced by cyclosporine, *Human & experimental toxicology* 30 (2011) 145–151.
- [83] A. Agarwal, R. Prasad, A. Jain, Effect of green tea extract (catechins) in reducing oxidative stress seen in patients of pulmonary tuberculosis on DOTS Cat I regimen, *Phytomedicine international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17 (2010) 23–27.
- [84] P.S. Prince, A biochemical, electrocardiographic, electrophoretic, histopathological and in vitro study on the protective effects of (-)epicatechin in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats, *European journal of pharmacology* 671 (2011) 95–101.

- [85] O.W. Griffith, Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free radical biology & medicine* 27 (1999) 922–935.
- [86] H. Jaeschke, A. Wendel, Cholestasis and increased biliary efflux of glutathione induced by phenolic antioxidants in rats, *Toxicology* 52 (1988) 225–235.
- [87] S.C. Lu, C. Garcia-Ruiz, J. Kuhlenkamp, M. Ookhtens, M. Salas-Prato, N. Kaplowitz, Hormonal regulation of glutathione efflux, *The Journal of biological chemistry* 265 (1990) 16088–16095.
- [88] O.W. Griffith, R.T. Mulcahy, The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase, *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 73 (1999) 209–67, xii.
- [89] B.H. Lauterburg, J.D. Adams, J.R. Mitchell, Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover, *Hepatology* 4 (1984) 586–590.
- [90] X.-L. Tan, M. Shi, H. Tang, W. Han, S.D. Spivack, Candidate dietary phytochemicals modulate expression of phase II enzymes GSTP1 and NQO1 in human lung cells, *The Journal of nutrition* 140 (2010) 1404–1410.
- [91] C. Xia, J. Hu, B. Ketterer, J.B. Taylor, The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status, *The Biochemical journal* 313 (Pt 1) (1996) 155–161.
- [92] M.P. Marinovic, A.C. Morandi, R. Otton, Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFkappaB p65 signal pathway, *Toxicology in vitro an international journal published in association with BIBRA* 29 (2015) 1766–1778.
- [93] C.F. Chang, S. Cho, J. Wang, (-)-Epicatechin protects hemorrhagic brain via synergistic Nrf2 pathways, *Annals of clinical and translational neurology* 1 (2014) 258–271.
- [94] A.L. Al-Malki, S.S. Moselhy, Protective effect of vitamin E and epicatechin against nicotine-induced oxidative stress in rats, *Toxicology and industrial health* 29 (2013) 202–208.
- [95] Y.V. Simos, Verginadis, II, I.K. Toliopoulos, A.P. Velalopoulou, I.V. Karagounis, S.C. Karkabounas, A.M. Evangelou, Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo, *Redox report communications in free radical research* 17 (2012) 181–186.

- [96] H. Zhu, K. Itoh, M. Yamamoto, J.L. Zweier, Y. Li, Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury, *FEBS letters* 579 (2005) 3029–3036.
- [97] N. Sriram, S. Kalayarasan, G. Sudhandiran, Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling, *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 22 (2009) 221–236.
- [98] L. Li, H. Dong, E. Song, X. Xu, L. Liu, Y. Song, Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling, *Chemico-biological interactions* 209C (2013) 56–67.
- [99] T. Nguyen, P. Nioi, C.B. Pickett, The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress, *The Journal of biological chemistry* 284 (2009) 13291–13295.
- [100] J.J. Briedé, van Delft, Joost M H, de Kok, Theo M C M, van Herwijnen, Marcel H M, L.M. Maas, R.W.H. Gottschalk, J.C.S. Kleinjans, Global gene expression analysis reveals differences in cellular responses to hydroxyl- and superoxide anion radical-induced oxidative stress in caco-2 cells, *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology* 114 (2010) 193–203.
- [101] M. Gomez-Guzman, R. Jimenez, M. Sanchez, M.J. Zarzuelo, P. Galindo, A.M. Quintela, R. Lopez-Sepulveda, M. Romero, J. Tamargo, F. Vargas, F. Perez-Vizcaino, J. Duarte, Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension, *Free radical biology & medicine* 52 (2012) 70–79.
- [102] S.K. Biswas, I. Rahman, Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione, *Molecular aspects of medicine* 30 (2009) 60–76.
- [103] R.R. Bartz, H.B. Suliman, C.A. Piantadosi, Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection, *Frontiers in physiology* 6 (2015) 291.
- [104] E. Nisoli, M.O. Carruba, Nitric oxide and mitochondrial biogenesis, *Journal of cell science* 119 (2006) 2855–2862.
- [105] T.L. Merry, M. Ristow, Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and antioxidant response in mice, *The Journal of physiology* (2016).

Danksagung

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Prof. Dr. med. Malte Kelm und PD Dr. med. Christian Heiß, der meine damalige Bewerbung an meine Doktormutter leitete und somit die Möglichkeit zur Durchführung der Doktorarbeit gab.

Meiner Doktormutter PD Dr.rer.nat. Dr. Miriam M. Cortese-Krott, die mir gezeigt hat was wissenschaftliche Forschung bedeutet. Dank ihr kam es zur Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Tomasz Krenz, der zusammen mit PD Dr.rer.nat. Dr. Cortese-Krott die Idee für die Doktorarbeit erarbeitet und mir zusammen mit Sivatharsini Thasian-Sivarajah viele Tipps und Anleitungen gegeben hat.

Für das fachliche Wissen und die praktischen Hinweisen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Kardiologischen Labors bedanken.

Es hat mich sehr unterstützt und mir in vielerlei Hinsicht den Weg geebnet.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Freunden, die mich unterstützten, mir Rückhalt, Vertrauen und Zuversicht gaben. Und natürlich wäre ohne ihre Großzügigkeit nichts von alledem möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift