

Tee-Catechine in pflanzlichen, tierischen und bakteriellen Zellen:
Aspekte zu ihrer biologischen Rolle

Prof. Dr. Walter Feucht, Department für Pflanzenwissenschaften, Lehrstuhl für Obstbau, Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) der TU München, D-85350 Freising

Prof. Dr. Jürgen Polster, Department für Biowissenschaftliche Grundlagen, Lehrstuhl für Biologische Chemie, FG Physikalische Biochemie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) der TU München, D-85350 Freising

Einleitung

Bis zu ca. ein Drittel der Trockensubstanz von Tee (*Camellia sinensis*) besteht aus so genannten Tee-Catechine (Flavan-3-olen). Diese Inhaltsstoffe, die auch in relativ großen Mengen in Blättern, Blüten bzw. Früchten der meisten einheimischen Nadel- und Obstbäumen vorkommen, spielen eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Wundheilungsprozessen, aber auch bei der Resistenz-Entstehung und als Radikalfänger. Der folgende Beitrag stellt Zusammenhänge dar, bei denen auch allgemeine, neue biochemische Aspekte berücksichtigt werden.

Tee-Catechine in Pflanzen

Hauptvertreter der monomeren Tee-Catechine (Flavan-3-ole) sind: (-)-Epi-gallocatechin-3-O-gallat (EGCG), (-)-Epicatechin-3-O-gallat (ECG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin (EC), (+)-Catechin (C) und (+)-Gallocatechin (GC) (Haslam 1998, Wiseman et al. 2001). Zahlreiche oligomere und polymere Catechinstrukturen sind bekannt, die sich aus den monomeren Bausteinen zusammensetzen und ebenfalls zu den Catechinen zählen (Haslam 1998). Die Catechine kommen nicht nur im Tee in relativ hoher Konzentration vor, sie wurden auch in vielen Baumarten nachgewiesen. Offenbar üben die Catechine bei Pflanzen verschiedene Funktionen aus.

Sie spielen eine besondere Rolle

- bei Entwicklungsprozessen (Feucht et al. 1997a)
- bei der Resistenz (Feucht et al. 1997b)
- als Juvenilfaktoren bei Wundheilungs-Prozessen (Feucht et al. 1996) und
- als Radikalfänger (Antioxidantien, s.u.)

Hierüber und über neue Befunde der biochemischen Lokalisation und Wirkung von Catechinen in Tier- und Bakterienzellen wird nachfolgend berichtet. Wesentliche Aspekte konnten hier nur dadurch gefunden werden, dass 'Catechine' durch eine Blaufärbung visualisiert werden können.

Das DMAZA-Reagenz zur Visualisierung von Catechinen

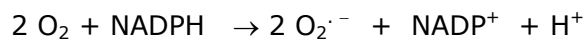
Von den 6000 in der Natur vorkommenden Polyphenolen bilden die Flavan-3-ole nur eine kleine Stoffklasse. Mit Hilfe eines spezifischen Verfahrens (DMAZA-Reaktion, s. Reaktionsschema: histologische Feucht-Reaktion) können mono-, oligo- und polymere Catechine durch Blaufärbung 'visualisiert' werden. Dadurch können Catechine beispielsweise in Fruchtsäften, aber auch in Pflanzen (nach Extraktion) auf HPLC-Basis quantitativ bestimmt werden (Treutter 1989; Treutter et al. 1994 a, b). Ebenso können auf DMAZA-Basis Catechine im Blutplasma bestimmt und so das Resorptionsverhalten von Inhaltsstoffen des Tees, Weins und von Früchten im Darm analysiert werden (Kivitis et al. 1997). Durch diese spezifische Reaktion können Catechine direkt in pflanzlichen und tierischen Geweben histologisch lokalisiert werden. Selbst innerhalb einer Zelle ist dieses möglich (s. Abb. 1, Antherenzellen der Tee-Blüte).

Catechine und ROS (reactive oxygen species)

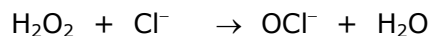
Das chemische Reaktionsverhalten der Catechine ist besonders gut in ihren Antioxidanzeigenschaften gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) studiert (Haslam 1998). Diese Eigenschaft ist beispielsweise dann von Nutzen, wenn ROS wie Peroxynitrit (HOONO) von Säugetierzellen gebildet werden, um damit Infektionen von Mikroorganismen abzuwehren. Peroxynitrit kann aus dem Superoxidanionradikal ($O_2^{\cdot-}$) und Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) in einer diffusionskontrollierten Reaktion entstehen. Wenn die Bildung von Peroxynitrit zu stark ist, können unkontrollierte Oxidations- und Nitrierungsreaktionen im Gewebe ablaufen und so

Proteine, Nukleinsäuren und Lipide verändert werden. Solche unerwünschte Nebenreaktionen lassen sich durch (-)-Epicatechin unterdrücken. Ausbalancierte Abwehrreaktionen sind so möglich, wie experimentell gezeigt wurde (Schroeder et al. 2001).

ROS wie z.B. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) scheinen in Säugetierzellen auch zentrale Signalkettenreaktionen positiv oder negativ beeinflussen zu können. So kann $^1\text{O}_2$ aus dem molekularen Sauerstoff und NADPH mit Hilfe der NADPH-Oxidase gebildet und weiter zu Wasserstoff-peroxid (H_2O_2) umgewandelt werden (Klotz et al. 2003):



Wasserstoffperoxid ist ein Substrat der Myeloperoxidase, das Chlorid-Anionen zu Hypochlorit (OCl^-) umsetzt. OCl^- reagiert seinerseits mit Wasserstoffperoxid zu Singulett-Sauerstoff (Klotz et al. 2003):



Die ROS $^1\text{O}_2$, H_2O_2 und HOONO können Signalübertragungsreaktionen in der Zelle beeinflussen, die für die Genaktivierung, Zellteilung und Zellstressbewältigung wichtig sind (Klotz et al. 2003; Schieke et al. 1999; Wang et al. 1998). Besonders betroffen sind hiervon die mitogenaktivierten Protein-Kinasen (MAPK), die mehrere Unterfamilien enthalten. Demnach können ROS durch ihre Aktivierung von MAPKs regulierende Funktion auf der Transkriptionsebene ausüben. In dieses komplexe Regulationswerk können Catechine nicht nur durch ihre Antioxidanzwirkung Einfluss nehmen, sondern vermutlich auch durch direkte Genregulation, da sie an den Nucleosomen des Zellkerns angetroffen werden (s. unten).

Tee-Catechine in menschlichen Zellen

Der Mensch kann durch Tee-, Wein- und Obst(saft)-Konsum Catechine bis in den Grammbereich aufnehmen. Welcher Einfluss dadurch auf die hochkomplexe Darmflora ausgeübt wird, ist schwierig abzuschätzen. Die Biofilmbildung der Bakterien und ihr

molekulares Kommunikationssystem (Quorum-Sensing) dürften davon nicht unerheblich tangiert sein (s. unten). Nur ein relativ kleiner Teil der Catechine wird (im micromolaren Bereich) in das Blutplasma und in den Urin überführt. Dabei werden die Catechine meistens metabolisiert und in Glucuronide und Sulfolglucuronide überführt (Baba et al. 2001). Es gibt Hinweise, dass Catechin und Epicatechin kompetitiv im Gastrointestinaltrakt (von Ratten) absorbiert werden. Beim Menschen wird nach ca. 1-3 h ein 'Catechin-Maximum' (Catechin, Epicatechin) im Urin beobachtet (Yang et al. 2000).

Durch den Teegenuss sind Zellen der menschlichen Mundhöhle relativ hohen Catechinkonzentrationen ausgesetzt (eine Kanne mit grünem Tee kann bis zu einem Gramm Catechine enthalten - je nach der Menge eingesetztem Tee und Aufbrühzeit bei 80° C). In welchem Ausmaß diese Zellen Catechine aufnehmen können, ist unbekannt. Jedoch gibt es erste Hinweise bei Zellen, die im Speichel vorkommen (vorzugsweise Epithelzellen; beim Zahnfleischbluten auch Leukozyten). Behandelt man Speichel nach 5-10 minütigem Teetrinken mit dem DMAZA-Reagenz, können Zellen mit blauen Kernen gefunden werden (s. Abb. 2). Der Speichel selbst zeigt auch eine diffuse Blaufärbung. Da im Speichel prolinreiche Proteine (PRP) vorkommen, die eine ausgeprägte Affinität zu Catechinen haben (Haslam 1998), ist dieser Befund nicht überraschend. Offenbar kann der Speichel eine Catechin-Speicherfunktion ausüben. Offensichtlich haben auch menschliche Zellen das Potential, eine ausreichende Menge an Catechinen aufzunehmen, so dass ihre Anwesenheit im Zellkern visualisiert werden kann.

Als Ergebnis steht damit fest: Menschliche Zellen können – ebenso wie pflanzliche und tierische Zellen (Feucht et al. 2004; Polster et al. 2002) – Catechine im Zellkern akkumulieren. Welche Funktion sie dort ausüben, ist noch weitgehend ungeklärt. Auch ist noch nicht völlig sicher, welche Zellkernkomponenten die 'targets' (Zielorte) der Catechine sind. Es gibt Hinweise, dass die targets die Nucleosomen des Chromatingerüsts (Chromosomen) sind und hier die Histon-Proteine der Oktamer-Komplexe, um die die DNA aufgewickelt ist (Polster et al. 2003).

Der Einfluß von Tee-Catechinen auf die bakterielle Biofilmbildung und das 'Quorum-Sensing-System'

Bakterien bevorzugen es nicht, in Lösungen als Einzelzeller zu schweben, vielmehr heften sie sich an benetzte Oberflächen an und bilden dort Kolonien mit einer erstaunlichen Vielfalt an Lebensgemeinschaften. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie

erkannte man, dass die Bakterien innerhalb von 'Biofilmen' in winzigen Enklaven leben. In einer extrazellulären Matrix, die die Bakterien selber bilden (z. B. auf Alginatbasis), nisten sich Mikrokolonien ein, die durch Wasserkanäle miteinander verbunden sind. Dabei können mehrere Bakterienarten in einem Biofilm integriert sein (Casterton, Stewart 2001).

Solche bakteriellen Biofilme sind in der Natur weit verbreitet. Beispielsweise bilden sich im Verdauungstrakt von Rindern (und anderen Wiederkäuern) auf dem Grünfutter Biofilme mit Bakterien, die u. a. die pflanzliche Zellulose abbauen. Schließlich werden die gebildeten Biofilme von den Rindern verdaut. In der Medizin können sie zu hartnäckigen Infektionen führen (z. B. bei Mukoviszidose-Patienten, Organtransplantationen, Implantaten).

Bakterienzellen verfügen über ein molekulares Kommunikationssystem, indem sie Botenstoffe austauschen. Unter den Gram-negativen Bakterien sind die am weitest verbreiteten Signalstoffe N-Acyl-homoserin-lactone (AHLs). Diese Stoffe werden mit Hilfe einer AHL-Synthase gebildet. Bei kleiner Bakteriendichte wird nur relativ wenig AHL gebildet. Mit zunehmender Dichte steigt die AHL-Konzentration im Medium an. Wenn ein bestimmter Schwellenwert erreicht ist, bindet AHL an einen spezifischen 'AHL-Rezeptor', der seinerseits 'Target-Gene' aktiviert bzw. inaktiviert. Dieser Mechanismus wird als 'Quorum-Sensing' bezeichnet (Fuqua et al. 1994). Dadurch können Dutzende von Genen ihre Aktivität ändern und so z. B. die Biofilmbildung stark anregen.

Für die menschliche Ernährung und Medizin ist es eine große Herausforderung, die Biofilmbildung und das Quorum-Sensing System mit einfachen Medikamenten oder Pflanzeninhaltsstoffen zu stören.

Die australische Makroalge *Delisea pulchra* bildet halogenierte Furanone, die das Quorum-Sensing System effektiv stören können (de Nys et al. 1993; Manefield et al. 2002). Damit war gezeigt, dass es natürliche Stoffe gibt, die in das bakterielle Kommunikationssystem direkt eingreifen. Gibt es auch solche Stoffe, die in der menschlichen Ernährung enthalten sind? Wie in einer neuen Studie gezeigt wurde, ist dazu auch eine der Hauptkomponenten des (grünen) Tees in der Lage: EGCG ((-)-Epigallocatechin-3-O-gallat).

Zunächst wurde mit Hilfe des Bakteriums *Burkholderia cepacia* gezeigt, dass EGCG in einer Konzentration von 40 µg/ml die Biofilmbildung zu 30 % hemmt (im Vergleich zum

Kontrollversuch, bei dem kein EGCG zugesetzt wurde). Bei der eingesetzten EGCG-Konzentration wurde das Bakterienwachstum selbst nicht gehemmt (Huber et al. 2003). (Ellagsäure, die z. B. in der Himbeere vorkommt, hemmt bei derselben Konzentration die Biofilmbildung zu ca. 50 %).

Dieses Ergebnis ließ vermuten, das EGCG auch das Quorum-Sensing beeinflussen kann. Um das aufzuzeigen, wurden zwei gentechnisch veränderte Bakterienstämme eingesetzt: *E. coli* mit dem Sensor-Plasmid pSB403 und *Pseudomonas putida* mit dem Sensor-Plasmid pKR-C12. Durch die so veränderten Bakterienstämme konnten durch Biolumineszenz- und Fluoreszenzmessung die Wirkung von EGCG im Vergleich zur Kontrolle relativ einfach bestimmt werden (Huber et al. 2003):

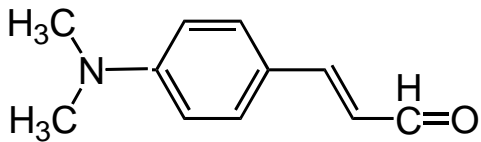
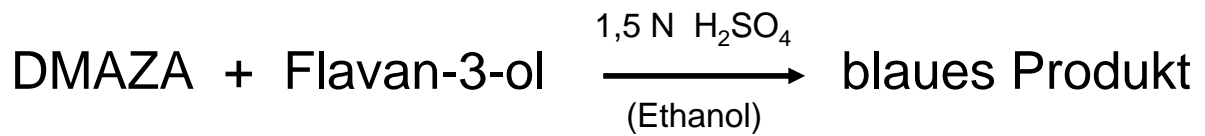
Tabelle zur Inhibition des Quorum-Sensing Systems

EGCG (Konzentration: µg/ml)	<i>E. coli</i> Hemmung in %	<i>Pseudomonas putida</i> Hemmung in %
1.3	0	-
2.5	-	9
5	15	28
20	19	38
40	55	39

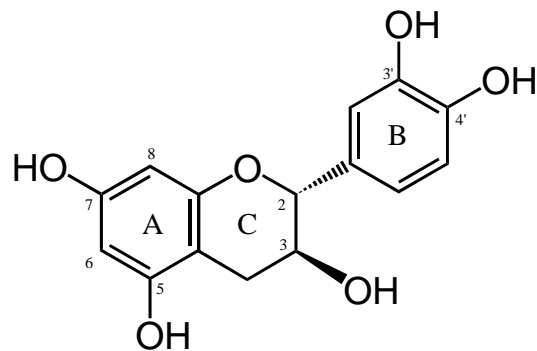
Damit ist erstmals gezeigt worden, dass Tee-Catechine das Potential besitzen, das Quorum-Sensing System von Gram-negativen Bakterien zu beeinflussen (dasselbe trifft auch für Ellagsäure und Tannine zu (Huber et al. 2003)).



Histologische Feucht - Reaktion



DMAZA
p-Dimethylamino-Zimtaldehyd



Catechin
als ein Beispiel für ein Flavan-3-ol

Reaktionsschema

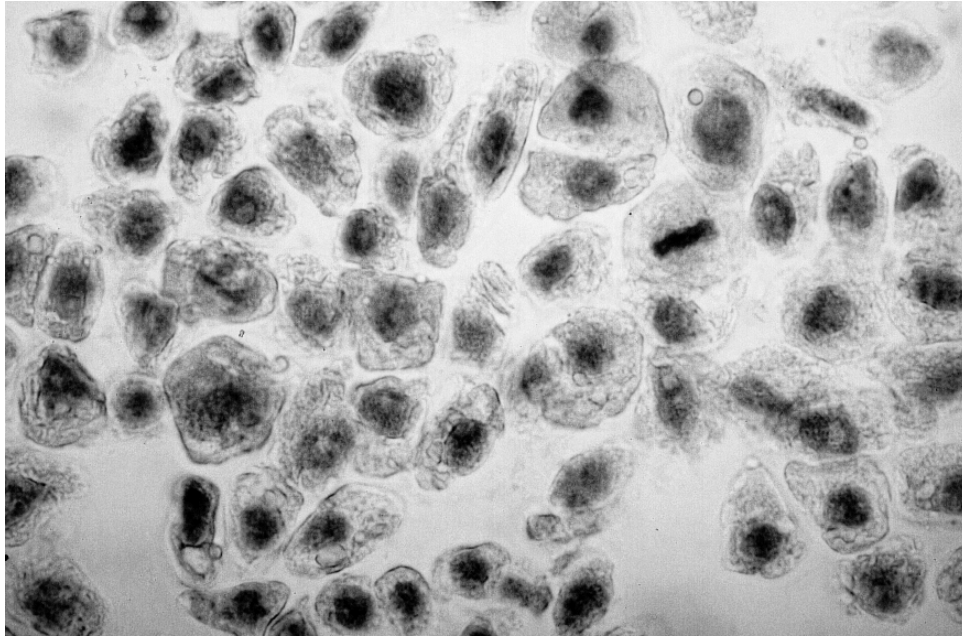


Abb. 1 Antherenzellen der Teeblüte mit catechin-assoziierten Kernen

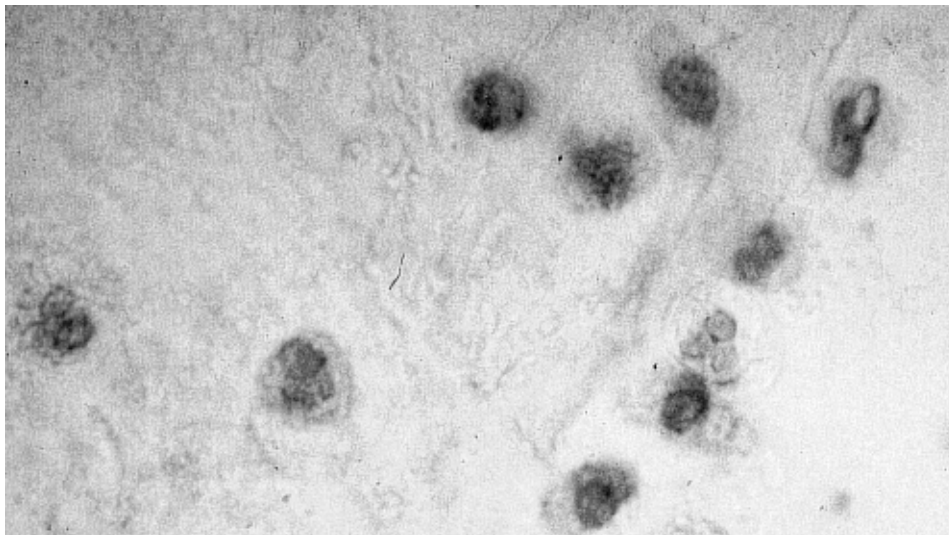


Abb. 2 Speichelzellen vom Menschen, 5–10 min nach Aufnahme von grünem Tee

Literatur

Baba, S; Osakabe, N; Natsume, M; Muto, Y; Takizawa, T; Terao, J (2001). In vivo comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *J. Nutrition* 131: 2885–2891

Casterton, J W; Stewart, P S (2001). Bekämpfung bakterieller Biofilme. *Spektrum der Wissenschaft* 11: 58–65

De Nys, R; Wright, A D; König, G M; Sticker, O (1993). New halogenated furanones from the marine alga *Delisea pulchra*. *Tetrahedron* 49: 11213–11220

Feucht, W; Treutter, D; Polster, J (2004). Flavanol binding of nuclei from tree species. *Plant Cell Reports* 22: 430–436

Feucht, W; Dirr, U; Treutter, D; Santos-Buelga, C (1997a). Leaching properties of antimicrobial Prunus phenols. *J. Plant Diseases and Protection* 104:370–379

Feucht, W; Treutter, D; Christ, E (1997b). Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black Forest. *Tree Physiol.* 17: 335–340

Feucht, W; Treutter, D; Christ, E (1996). Flavanols in grape vine: *in vitro* accumulation and defence reactions in shoots. *Vitis* 35: 113–118

Fuqua, W C; Winans, S C; Greenberg, E P (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269–275

Haslam, E (1998): *Practical Polyphenols*. Cambridge, University Press

Huber, B; Eberl, L; Feucht, W; Polster, J (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Z. Naturforsch.* 58c: 879–884

Kivitis, G A A; van der Sman, F J P; Tijburg, L B M (1997). Analysis of catechins from green and black tea in humans: a specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 48: 387–392

Klotz, L O; Kröncke, K D; Sies, H (2003). Singulet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 88–94

Manefield, M; Rasmussen, T B; Hentzer, M; Andersen, J B; Steinberg, P; Kjelleberg S; Givskov, M (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology* 148: 1119–1127

Polster, J; Feucht, W; Bauer, J (2002). Nuclei of bovine tissues as a sink for flavanols and flavonols. *Adv. Food Sci.* 24: 73–78

Polster, J; Dithmar, H; Feucht, W (2003). Are histones the targets for flavan-3-ols (catechins) in nuclei? *Biol. Chem.* 384: 997–1006

Schieke, S M; Briviba, K; Klotz, L O; Sies, H (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* 448: 301–303

Schroeder, P; Zhang, H; Klotz L O ; Kalyanaraman B; Sies, H (2001). (-)-Epicatechin inhibits nitration and dimerisation of tyrosine in hydrophilic as well as hydrophobic environments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 1334–1338

Treutter, D; Santos-Buelga, C and Feucht, W (1994 a). Determination of catechins and procyanidins in plant extracts - comparison of methods. *Acta Hort.* 381: 384–388

Treutter, D; Santos-Buelga, C; Gutmann, M; Kolodziej, K (1994 b). Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *J. Chromatogr. A* 667: 290–297

Treutter, D (1989). Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr.* 467: 185–193

Wang, X; Martindale, J L; Lin, Y; Holbrook, N J (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem. J.* 333: 291–300



Deutsches Tee-Institut

Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee

Wiseman, S; Waterhouse, A; Korver, O; Clifford, M; Engelhardt, U; Wan, XC; Hoffman, PCH; Rice-Evans, C; Terao, J; Gross, M; Beecher, G (2001). Special issue: The health effects of tea and tea components. Crit. Rev. Food Sci. & Nutri. 41: 387–412 Suppl. S 2001

Yang, B; Arai, K; Kusu, F (2000). Determination of catechins in human urine subsequent to tea ingestion by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Analyt. Biochem. 283: 77–82



Deutsches Tee-Institut

Wissenschaftlicher Informationsdienst Tee
