

# **Wirkmechanismen der Resveratrol-Behandlung in Fibroblasten**

## **Masterarbeit**

im Master-Studiengang Biotechnologie /  
Biotechnology  
der Beuth Hochschule für Technik Berlin  
-University of Applied Sciences-

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Master of Science (M.Sc.)

vorgelegt von  
Sylvia Justina Wowro  
Berlin, April 2012

## Danksagung



Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck Institut für molekulare Genetik, Otto-Warburg Laboratorien, in der Arbeitsgruppe „Nutrigenomics and Gene Regulation“ durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Sascha Sauer für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während der Masterarbeit danken.

Ein großer Dank geht auch an Annabell Witzke, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in vielen Fragestellungen unterstützt hat.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen für die nette Aufnahme ins Labor, die Hilfsbereitschaft sowie für ihre Unterstützung bedanken.

## Abkürzungsverzeichnis

ACACA	Acety-CoA Carboxylase
ACC	Acety-CoA Carboxylase
ACLY	ATP-Citrat-Lyase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
β-ACT	Beta-Aktin
BSA	Rinderserumalbumin
CamKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen
CamKKβ	Calcium/Calmodulin-Kinase Kinase-β
CAT	Katalase
cDNA	Komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase-2
CREB	CAMP Responseelement Bindeprotein
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dubecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EP300	E1A Bindendes Protein p300
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Rinderserum
FOXO	Forkhead-Box-Protein
GSR	Glutathion Reduktase
HRP	Meerrettichperoxidase
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
kD	Kilodalton
LKB1	Serine-Threonin Leberkinase B1
LSD	Lithiumdodecylsulfat
LXR	Leber-X-Rezeptor

mA	Milliampere
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mtDNA	Mitochondriale DNA
NAD+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAM	Nicotinamid
Nampt	Nicotinamidphosphosyltransferase
nDNA	Nukleare DNA
NFE2L2	NF-E2 verwandter Faktor 2
NHDF	Normal humane dermale Fibroblasten
NMN	Nicotinamidmononukleotid
Nmnat	Nicotinamidmononukleotid-Adenyltransferase
NR	Nuklear Rezeptor
OD	Optische Dichte
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE1 $\alpha$	Pyruvat Dehydrogenase Untereinheit E1 $\alpha$
PDE4	Phosphodiesterase 4
PDK	Pyruvat-Dehydrogenase Kinase
PGC- 1 $\alpha$	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Coaktivator 1 alpha
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PTGS	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen
RSV	Resveratrol
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate / Natriumdodecylsulfat
Sir/Sirt	Silent information regulator 2
SOD	Superoxid-Dismutase
STDEV	Standardabweichung
TBST	Trisgepufferte Salzlösung + Tween
UCP	Entkopplerprotein
UV	Ultraviolett

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Resveratrol .....	1
1.2	Oxidativer Stress .....	4
1.2.1	Oxidativer Stress und Resveratrol .....	5
1.3	Sirtuine .....	6
1.3.1	SIRT1 Aktivierung durch Resveratrol .....	9
1.4	Haut .....	9
1.5	Zielsetzung .....	11
2	Material und Methoden .....	12
2.1	Material .....	12
2.1.1	Chemikalien .....	12
2.1.2	Lösungen und Puffer .....	13
2.1.3	Kits .....	13
2.1.4	Enzyme .....	14
2.1.5	Zellkultur und Zellkulturmedien .....	14
2.1.6	Antikörper .....	15
2.1.7	Primer & Sonden .....	16
2.1.8	Material und Geräte .....	17
2.2	Methoden .....	18
2.2.1	Zellkulturmethoden .....	18
2.2.1.1	Kultivierung und Subkultivierung normaler humaner dermale Fibroblasten (NHDF) .....	18
2.2.1.2	Kryokonservierung und Inkulturnahmen .....	18
2.2.1.3	Zytotoxizitätsbestimmung .....	19
2.2.1.4	Behandlung der NHDF mit Resveratrol .....	20
2.2.2	Genexpressionsanalyse .....	20
2.2.2.1	RNA-Isolation .....	20
2.2.2.2	Reverse Transkription .....	21
2.2.2.3	Quantitative Real-Time PCR .....	22
2.2.3	Proteinchemische Methoden .....	23

2.2.3.1	Proteinextraktion (Gesamtzelllysate).....	23
2.2.3.2	Proteinextraktion (nuklearer und zytosolischer Extrakt) .....	23
2.2.3.3	Proteinbestimmung.....	24
2.2.3.4	LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (LDS-PAGE) .....	24
2.2.3.5	Western Blot.....	25
2.2.3.6	Coomassie Färbung .....	26
2.2.3.7	PonceauS-Färbung .....	26
2.2.3.8	Immunologische Proteindetektion.....	26
2.2.3.9	Membranstripping .....	27
2.2.4	Nachweis von Metaboliten.....	27
2.2.4.1	NAD <sup>+</sup> /NADH Bestimmung.....	27
2.2.4.2	Pyruvat-Bestimmung.....	29
2.2.4.3	Laktat-Bestimmung.....	29
2.2.4.4	ATP-Bestimmung.....	30
2.2.4.5	ADP-Bestimmung .....	31
3	Ergebnisse .....	32
3.1	Zytotoxische Wirkung von Resveratrol auf dermale Fibroblasten .....	32
3.2	Effekte von Resveratrol auf die Genexpression dermaler Fibroblasten.....	35
3.3	Effekte von Resveratrol auf die Proteinexpression und Phosphorylierung.....	38
3.4	NAD <sup>+</sup> /NADH Bestimmung.....	44
3.5	Pyruvat und Laktat- Bestimmung .....	45
3.6	ATP/ADP .....	46
4	Diskussion .....	47
4.1	Ausblick .....	56
5	Zusammenfassung.....	57
6	Abstract .....	58
7	Quellen .....	59

## 1 Einleitung

### 1.1 Resveratrol

Der Naturstoff Resveratrol ist im vergangenen Jahrzehnt auf Grund seiner positiven Auswirkung auf den Menschen, inklusive seiner möglichen lebensverlängernden Wirkung stark in den Fokus des öffentlichen Interesses gerückt. Das Polyphenol Resveratrol wird von mehr als 70 Pflanzen gebildet, von denen nur eine geringe Anzahl zu den Essbaren zählt. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist die Weintraube, aber auch in Erdnüssen, Preiselbeeren und Blaubeeren konnte Resveratrol nachgewiesen werden (Burns et al., 2002). Funktionell betrachtet handelt es sich bei Resveratrol um ein Phytoalexin, eine antibiotische Substanz, die die Pflanze vor Infektionen durch Pilze, Bakterien und Viren sowie gegen die Schädigung durch Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung schützt (Langcake, 1976).

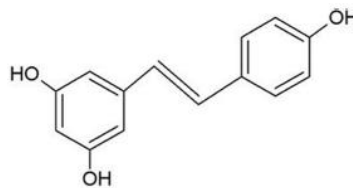


Abbildung 1, Struktur von *trans*-Resveratrol.

Erhöhte Aufmerksamkeit verdankt Resveratrol einem Bericht aus dem Jahre 2003, in dem Resveratrol eine lebensverlängernde Wirkung in Hefen zugeschrieben wurde (Howitz et al., 2003). Die kalorische Restriktion zählte bis dato zur einzigen effektiven Methode Alterungsprozesse zu verzögern, und es wurde angenommen, dass Resveratrol diesen Mechanismus imitieren könnte. Kalorische Restriktion und die daraus resultierenden lebensverlängernde Wirkungen wurden bisher in vielen niederen und höheren Lebewesen untersucht. In Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), Fliegen (*Drosophila melanogaster*) und Würmern (*Caenorhabditis elegans*) konnte nachweislich die Lebensspanne verlängert werden. Dieser Effekt wurde in Säugetieren bisher nicht beobachtet, wengleich die reduzierte Kalorienaufnahme das Einsetzen von altersbedingten Krankheiten verzögern kann (Bordone und Guarente, 2005).

Die molekularen Mechanismen, die der kalorischen Restriktion zugrunde liegen, sind sehr komplex und beinhalten unter anderem die Regulation von bestimmten Genen, die auch als Langlebigkeitsgene bezeichnet werden. Ein solches Gen in der Hefe ist das stark konservierte *SIR2* (*Silent Information Regulator 2*), welches in Säugetieren dem SIRT1 entspricht und die Histon-Deacetylase Sirtuin1 kodiert (eine nähere Beschreibung der Sirtuine erfolgt im Abschnitt 1.3.).

In *Saccharomyces cerevisiae* wurde erstmals nachgewiesen, dass Sirtuine während der kalorischen Restriktion eine erhöhte Aktivität aufweisen. Dadurch wird das Genexpressionsprofil der Zellen so verändert, dass es unter anderem zu einer Verlängerung der Lebensdauer führt (Imai et al., 2000). Ähnliches konnte auch bei Mäusen unter kalorischer Restriktion gezeigt werden, wobei es lediglich zu einer Verminderung von durch das Altern bedingten, progressiven Veränderungen kam (Lee et al., 1999).

Im Mausmodell konnte zum Teil bestätigt werden, dass Resveratrol-Behandlung bei einer Hochfett-Diät zu einer Imitation der kalorischen Restriktion führt. Dabei ist Resveratrol in der Lage mindestens 50% der Stoffwechselwege so zu modulieren, wie diese auch bei der kalorischen Restriktion vorlagen (Baur et al., 2006).

Resveratrol wurden jedoch schon zuvor protektive Eigenschaften zugesprochen, da es maßgeblich für das „Französische Paradoxon“ verantwortlich sein soll. Dieses Phänomen wurde in den 90er Jahren durch Dr. Serge Renaud beschrieben, der die vergleichbar geringe Sterblichkeit der französischen Bevölkerung durch kardiovaskuläre Krankheiten, trotz ihrer fettreichen Ernährung erkannte und diese durch einen moderaten Rotweingenuss begründete (Renaud und Gueguen, 1998).

Wie bereits beschrieben konnte durch die Behandlung mit Resveratrol die Lebensdauer einiger Lebewesen verlängert werden. Dieser Effekt konnte jedoch nicht für Säugetiere nachgewiesen werden. Umfänglichen Erkenntnissen nach ist das Spektrum der für den Menschen relevanten Mechanismen von Resveratrol dennoch sehr umfangreich und verheißungsvoll (Pearson et al., 2008; Timmers et al., 2011). So konnte gezeigt werden, dass Resveratrol die Entstehung von proinflammatorischen Mediatoren wie zum Beispiel Cyclooxygenase-2 (COX2) und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) vermindert und dadurch antiinflammatorisch wirkt (Kundu und Surh, 2004). Dieses ist von essentieller Bedeutung, da Entzündungsprozesse viele chronische und degenerative



Krankheiten wie Arteriosklerose, Neurodegeneration und Karzinogenese begünstigen (Fung et al., 2012; Philip et al., 2004).

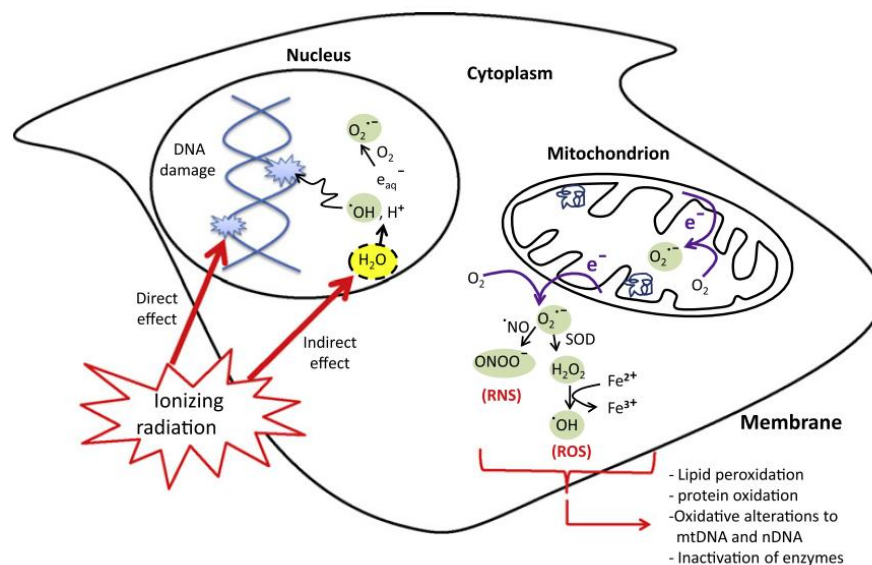
Darüber hinaus ist Resveratrol in der Lage, Effekte des Metabolischen Syndroms zu vermindern (Cherniack, 2011). Das Metabolische Syndrom wird durch eine unausgewogene Ernährung gefördert und beschreibt das Zusammenkommen vieler Symptome, wie die abdominale Adipositas, Insulinresistenz, Hyperglykämie, veränderte Blutfettwerte und Bluthochdruck (Shaw et al., 2005). Es ist bekannt, dass Mäuse unter einer Hochfett-Diät charakteristische Anzeichen des Metabolischen Syndroms entwickeln. Wird aber zu der Hochfett-Diät auch Resveratrol verabreicht, so können bei adipösen Mäusen weder Insulinresistenz noch andere Symptome des Metabolischen Syndroms nachgewiesen werden. Des Weiteren erreichten adipöse Mäuse das gleiche Alter wie Mäuse unter Standard-Diät (Baur et al., 2006).

Eine andere Anwendungsmöglichkeit von Resveratrol könnte auch in der Krebsprävention und Therapie liegen (Bishayee, 2009). So konnte in vielen Tumorgeweben eine anti-proliferative Wirkung durch Induktion der Apoptose festgestellt werden (Aggarwal et al., 2004). Zudem hat Resveratrol kardioprotektive Eigenschaften und positive Auswirkungen auf vaskuläre Funktionen (Baur und Sinclair, 2006; Wu et al., 2011).

Einer der Wirkungsmechanismen durch die Resveratrol seine positive Auswirkung auf den Organismus ausübt, ist seine Fähigkeit freie Radikale zu reduzieren und somit oxidativen Stress zu minimieren (Robb et al., 2008). Die genauen Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind allerdings nicht genau bekannt. Ein in der Zellkultur beobachteter Effekt, ist die Oxidation von Polyphenolen unter Bildung von Chinonen, Semichinonen und  $H_2O_2$  (Long et al., 2010). So konnte gezeigt werden, dass unter anderem die Anwesenheit von Hydrogencarbonaten von kritischer Bedeutung ist, da mit zunehmender Konzentration sowohl die Degradation Resveratrols, als auch die  $H_2O_2$ -Konzentration ansteigt (Yang et al., 2010). Die entstehenden Artefakte können zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen. Jedoch könnten genau diese beobachteten Effekte auch einem der Wirkmechanismen Resveratrols entsprechen. Der Organismus wird mit einem leichten oxidativen Stress konfrontiert, was zur Aktivierung antioxidativer Reaktionen führt, welche wiederum zum allgemeinen Zellschutz beitragen können (Halliwell, 2008).

## 1.2 Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS) spielen im aeroben Organismus eine entscheidende Rolle, da sie für viele intrazelluläre Signalketten (Redox-Reaktionen) benötigt werden und aus diesem Grund auch von den Zellen produziert werden. Unter ROS versteht man im Allgemeinen freie Radikale wie Superoxidanion ( $O_2^-$ ), Hydroxylradikale ( $OH^\cdot$ ), aber auch reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Allerdings können ROS auch durch Fehlregulationen und äußere Einflüsse wie UV-Strahlung entstehen und in hohen Konzentrationen zur Schädigung der Zelle führen (Azzam et al., 2011). Die Homöostase des ROS-Haushalts wird daher durch eine Vielzahl von antioxidativen Enzymen und niedermolekularen Verbindungen reguliert, wobei es das Ziel ist, den ROS Anteil so zu kontrollieren, dass gewünschte Funktionen ohne eine Schädigung von Zellbestandteilen erfüllt werden (Handy und Loscalzo, 2012).



**Abbildung 2, Direkte und indirekte Schäden durch ionisierende Strahlung.** Direkte Schäden entstehen an zellulären Makromolekülen (Lipide, Proteine, nukleare DNA (nDNA) und mitochondriale DNA (mtDNA)) und indirekte Schädigung erfolgt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die in Folge von Radiolyse gebildet werden. SOD: Superoxid-Dismutase; RNS: reaktive Stickstoffspezies (Azzam et al., 2011).

Bereits 1956 wurde durch Denhan Harman die Theorie des Alterns durch freie Radikale beziehungsweise oxidativen Stress beschrieben. Er postulierte, dass eine erhöhte Produktion von ROS durch die Mitochondrien, zu einer Akkumulation von oxidativen Schäden an Proteinen, DNA und Lipiden führt und somit den Alterungsprozess vorantreibt (Harman, 1956). Neueren Beschreibungen nach handelt es sich bei der erhöhten ROS Produktion

genau genommen um einen unausweichlichen Teufelskreis, bei dem in erster Linie mitochondriale DNA geschädigt wird und sich dadurch Mutationen akkumulieren. Diese führen dann zu einer fehlerhaften mitochondrialen Atmung, wodurch oxidativer Stress und die ROS Entstehung gefördert werden (Van Remmen und Jones, 2009).

Die Mitochondrien sind neben der Produktion von ROS, als Kraftwerke der Zelle maßgeblich für die Energiegewinnung in Form von Adenosin Triphosphat (ATP) verantwortlich. Es handelt sich um sehr dynamische Organellen, die zudem viele weitere Funktionen der Zelle übernehmen. So regulieren sie die Kalzium-Homöostase der Zelle, kontrollieren die Energieeffizienz und sind an der Regulation vieler Signaltransduktionswege beteiligt (Van Remmen und Jones, 2009). Während des Alterungsprozesses, bei Diabetes und dem Metabolischen Syndrom kann jedoch eine mitochondriale Dysfunktion und eine verminderte Biogenese beobachtet werden. Die Folgen dessen sind ein unausgeglichener Energiehaushalt, erhöhter oxidativer Stress bis hin zu Organfehlfunktionen (Petersen et al., 2003).

### ***1.2.1 Oxidativer Stress und Resveratrol***

Einige antioxidative Verbindungen, die durch die Ernährung vom Körper aufgenommen werden, können zu einer Minimierung von ROS in der Zelle beitragen. Ferner wurde gezeigt, dass eine polyphenolreiche Ernährung mit einem verminderten Risiko für altersbedingten Krankheiten einhergeht (Halliwell, 2008). Das Potenzial der Polyphenole beruht dabei unter anderem auf ihrer Fähigkeit ROS zu minimieren und dadurch oxidativen Stress zu reduzieren (Tang und Halliwell, 2010). Als Vertreter der Polyphenole vermindert auch Resveratrol den oxidativen Stress, indem, wie auch durch die kalorische Restriktion, die Biogenese von Mitochondrien in vielen Geweben aktiviert wird (Lopez-Lluch et al., 2006; Ungvari et al., 2011).

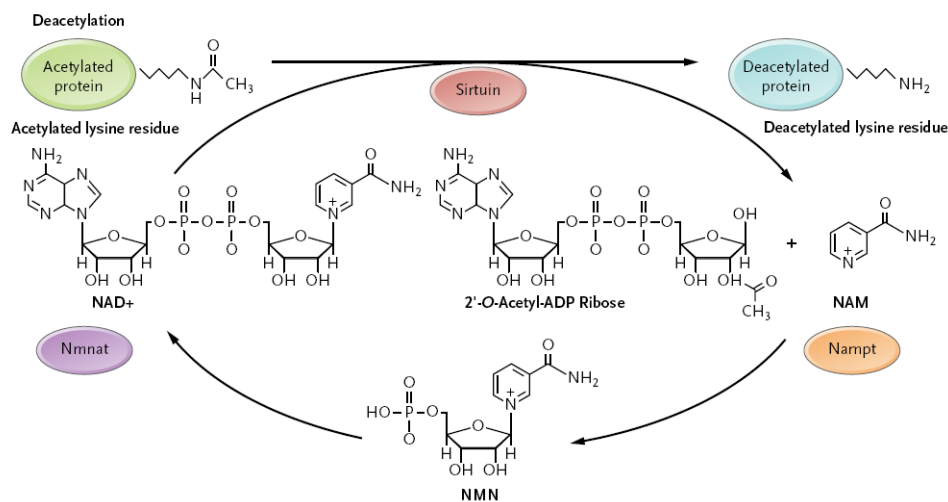
Der Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Coaktivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) ist ein wichtiger metabolischer Mediator, da er die mitochondriale Biogenese und Atmung kontrolliert und durch Resveratrol aktiviert werden kann (Lagouge et al., 2006). Die Aktivierung von PGC-1 $\alpha$  erfolgt zum Beispiel über die Deacetylierung durch SIRT1 oder

durch den Energiesensor AMPK (Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase), welcher PGC-1 $\alpha$  phosphoryliert (Ungvari et al., 2011).

Die Aktivierung von PGC-1 $\alpha$  und die erhöhte Mitochondrienzahl können dabei zu einem verbesserten Gesundheitszustand beitragen. In braunem Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur von Mäusen konnte durch Behandlung mit Resveratrol eine höhere mitochondriale Funktion beobachtet werden. Diese spiegelte sich in einem gesteigerten Energieumsatz, einer erhöhten aeroben Kapazität und einer verbesserten Sensomotorik wieder (Lagouge et al., 2006).

### 1.3 Sirtuine

Sirtuine sind stark konservierte Enzyme, die mit metabolischen Prozessen, oxidativen Stress und Altern in Verbindung gebracht werden. Sirtuine können in Abhängigkeit von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) bestimmte Proteine deacetylieren, wodurch sie deren Stabilität und Aktivität beeinflussen. Im Speziellen handelt es sich um Histon-Deacetylasen der Klasse III, die durch ihre Aktivität eine transkriptionale Repression bewirken und somit an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Imai et al., 2000).



**Abbildung 3, Enzymatische Aktivität der Sirtuine.** Sirtuine deacetylieren in Anwesenheit von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) Proteine. Dabei wird ein Nicotinamid (NAM) und O-Acetyl-ADP gebildet. NAM kann durch Nicotinamidphosphosyltransferase (Nampt) und Nicotinamidmononucleotid-Adenylyltransferase (Nmnat) über Nicotinamidmononucleotid (NMN) zu NAD<sup>+</sup> umgewandelt werden (Guarente, 2011).

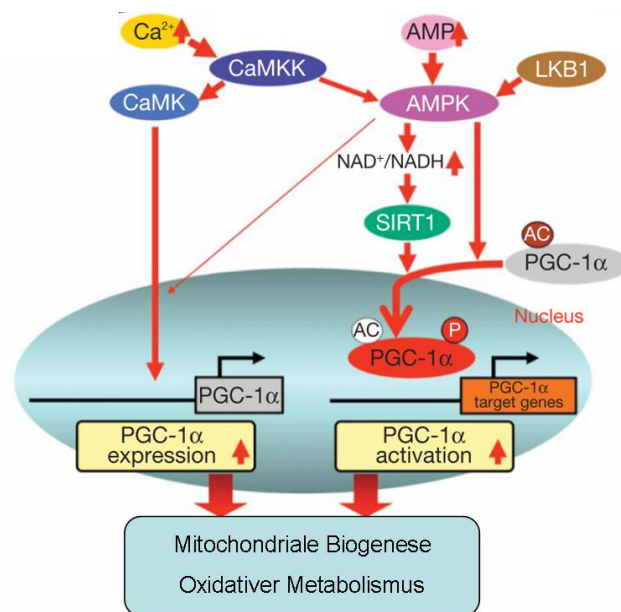
Als erstes Mitglied der Sirtuine wurde das Protein Sir2p (silent information regulator 2) in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Schnell wurde erkannt, dass die Aktivierung des Proteins während der kalorischen Restriktion zu lebensverlängernden Effekten beiträgt (Lin et al., 2000). Vergleichbares wurde durch die Aktivierung der *Sir2* orthologen Gene in anderen Organismen wie in *Caenorhabditis elegans* (*sir-2.1*) und *Drosophila melanogaster* (*Sir2*) beobachtet (Rogina und Helfand, 2004; Tissenbaum und Guarente, 2001). Im Menschen wurden sieben *Sir2* homologe Gene identifiziert: *SIRT1-7*, wobei das Protein SIRT1 dem Sir2 der Hefe am ähnlichsten ist. Die Sirtuine unterscheiden sich unter anderem in ihrer Lokalisation und dementsprechend auch in ihren zellulären Aufgaben. SIRT1, SIRT6 und SIRT7 sind im Zellkern lokalisiert, wo sie für die Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren, Cofaktoren und Histonen verantwortlich sind und damit die Funktion der transkriptionalen Regulation ausüben. SIRT3, SIRT4 und SIRT5 hingegen sind in den Mitochondrien lokalisiert und regulieren dort die Aktivität von metabolischen Enzymen. Einzig SIRT2 befindet sich meistens im Cytoplasma, wo es an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist (Dali-Youcef et al., 2007).

Die Aktivität von SIRT1 wird neben posttranslationalen Modifikationen überwiegend durch die intrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -Konzentration reguliert. Daher wirkt SIRT1 auch als Energiesensor der Zelle. Sind genügend Nährstoffe vorhanden, beschränkt sich der Zellmetabolismus vornehmlich auf die Glykolyse, um Energie in Form von ATP zu generieren. Dabei wird  $\text{NAD}^+$  zu NADH umgewandelt und infolge des kleineren  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Ratio die SIRT1 Aktivität vermindert. Bei einer Nährstoffunterversorgung wird weniger  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert, wodurch die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration in der Zelle zunimmt und SIRT1 aktiviert wird (Chalkiadaki und Guarente, 2012). Dementsprechend wird SIRT1 bei einer kalorischen Restriktion aktiviert (Cohen et al., 2004). SIRT1 deacetyliert und aktiviert daraufhin mehrere Transkriptionsfaktoren, die in der Glukoneogenese, der Fettsäureoxidation und der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind, wie zum Beispiel PGC-1 $\alpha$ , Forkhead-Box-Protein (FOXO) und Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ). Dahingegen werden andere Faktoren wie der Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription 3, ein Transkriptionsrepressor der Glukoneogenese inhibiert (Chalkiadaki und Guarente, 2012).

Ein weiteres Enzym das bei Nährstoffmangel, aber auch bei körperlicher Anstrengung aktiviert wird ist AMPK. AMPK wird bei einem erhöhten AMP/ATP Verhältnis durch LKB1 (Serine-Threonin Leberkinase B1) oder CamKK $\beta$  (Calcium/Calmodulin-Kinase

Kinase-β) phosphoryliert und somit aktiviert. Die AMPK-Aktivierung zieht unter anderem den Wechsel zur Fettsäureoxidation nach sich, um ATP zu generieren. Des Weiteren werden nicht lebensnotwendige, ATP-verbrauchende Prozesse herunter reguliert (Ruderman et al., 2010).

SIRT1 und AMPK stehen in einer engen Beziehung zueinander, da sie sich gegenseitig regulieren und auch gemeinsame Zielmoleküle besitzen. Canto et al. (2009) konnten zeigen, dass durch die Aktivierung von AMPK, die  $NAD^+$ -Konzentration erhöht wird und dadurch die SIRT1 Aktivität gesteigert wird (Canto et al., 2009). Gleichzeitig führt die Aktivierung der Genexpression der Nicotinamidphosphosyl-transferase (NAMPT) durch AMPK, zu einem Abbau von Nicotinamid (NAM), einen allosterischen Inhibitor von SIRT1. Im Gegenzug deacetyliert und aktiviert SIRT1 das Enzym LKB1 und steigert somit die Aktivität von AMPK. Beide Enzyme aktivieren, wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt, den bereits beschriebenen Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese PGC-1 $\alpha$ .



**Abbildung 4, schematische Darstellung der PGC-1 $\alpha$  Aktivierung;** AMPK wird durch CaMKK und LKB1 aktiviert, es folgt die Aktivierung von Sirt1 und zusammen induzieren sie die PGC-1 $\alpha$  Genexpression. PGC-1 $\alpha$  aktiviert die mitochondriale Biogenese (modifiziert nach (Iwabu et al., 2010)).

SIRT1 steht hingegen in Konkurrenz mit den Poly(ADP-ribose) Polymerasen (PARPs), da beide  $\text{NAD}^+$  als Coenzym benötigen (Bai et al., 2011a; Bai et al., 2011b). PARPs binden an unterschiedliche DNA-Strukturen und sind an DNA Reparaturmechanismen, Chromosomenstabilität, Transkriptionsregulation, Zellproliferation und Apoptose beteiligt. Zellulärer Stress und DNA Schädigung sind die Hauptaktivatoren der PARPs, deren Aktivität in einer starken Abnahme der  $\text{NAD}^+$ -Konzentration resultiert (Canto und Auwerx, 2011).

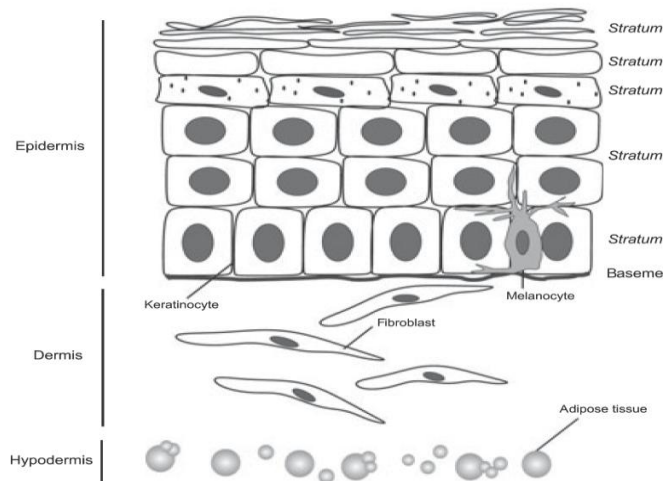
### ***1.3.1 SIRT1 Aktivierung durch Resveratrol***

Die vorteilhaften Effekte der kalorischen Restriktion werden unter anderem durch SIRT1 vermittelt. Nach dieser Entdeckung wurde Resveratrol, auf Grund seiner Eigenschaft, Teilaspekte der kalorischen Restriktion nachzuahmen, als Aktivator von SIRT1 beschrieben. Anders als zunächst angenommen besteht jedoch keine direkte Interaktion zwischen Resveratrol und SIRT1 (Behar et al., 2009). Die beobachtete Aktivierung SIRT1 durch Resveratrol war nur in Gegenwart eines artifiziellen Test-Fluorophores zu beobachten und nicht bei unmarkiertem Peptid-Substrat, so dass es sich bei dem beobachteten Signal um ein Testartefakt handelte (Kaeberlein et al., 2005).

## **1.4 Haut**

Die Haut ist mit ihren rund  $2 \text{ m}^2$  das größte menschliche Organ und dient dem Körper unter anderem als erste Abwehr vor äußeren Einflüssen. Die Haut ist einer Reihe von extrinsischen Einflüssen ausgesetzt, welche auch gleichzeitig bei vielen hautbedingten Krankheiten, neben genetischen Faktoren, eine entscheidende Rolle spielen. Besondere Gefahr geht dabei vom UV-Licht aus, da es sowohl am Verlauf, als auch bei der Entstehung vieler Krankheiten beteiligt ist. UV-Strahlung führt zu einer direkten Schädigung der DNA und löst oxidativen Stress aus, der zur Schädigung der Zelle führt. Die daraus resultierende Fehlsteuerung der Zelle kann der Auslöser von Krankheiten wie etwa Hautkrebs sein. Zudem führt das Ungleichgewicht der Zelle zu einer Beschleunigung des Hautalters (Nichols und Katiyar, 2010).

Das Altern der Haut ist dabei ein komplexes biologisches Phänomen, das durch ein Zusammenspiel von intrinsischen und extrinsischen Faktoren hervorgerufen wird. Eine verminderte metabolische Aktivität, die Akkumulation von oxidativen Schäden und inflammatorische Prozesse verstärken diesen Vorgang und führen zu vermehrter Faltenbildung, Trockenheit und Fehlpigmentierung (Pillai et al., 2005).



**Abbildung 5 Schematische Darstellung der drei Hautschichten:**

Epidermis, Dermis und Hypodermis, modifiziert nach (Brohem et al., 2011).

Die Haut stellt mit ihren drei Schichten Epidermis, Dermis und Hypodermis ein komplexes Netzwerk aus Keratinozyten, Fibroblasten, Abwehrzellen und Bindegewebe dar. Vor allem das Bindegewebe der Dermis, bildet ein komplexes Gerüst aus Collagen, Elastin, Fibronectin, Proteoglykanen und Glycosaminglykanen und verleiht der Haut die notwendige Stärke und Spannung. Im Verlauf des Lebens kommt es allerdings in der extrazellulären Matrix (EZM) zu einer fortwährenden Veränderung und zum Abbau dieser Bestandteile. Die im Bindegewebe eingebetteten Fibroblasten steuern diesen Prozess maßgeblich und übernehmen Synthese und Abbau der EZM. Spezielle zinkabhängige Endoproteasen, die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind vor allem an der Degradation der EZM beteiligt. Daher geht bei der lichtbedingten Hautalterung eine erhöhte MMP Sekretion einher mit der Faltenbildung (Lee et al., 2010). Besonders UV-Licht gestresste Haut weist eine hohe proteolytische Aktivität auf, da es infolge eines gesteigerten ROS Gehaltes in der Zelle zu einer Inflammation kommt. Die Inflammation bewirkt eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie dem Aktivator Protein 1 (Pillai et al., 2005), welche die proteolytische Degradation der EZM regulieren. Lichtgealterte Haut zeichnet sich somit unter anderem durch den Verlust der Hautspannung aus.



### **1.5 Zielsetzung**

Resveratrol, ein Naturstoff aus der Weintraube, besitzt in einer Vielzahl von Zellmodellen sowohl antioxidative als auch antiinflammatorische Eigenschaften. Jedoch wurde bisher nur eine vergleichbar geringe Anzahl an Untersuchungen im Hautmodell durchgeführt. Da oxidativer Stress und Inflammation ein erhöhtes Risiko sowohl in der Entstehung vieler Hautkrankheiten, wie auch in der Hautalterung darstellen, wäre ein Entgegenlenken an diesen Angriffspunkten mit Resveratrol von Interesse.

In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, welche der bekannten Mechanismen durch Resveratrol in normal humane dermale Fibroblasten (NHDF) aktiviert werden. Diese Arbeiten umfassen im Speziellen die Bestimmung der Konzentration, bei der Resveratrol auf das ausgewählte Zellmodell Effekte ausübt. Zudem sollen ausgewählte Gene, die in der Bewältigung des oxidativen Stresses, dem Metabolismus und der Energiegewinnung durch Resveratrol reguliert werden, untersucht werden.

Hinzukommend soll der metabolische Status der Fibroblasten nach Resveratrol-Behandlung untersucht werden und eine Aussage über posttranslationale Modifikationen und somit Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung bestimmter Proteine getroffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

100 bp DNA Ladder	Biolabs
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserumalbumin 96-99 %)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applchem
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sidma-Aldrich
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethanol	Merck
Ionic Detergent Compatibility Reagent	Thermo Scientific
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth
Pierce <sup>®</sup> 660nm Protein Assay	Thermo Scientific
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad
Ponceau-S-Lösung, 0,1 %	AppliChem
Rinderserumalbumin 96-99 % (BSA)	Sigma-Aldrich
Restore <sup>™</sup> PLUS (Stripping Buffer)	Thermo Scientific
SERVA Blue G (Coomassie)	Serva
Trans-Resveratrol	Biomol GmbH
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid 3 %	Fluka
Western Lightning <sup>®</sup> Plus-ECL, Chemiluminescence Plus	PerkinElmer
Western MagicMark <sup>™</sup> XP	Invitrogen

### 2.1.2 *Lösungen und Puffer*

NuPAGE <sup>®</sup> MES SDS Laufpuffer (20x)	NuPAGE, Invitrogen
NuPAGE <sup>®</sup> LDS Probenpuffer (4x)	NuPAGE, Invitrogen
DNA Ladepuffer (6x)	Thermo Scientific
Protein-Lysepuffers	50 µM Tris-HCL pH 7,5 10 mM EDTA 1 % SDS 1x Phosphatase Inhibitor 1x Protease Inhibitor
TBS (10x)	24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1 L H <sub>2</sub> O; pH 7,6
TBST	TBS + 0,1 % Tween <sup>®</sup> 20
Western-Blot Puffer	21 g Glycin 4,5 g TRIS Base ad 1,5L dd H <sub>2</sub> O

### 2.1.3 *Kits*

ADP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit	BioVision
ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit	BioVision
Deproteinizing Sample Preparation Kit	BioVision
CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Laktate Assay Kit	BioVision
NAD <sup>+</sup> /NADH Quantification Kit	BioVision
NE-PER <sup>®</sup> Nuclear & CytoplasmicExtractionkit	Pierce
Pyruvate Assay Kit	BioVision
RNeasy Mini Kit	Qiagen

### 2.1.4 *Enzyme*

cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich
Power SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
RNase-Free DNase Set	Qiagen

### 2.1.5 *Zellkultur und Zellkulturmedien*

NHDF-Neo (Normal human neonatal dermal fibroblasts) Medium: DMEM High Glucose, Glutamax <sup>™</sup> , Pyruvat + 10 % FCS	Lonza
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose, GlutaMAX <sup>™</sup> , Pyruvat	Invitrogen,
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom
Trypan Blau Lösung 0,4 %	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 % / 0,2%)(10x)	Biochrom
Zählkammer C-Chip	Biochrom
2x Einfriermedium	DMEM High glucose, GlutaMAX <sup>™</sup> , Pyruvat + 25 % FBS; + 30 % DMSO

**2.1.6 Antikörper**

Primäre AK	Puffer + Verdünnung	Blockierlösung	Sek.		
			AK	Firma	Cat Nr
<b>ACC</b>	5 % Milch (1:1000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	3662
<b>P-ACC (Ser79)</b>	5 % Milch (1:1000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	3661
<b>β-Aktin</b>	1,5 % Milch, 1,5 % BSA (1:1000)	1,5 % Milch, 1,5 % BSA	Maus	Santa Cruz	sc-47778
<b>AMPK</b>	5 % Milch (1:1000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	2532
<b>P-AMPK (Thr172)</b>	5 % Milch (1:1000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	2531
<b>CREB</b>	5 % Milch (1:1000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	9197
<b>P-CREB (Ser133)</b>	5 % Milch (1:1000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	9198
<b>PDE1 α</b>	2,5 % BSA (1:2000)	2,5 % BSA	Maus	Abcam	ab-67592
<b>P-PDE1 α (Ser273)</b>	2,5 % BSA (1:2000)	2,5 % BSA	Hase	Abcam	ab-92696
<b>PKD4</b>	2,5 % BSA (1:1000)	2,5 % BSA	Hase	Abcam	ab-38242
<b>p53</b>	3 % Milch (1:200)	3 % Milch	Maus	Santa Cruz	sc-126
<b>P-53 (ser392)</b>	5 % Milch (1:1000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	9281
<b>PGC1</b>	1,5 % Milch, 1,5 % BSA (1:200)	1,5 % Milch, 1,5 % BSA	Hase	Santa Cruz	sc-13067
<b>PPARγ</b>	1,5 % Milch, 1,5 % BSA (1:400)	1,5 % Milch, 1,5 % BSA	Maus	Santa Cruz	sc-7273
<b>P-PPARγ (Ser273)</b>	1,5 % Milch, 1,5 % BSA (1:100)	1,5 % Milch, 1,5 % BSA	Hase	Eurogentech	-
<b>Sirt1</b>	3 % Milch (1:1000)	5 % Milch	Maus	Diagenode	063
<b>P-Sirt1</b>	5 % Milch (1:2000)	5 % BSA	Hase	Cell signaling	2314
<b>Sekundäre AK</b>					
anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz		sc-2004		
anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz		sc-2005		

### 2.1.7 Primer & Sonden

Tabelle 1, Primer Sequenzen für die mittels qRT-PCR untersuchten Gene

Gen	5' → 3' Primer (forward)	3' → 5' Primer (reverse)
<b>ACACA</b> <i>Acety-CoA Carboxylase</i>	GCTGACTTACACTGAACTGGTACTGG	CAAGCTACCATGCCAATCTCATT
<b>ACLY</b> <i>ATP-Citrat-Lyase</i>	TGCCATGCCACAAGATTCAGTCCC	ACAATGGCCTTGGTGTGGCGG
<b>CAT</b> <i>Katalase</i>	GCTTCAGGGCCGCCTTTTTGTC	AGTTGGCCACTCGAGCACGG
<b>EP300</b> <i>E1A Bindendes Protein p300</i>	AGAATGTGGTGGAAACCGGGGC	AGAGCCAAAATCTGTGCCATCGCT
<b>FOXO3</b> <i>Forkhead-Box-Protein</i>	AAACACCAGCAGCAGTCTCC	GCCTGAGAGAGAGTCCGAGA
<b>GSR</b> <i>Glutathion Reduktase</i>	GAGGTGCTGAAGTTCTCCAGGTCA	CCGGGAAGTGCAGTAACCATGCTG
<b>MMP3</b> <i>Matrix Metalloproteinasen 3</i>	CGGAACCTGTCCCTCCAGAACCT	TGCGCCAAAAGTGCCTGTCTTT
<b>NR1H3-LXR</b> <i>Leber-X-Rezeptor</i>	CACCTACATGCGTCGCAAGT	GACAGGACACACTCCTCCCG
<b>NFE2L2</b> <i>NF-E2 verwandter Faktor 2</i>	CCCAACACACGGTCCACAGCTC	AATCCATGTCCTGCTGGGACGGG
<b>PARP1</b> <i>Poly(ADP-ribose) Polymerase 1</i>	TGAGGTCCAGCAGGCGGTGT	AGTCGTGGGGGATCAGGGTGT
<b>PDK1</b> <i>Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 1</i>	GTGACCGAGGAGGTGGCGTT	AACCAAAACCAGCCAGAGGCAC
<b>PDK4</b> <i>Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 4</i>	CTGGACTTTGGTTCAGAAAATGC	CCTTCAGAATGTTGGCGAGTCT
<b>PPAR<math>\alpha</math></b> <i>Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor <math>\alpha</math></i>	TTGCTGTGGAGATCGTCCTG	CCGGGTGGTTGCTCTGC
<b>PPAR<math>\delta</math></b> <i>Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor <math>\delta</math></i>	CGCAGCCTCCGCAAACCTT	CCTGGCCGGTCTCCACACAG
<b>PPAR<math>\gamma</math></b> <i>Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor <math>\gamma</math></i>	CATGGCAATTGAATGTCGTGTC	CCGGAAGAAACCCTTGTCAT
<b>PPARGC1<math>\alpha</math></b> <i>PPAR<math>\gamma</math> Koaktivator 1 <math>\alpha</math></i>	ACCCAAGGGTTCCCAT	GAGTTAGGCTGCAGTTCCAGA
<b>PTGS1</b> <i>Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 1</i>	GGGCTCCCAGGAGTACAGCTACG	CCACCGATCCGGCCAGCAATC
<b>PTGS2</b> <i>Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2</i>	TGCTGGAACATGGAATTACCC	ATTCTACCACCAGCAACCCT
<b>SIRT1</b> <i>Silent information regulator 2</i>	TGCAACAGCATCTTGCCCTG	AGGACATCGAGGAACTACCTGATT
<b>SOD1</b> <i>Superoxid-Dismutase 1</i>	AGACGGGGTGCTGGTTTGCG	CACACGGCCTTCGTGCCAT
<b>SOD2</b> <i>Superoxid-Dismutase 2</i>	GGCACTCGTGGCTGTGGTGG	CCTGCTGGTGCCGCACACT
<b><math>\beta</math>-ACT</b> <i><math>\beta</math>-Aktin</i>	CAGCCATGTACGTTGCTATCCAGG	AGGTCCAGACGCAGGATGGCATG
<b>UCP2</b> <i>Entkopplerprotein 2</i>	TTCTCCCTGCGGCTCGGACAC	CATGGCCCCGATCCCCTTGGT

Die Primer wurden synthetisiert von der Firma Sigma-Aldrich (Taufenkirchen, Deutschland) Designkriterien: Primer umfassen ein Intron-Exon,  $T_m < 64^\circ\text{C}$ , geringes potential Sekundärstrukturen zu bilden und eine Produktgröße zwischen 80 und 120 bp.

### 2.1.8 *Material und Geräte*

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Sonoplus HD-2200	Bandelin
Blotting System	Biozym
Fuji-LAS-1000	Fujifilm
Hybond™ ECL™ Nitrocellulosemembran	GE Healthcare
MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems
Mikrotiterplatte, 384-well, Small Volume™ HiBase Polystyrene, durchsichtig	Greiner Bio-One
Nanodrop2000	Thermo Scientific
NuPAGE® LDS-PAGE Laufkammer	Invitrogen
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 15 well	Invitrogen
PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research
POLARstar Omega	Bmg Labtech
Protein LoBind 0,5 ml	Eppendorf
UV Gel Imaging System Omega	UltraLum
Whatman®Papier	Whatman
Zellkulturflasche T150, TPP®, 150 cm <sup>2</sup> , Polystyrol	Sigma-Aldrich
Zellkulturplatte 6-well; TPP®, Polystyrol	Sigma-Aldrich
Zellkultur-Mikrotiterplatte, 384-well, Polystyrene, weiß	Greiner Bio-One

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturmethoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung normaler humaner dermale Fibroblasten (NHDF)

NHDFs wurden unter Standardbedingungen von 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, High Glucose, GlutaMAX<sup>TM</sup>) + 10 % fetales Rinderserum (FBS) kultiviert. Für die Subkultivierung der adhären Zellen wurden diese, vorm Erreichen der vollständigen Konfluenz, mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) vom Zellkulturgefäß gelöst. Die Enzymreaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 5-8 min bei 37°C durch Zugabe von DMEM (+ 10 % FBS) gestoppt und die Zellen wurden verdünnt in neue Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten ausgesät.

Eine Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der C-Chip Zählkammer nach Verdünnung der Probe mit 0,4 % Trypanblau im Verhältnis 1:1.

#### 2.2.1.2 Kryokonservierung und Inkulturnahmen

Zur Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigen Stickstoff kryokonserviert. Dafür wurden die Zellen nach der Trypsinierung zentrifugiert (5 min, 200 x g, Raumtemperatur (RT)) und in einer Konzentration von 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ ml FBS aufgenommen. Die Suspension wurde mit einem gleichen Volumen 2x Einfriermedium gemischt, sodass sich eine Endkonzentration von 15 % Dimethylsulfoxid (DMSO) ergab. Die Zellsuspension wurde zu je 1 ml/Einfrier Röhrchen in der Einfrierhilfe Dose „Mr. Frosty“ für 16-24 h bei -80°C gelagert, bevor diese in einen Stickstofftank (-196°C) überführt wurden.

Die Inkulturnahme der NHDF erfolgte durch schnelles Auftauen im 37°C-Wasserbad und anschließender langsamer Überführung in eine Zellkulturflasche mit 30 ml vorgelegtem Medium (+ 10 % FBS). Das DMSO enthaltende Medium wurde nach Anhaftung der Zellen durch neues Medium ersetzt.

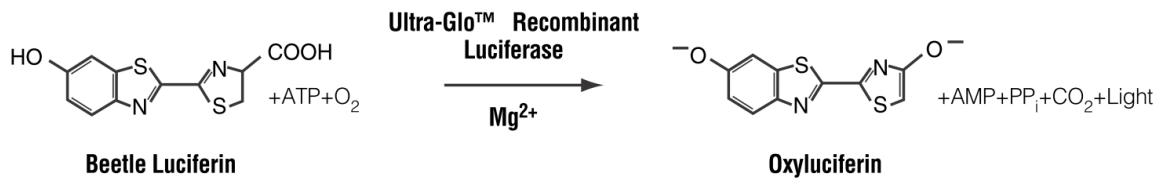


2.2.1.3 Zytotoxizitätsbestimmung

Für die Behandlung der dermalen Fibroblasten mit Resveratrol und  $H_2O_2$  mussten zunächst geeignete Konzentrationen bestimmt werden. Dies erfolgte mit Hilfe des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Lumineszenz Zell-Viabilitäts Test (Promega). Dieser sollte Aufschluss darüber geben in welcher Konzentration die Substanzen nicht toxisch auf die Zellen wirkt.

Basierend auf dem ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen erfolgte eine relative Quantifizierung der behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Fibroblasten wurden dafür in einer Dichte von 250 Z/ 25  $\mu$ l/ Kavität in einer für die Zellkultur geeigneten, weißen 384 – Loch – Mikrotiterplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen mit je 25  $\mu$ l in Medium (+ 10 % FBS) gelösten Substanzen. Dabei wurde die Zytotoxizität von Resveratrol (0-500  $\mu$ M) und  $H_2O_2$  (0-1 mM) in Quadruplikaten ermittelt. Resveratrol wurde dabei in DMSO gelöst, weswegen zusätzlich das Lösemittel DMSO (0-0,5 % DMSO) untersucht wurde.

Nach einer 16-stündigen Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde die Mikrotiterplatte auf RT abgekühlt, der Zustand der Zellen mikroskopisch erfasst und anschließend die Zellyse durch Zugabe von 20  $\mu$ l CellTiter-Glo<sup>®</sup> Reagenz gestartet. Dabei wurde auch die Luciferasereaktion induziert, bei der „Beetle-Luciferin“ in Anwesenheit von ATP zu „Oxyluciferin“ umgesetzt wird und ein Lumineszenzsignal entsteht. Dieses Signal wurde 10 min nach der Zellyse am Multi-Detektions-Mikroplatten-Reader POLARstar Omega vermessen und gilt als Maß für die Zahl lebender Zellen.



**Abbildung 6, Luciferasereaktion.** Luciferase katalysiert in Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) die Umwandlung von Beetle-Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei wird neben dem Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) ein Lichtsignal generiert, welches detektiert werden kann (Promega, Handbuch).

#### 2.2.1.4 *Behandlung der NHDF mit Resveratrol*

Für alle nachfolgenden Experimente wurden die Zellen mindestens einen Tag vor der Behandlung in den jeweiligen Zellkulturgefäßen ausgesät. Die Zelldichte wurde dabei so gewählt, dass am Tag der Behandlung eine Konfluenz von ca. 40 – 50 % (14000 - 18000 Z/cm<sup>2</sup>) erreicht war. Die Verdopplungszeit der NHDF beträgt unter den vorliegenden Konditionen circa 30 h.

Die Kultivierung der NHDF erfolgte für die RNA-Isolation in einer 6-Loch-Titerplatte und für die Protein-Isolation sowie Metaboliten-Bestimmungen in T150 Zellkulturflaschen. In allen Experimenten wurden die Zellen mit 100 µM Resveratrol und 0,1 % DMSO behandelt. Da Experimente zeigten, dass Resveratrol in Anwesenheit von Natriumhydrogencarbonat bis zu 50 % der eingesetzten Resveratrol-Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generieren (Yang et al., 2010) wurden die Zellen zusätzlich mit 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in 0,1 % DMSO) behandelt. Alle Substanzen wurden in DMEM (+ 10 % FBS) gelöst und die Zellen, nach Abnahme des alten Mediums, mit 0,2 ml/ cm<sup>2</sup> vorsichtig überschichtet. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen für 16 h. In allen Experimenten wurden biologische Triplikate hergestellt.

#### 2.2.2 *Genexpressionsanalyse*

Die Bestimmung der Genexpression, wurde mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR (RT-PCR, RT= in Echtzeit) durchgeführt. RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht. Somit wird die DNA zunächst denaturiert, im nächsten Schritt lagern sich die Primer an die DNA (Annealing) und anschließend wird der DNA-Abschnitt amplifiziert (Elongation). Bei der RT-PCR wird die amplifizierte DNA zusätzlich mit SYRB-Green gefärbt und es erfolgt nach jedem Zyklus, und somit in Echtzeit, eine Quantifizierung über Fluoreszenzmessung.

##### 2.2.2.1 *RNA-Isolation*

Die Isolation der RNA erfolgt mit Hilfe des RNeasy Mini Säulen Kits (Qiagen). Die in einer 6-Loch-Titerplatte ausgesäten NHDF wurden dafür, 16 h nach Behandlung, zunächst mit

PBS gewaschen und anschließend in 350 µl RLT Puffer + 1 % β-Mercaptoethanol lysiert. Für einen vollständigen Aufschluss wurde das Lysat bei -80°C eingefroren. Die anschließende Isolation der RNA erfolgte entsprechend des Handbuches des Herstellers. Zusätzlich wurde ein 30-minütiger DNase I-Verdau auf der Mini Säule durchgeführt (ca. 27 DNase I Units/Säule; Qiagen). Die RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde die Konzentration und Reinheit der RNA photometrisch bei 260 nm und 280 nm am UV-Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt. Dabei entspricht die OD=1 bei 260 nm, einer Konzentration von rund 40 µg/µl. Die Reinheit der RNA wird durch den Quotienten von OD<sub>260/280</sub> ermittelt und sollte bei reiner RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Mit Hilfe eines 1,2 % Agarosegels wurde die Integrität der RNA überprüft. Dafür wurde 1 µl RNA mit 2 µl 6x Probepuffer ad 12 µl mit H<sub>2</sub>O versetzt und bei 70 Volt, in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel (0,25 µg/ml) 20 min aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige RNA und ist unter UV-Licht detektierbar. Die RNA wurde bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

#### 2.2.2.2 *Reverse Transkription*

Für die RT-PCR wurde die RNA durch die reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems). Der reverse Transkriptionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 2, Zusammensetzung der cDNA-Synthese Reaktion (10 µl)**

Komponente	Endkonzentration	Volumen [µl]
RNA	Max. 1 µg	5
10x RT Buffer	1 x	1
dNTP Mix (100 mM)	4 mM	0,4
10 x RT Random Primers	1 x	1
MultiScribe RT (50 U/µl)	25 Unit	0,5
RNase Inhibitor (20 U/µl)	10 Unit	0,5
Nuklease-freies Wasser		1,6

Die Umschreibung erfolgte am Thermo-Cycler mit dem folgenden Programm.

Inkubation bei 25°C für 10 min

Inkubation bei 37°C für 120 min

Inkubation bei 85°C für 5 sek

Abkühlen auf 4°C

Die cDNA wurde anschließend mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 20 ng/µl eingestellt und bis zu RT-PCR bei -20°C gelagert.

### 2.2.2.3 *Quantitative Real-Time PCR*

Die RT-PCR erfolgte mit Hilfe des *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) in einem 384-Mikrotiter Format. Zunächst wurde dafür die Primereffizienz aller verwendeten Primer bestimmt. Diese sollte optimaler Weise bei 2 liegen, was bedeutet, dass pro Amplifikationsschritt eine Verdopplung der DNA stattgefunden hat. Nur Primer mit einer Effizienz von > 1,8 wurden in die RT-PCR eingesetzt und die jeweilige Effizienz für die Berechnung der Genexpression berücksichtigt. Der Vorwärts- und der Rückwärtsprimer wurden für die RT-PCR vermischt und auf 0,5 µM eingestellt. Je 2 µl des Primer-Mix wurden pro Kavität vorgelegt (Endkonzentration 0,2 µM). Anschließend wurde die cDNA mit dem PCR Master Mix (2x) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 8 ng cDNA pro Reaktion erreicht wurde. Das Endvolumen pro Reaktion und Kavität beträgt 5 µl und alle Reaktionen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurde zum Ausschluss einer DNA Kontamination eine -RT Kontrolle, sprich RNA ohne die Umschreibung in cDNA, durchgeführt. Ein Ausschluss von Verunreinigungen der PCR Komponenten wurde durch eine Wasserkontrolle ermöglicht. Als Referenz wurde das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin in allen Proben bestimmt.

Die RT-PCR Reaktion und die anschließende Schmelzkurvenanalyse wurde am 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Amplifikation erfolgt nach folgendem PCR-Programm: 95°C für 10 min, 40 Zyklen: 15 sek 95°C, 1 min 60°C, 15 sek 95°C. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurve generiert, bei der die DNA durch steigende Temperatur denaturiert und SYBR Green freigesetzt wurde. Dies ermöglicht den Nachweis unspezifischer Produkte, da jedes DNA Fragment ein spezifisches Schmelzverhalten aufweist. Die Auswertung der Messsignale erfolgte mit Hilfe des

Programms SDS 2.2.1 (Amplified Biosystems) und die Berechnung der relativen Genexpression wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt (Livak und Schmittgen, 2001). Diese Methode beinhaltet die folgenden Berechnungen:

**Schritt 1** Bildung der Mittelwerte

**Schritt 2** Normalisierung des Zielgenes gegen die endogene Kontrolle ( $\beta$ -Aktin)  $C_{t_{\text{Zielgen}}} - C_{t_{\beta\text{-Aktin}}} = \Delta C_t$

**Schritt 3** Relativierung zum Kalibrator (DMSO Kontrolle)  $\Delta C_{t_{\text{Probe}}} - \Delta C_{t_{\text{Kalibrator}}} = \Delta\Delta C_t$

**Schritt 4** Genexpression  $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Von jeder Probe wurden sowohl biologische als auch technische Triplikate in die RT-PCR eingesetzt. Die Abweichung vom Mittelwert wurde durch die Standardabweichung (STDEV) dargestellt und die Bestimmung der Signifikanz erfolgte durch den t-Test.

### 2.2.3 *Proteinchemische Methoden*

#### 2.2.3.1 *Proteinextraktion (Gesamtzelllysat)*

Die Zellen wurden nach Behandlung und Inkubation, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml PBS (+ 1x Protease Inhibitor Cocktail und 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail 2) mittels Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst und durch Zentrifugation bei 3200 x g für 5 min und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS (+) gewaschen, erneut pelletiert und der Überstand vollständig abgenommen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 100  $\mu$ l des Protein-Lysepuffers (1 % SDS) und anschließender Sonifikation (Sonoplus HD-2200). Der Proteinüberstand wurde bei 14000 x g für 10 min und 4°C von den zellulären Bestandteilen getrennt und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.3.2 *Proteinextraktion (nuklearer und zytosolischer Extrakt)*

Die Isolation der nuklearen und zytosolischen Proteine erfolgte mit Hilfe des NE-PER Extraktions-Kits (Thermo Scientific). Dafür wurden die Zellen nach Behandlung und

Inkubation, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml PBS (+ 1x Protease Inhibitor Cocktail und 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail 2) mittels Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst und durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS (+) gewaschen, erneut pelletiert und der Überstand vollständig abgenommen. Nach optischer Abschätzung des Pelletvolumens erfolgte die Extraktion entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Proteinüberstände wurden in „Protein LoBind“ Gefäßen bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.3 *Proteinbestimmung*

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Pierce<sup>®</sup> 660 nm Protein Test (Thermo Scientific) verwendet. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Gesamtproteine ein Kompatibilitätsreagenz für ionische Detergentien (Thermo Scientific) verwendet, da dieses die Proteinbestimmung in Anwesenheit von bis zu 5 % SDS ermöglicht. Die Proben wurden je nach Bedarf in doppelt destillierten H<sub>2</sub>O (ddH<sub>2</sub>O) verdünnt. Für die Bestimmung wurden 10 µl Probe mit 150 µl Reagenz in einer Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte versetzt. Diese wurde 1 min auf einer Schüttelplatte bei 600 rpm durchmischt und 5 min inkubiert. Die Messung der optischen Dichte bei 660 nm erfolgte am Multi-Detektions-Mikroplatten-Reader POLARstar Omega. Zusätzlich wurde eine BSA-Standardreihe (0-0,8 mg/ml) in ddH<sub>2</sub>O generiert, durch die das Quantifizieren der Proteine ermöglicht wurde. Alle Proben wurden in Triplikaten vermessen und der Mittelwert bestimmt.

### 2.2.3.4 *LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (LDS-PAGE)*

Mit Hilfe von LDS-PAGE ist es möglich Proteine nach ihrer molekularen Größe in einem Polyacrylamidgel zu trennen. Dafür wurden die Proteine zunächst für 10 min bei 70°C in 1x NuPAGE®LDS Probenpuffer + 50 mM DTT denaturiert. Das anionische Detergenz Lithiumdodecylsulfat (LDS) bindet dabei an den Proteinen und überdeckt deren Eigenladung vollständig. Durch die Zugabe des Reduktionmittels DTT wurden zusätzlich Disulfidbrücken gespalten, sodass Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen wurden und die Proteine linearisiert vorlagen. Für das Gesamtzelllysate wurden je 20 µg Protein und für den nuklearen und zytosolischen Extrakt wurden je 12 µg Protein in 10 µl auf das 4-12 % Bis-Tris-Gel (Invitrogen) aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl eines 1:1 Gemisches aus Western

Magic Marker XP (Invitrogen) und „dual color“ Marker (Biorad) aufgetragen, so dass eine Größenbestimmung der Proteine später möglich war. Als Laufpuffer diente der NuPAGE®MES SDS Laufpuffer (Invitrogen).

Durch das Anlegen einer Spannung von 80 Volt (15-30 min) konnten die Proteine in das Gel einwandern und die darauf folgende Trennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 150 Volt. Kleine Proteine migrieren dabei schneller durch das Gel, da sie dieses schneller passieren können als Größere. Die Elektrophorese wurde beendet sobald die 25 kD Markerbande das Gelende erreicht hatte.

### 2.2.3.5 Western Blot

Die in der LDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch die Western-Blot Methode auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, wo sie mittels Antikörperfärbung detektiert wurden. Bei dieser Methode wird ein elektrisches Feld angelegt, welches bewirkt, dass die durch LDS negativ geladenen Proteine zur Anode wandern. Dabei wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken gebunden werden.

Für den Transfer wurde das Gel zunächst für 10 min in Transferpuffer equilibriert. Die Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) wurde für 10 min in ddH<sub>2</sub>O aktiviert und für 10 min im Transferpuffer equilibriert. Zusätzlich wurden zwei Schwämme und vier Whatman Filterpapiere in Puffer getränkt. Die Einzelteile wurden anschließend luftblasenfrei entsprechend Abbildung 7 zusammengebaut.

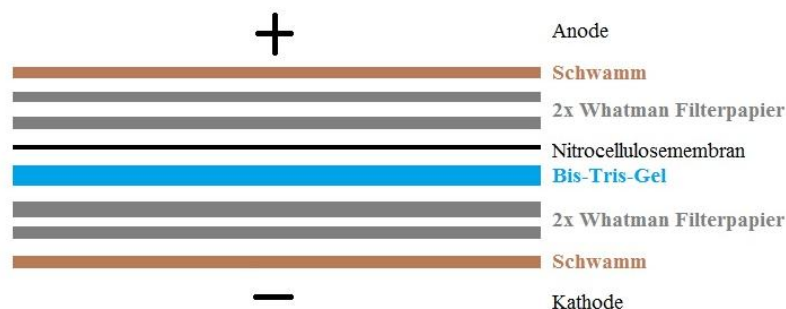


Abbildung 7, schematischer Aufbau des Western-Blot Sandwiches.

Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 4 h in einer Tank-Blot Apparatur (Biozym). Um eine starke Wärmeentwicklung zu vermeiden, wurde der Transfer im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

#### 2.2.3.6 *Coomassie Färbung*

Coomassie–Brillant-Blue ist ein Farbstoff, der sich an die basische Seitenketten der Aminosäuren anlagert und somit Proteine unspezifisch anfärbt. Nach dem Western-Blot wurde mittels Coomassie-Färbung überprüft, ob der Transfer der Proteine erfolgreich war. Das Gel wurde dafür in einer SERVA Blue G Färbelösung (Serva) für 15 sek bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt und für 24 h bei RT inkubiert. Um unspezifische gebundenes Coomassie-Brillant-Blue aus dem Gel zu entfernen, wurde das Gel in Entfärberlösung für 15 sek bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt und für 24 h bei RT inkubiert. Die Entfärberlösung wurde ausgetauscht und das Gel bis zur Entfärbung des Hintergrunds inkubiert.

#### 2.2.3.7 *PonceauS-Färbung*

PonceauS ist ein Azofarbstoff, welcher positiv geladene Aminogruppen reversibel anfärbt. Die PonceauS-Färbung wird verwendet, um die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran zu visualisieren. Sie ermöglicht die Überprüfung des vollständigen Transfers und dient als erste Ladekontrolle vor der Immunfärbung. Die Membran wurde nach dem Western-Blot zunächst im Transferpuffer und anschließend in einer PonceauS-Färbelösung (Appllichem) geschwenkt bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Entfärbung erfolgte durch mehrfaches Waschen in ddH<sub>2</sub>O.

#### 2.2.3.8 *Immunologische Proteindetektion*

Mit Hilfe der immunologischen Proteindetektion können Proteine spezifisch nach dem Antigen-Antikörper Bindungsprinzip detektiert und durch eine Chemilumineszenzreaktion visualisiert werden. Da die Nitrocellulosemembran Proteine per se bindet, mussten freie Bindungsstellen zunächst blockiert werden. Dies erfolgte für eine Stunde (schüttelnd, RT) je nach Antikörper, in einer BSA oder Milchpulver enthaltenden TBST-Lösung (2.1.6). Im Anschluss wurde der Primärantikörper in TBST (+ BSA oder Milchpulver; 2.1.6) verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte unter leichtem schwenken über Nacht bei 4°C. Der Primärantikörper bindet spezifisch am gewünschten Protein.



Unspezifisch gebundene Antikörper werden im Anschluss durch 3 Waschschrte à 10 min mit TBST entfernt. Ein Sekundärantikörper, der mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und spezifisch gegen die Fc-Domäne des Primärantikörpers gerichtet ist, wurde anschließend für eine Stunde, bei RT unter leichtem Schütteln auf der Membran inkubiert. Auch hier wurden im Anschluss ungebundene Antikörper durch 3 Waschschrte à 10 min mit TBST entfernt. Durch Zugabe eines Chemilumineszenz-Reagenz (Perkin Elmer) kam es zu einer durch HRP katalysierten Luminol- Reaktion, unter Entstehung von Chemilumineszenz. Diese konnte mit Hilfe des Fuji LAS-100 Geldokumentationssystems detektiert werden. Die quantitative Analyse der Proteinbanden wurde durch die Software GelAnalyser2010a durchgeführt.

#### 2.2.3.9 *Membranstripping*

Eine Detektion von mehreren Proteinen oder zusätzliche Detektion von posttranslationalen Modifikation (z.B. Phosphorylierung) wurde durch „das Strippen“ der Membran ermöglicht. Durch Zugabe des Restore™ Plus Western Blot Stripping Puffers (Thermo Scientific) und 5 min Inkubation bei RT wurden die Bindungen von Primär- und Sekundärantikörpern an die Membran gelöst. Die Membran wurde im Anschluss 3x 10 min in TBST gewaschen und konnte erneut für die Immundetektion eingesetzt werden.

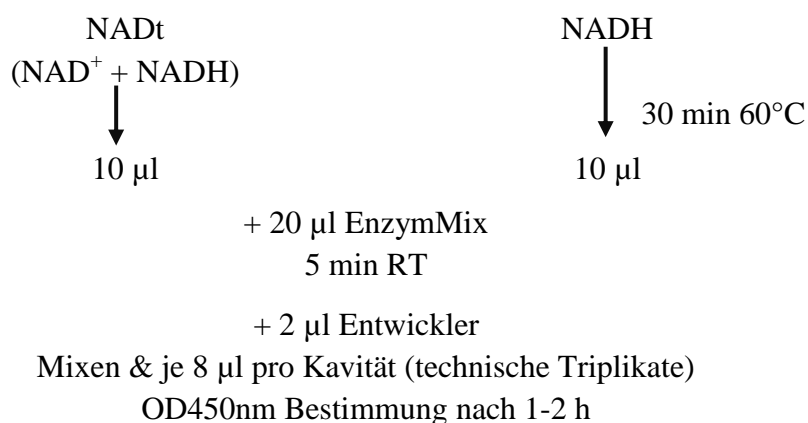
### 2.2.4 *Nachweis von Metaboliten*

#### 2.2.4.1 *NAD<sup>+</sup>/NADH Bestimmung*

Das Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) und sein Reduktionsäquivalent NADH spielen in vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle und geben eine Auskunft über den Redoxstatus der Zelle. Das NAD<sup>+</sup>/NADH Quantifizierungskit (Biovision) bietet die Möglichkeit über eine Enzymreaktion die beiden intrazellulären Metaboliten photometrisch zu quantifizieren und das NAD<sup>+</sup>/NADH Verhältnis zu bestimmen. Dafür wird in einem Ansatz, durch die Umwandlung von NAD<sup>+</sup> zu NADH, der Gesamtanteil beider Nukleotide erfasst (NAD total) und in einem zweiten Ansatz durch Eliminierung von NAD<sup>+</sup> nur der

NADH-Anteil bestimmt. Somit ergibt sich der  $\text{NAD}^+$  Gehalt durch die Differenz von NADH zu NAD total.

Für die Analyse wurden NHDF in einer T150-Zellkulturflasche mit Resveratrol und der Kontrolle DMSO behandelt und für 16 h im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mittels Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei  $1000 \times g$  für 5 min und  $4^\circ\text{C}$  pelletiert und in  $200 \mu\text{l}$  eiskaltem Extraktionspuffer (Biovision) aufgenommen. Die Zellyse erfolgte über zwei Einfrier-Auftau-Zyklen, gefolgt von intensivem Vortexen (10 sek) und einem Zentrifugationschritt (15 min,  $20800 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ), bei dem zelluläre Bestandteile abgetrennt wurden. Das Zelllysate wurde während der Aufbearbeitung immer kalt gehalten, um den Abbau von  $\text{NAD}^+$  zu verhindern. Lediglich ein Teil (circa  $20 \mu\text{l}$ ) des Lysats wurde für 30 min auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt, sodass  $\text{NAD}^+$  in der Probe abgebaut wurde. Die  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Bestimmung erfolgte in einem miniaturisierten 384-Mikrotiterplatten Format nach folgendem Fließschema.



Die Messung der optischen Dichte bei 660 nm erfolgte am Multi-Detektions-Mikroplatten-Reader POLARstar Omega. Für die Konzentration-Bestimmung wurden zwei NADH Standardreihen ( $0-10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ) generiert. Eine davon wurde, wie auch die Proben für die NADH Bestimmung, für 30 min auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt und für die NADH Quantifizierung verwendet, während die zweite, unbehandelt, für die NAD total Quantifizierung verwendet wurde. Die Normalisierung erfolgte durch den Proteingehalt im Zelllysate (siehe 2.2.3.3). Von jeder Probe wurden sowohl biologische als auch technische Triplikate hergestellt. Die Abweichung vom Mittelwert wurde durch die Standardabweichung (STDEV) dargestellt und die Bestimmung der Signifikanz erfolgte durch den t-Test.

#### 2.2.4.2 *Pyruvat-Bestimmung*

Pyruvat stellt ein wichtiges Zwischenprodukt im Abbau von Glukose zu Energie dar und kann Auskunft über den metabolischen Zustand der Zelle geben. Der Pyruvatgehalt wurde hierbei im Zellkulturüberstand mit Hilfe des Pyruvat Quantifizierungskits (BioVision) bestimmt. Pyruvat wird durch eine Pyruvatoxidase oxidiert, wobei ein Farbstoff generiert wird, der bei einer OD von 570 nm messbar ist. Das gemessene Signal verhält sich proportional zur Pyruvat-Konzentration und lässt sich anhand einer Pyruvat-Standardreihe (0-0,2 mM) quantifizieren. Für den Test wurde ein Teil des Zellkulturüberstandes 16 h nach der jeweiligen Behandlung abgenommen und durch Zentrifugation (15 min bei 1000 xg, 4°C) von den Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand wurde aliquotiert bei -80°C für den weiteren Gebrauch gelagert. Zudem wurde das Zellkulturmedium (DMEM, Invitrogen), welches Pyruvat enthält analysiert. Für die Messung mussten die Überstände und das Medium im Verhältniss 1:5 im Pyruvat-Testpuffer verdünnt werden. Anschließend wurden diese im Verhältniss 1:1 mit dem Pyruvat-Reaktionsmix gemischt und 30 min bei RT, im Dunkeln inkubiert. Die Vermessung der Proben wurde im 384-Mikrotiterplatten Format durchgeführt. Von jeder Reaktion wurden 10 µl pro Kavität überführt und jede Probe wurde in Triplikaten vermessen. Die Messung der optischen Dichte bei 570 nm erfolgte am Multi-Detektions-Mikroplatten-Reader POLARstar Omega. Die Normalisierung erfolgte durch den Proteingehalt im Zelllysat (siehe 2.2.3.3). Von jeder Probe wurden somit biologische und technische Triplikate hergestellt. Die Abweichung vom Mittelwert wurde durch die Standardabweichung (STDEV) dargestellt und die Bestimmung der Signifikanz erfolgte durch den t-Test.

#### 2.2.4.3 *Laktat-Bestimmung*

Während der Milchsäuregärung wird Pyruvat zu Laktat umgesetzt. Dieser Mechanismus ermöglicht die schnelle Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup>, welches dann der Glykolyse wieder zur Verfügung steht. Der Laktatgehalt wurde hierbei ebenfalls im Zellkulturüberstand mit Hilfe des Laktat Quantifizierungskits (BioVision) bestimmt. In der Reaktion wird in Abhängigkeit der Laktat-Konzentration ein Farbstoff generiert, der bei 570 nm messbar ist. Anhand einer Laktat-Standardreihe (0-0,2 mM) ist eine Quantifizierung möglich. Für den Test wurde ein Teil des Zellkulturüberstandes 16 h nach der jeweiligen Behandlung

abgenommen und durch Zentrifugation (15 min bei 1000 xg, 4°C) von den Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Für die Messung mussten die Überstände zunächst im Verhältniss 1:40 im Laktat-Testpuffer verdünnt werden. Anschließend wurden diese im Verhältniss 1:1 mit dem Laktat-Reaktionsmix gemischt und 30 min bei RT, im Dunkeln inkubiert. Die Vermessung der Proben wurde im 384-Mikrotiterplatten Format durchgeführt. Von jeder Reaktion wurden 10 µl pro Kavität überführt und jede Probe wurde in Triplikaten vermessen. Als Hintergrundkontrolle diente das Zellkulturmedium. Die Messung der optischen Dichte bei 570 nm erfolgte am Multi-Detektions-Mikroplatten-Reader POLARstar Omega. Die Normalisierung erfolgte durch den Proteingehalt im Zellysat (siehe 2.2.3.3). Von jeder Probe wurden somit biologische und technische Triplikate hergestellt. Die Abweichung vom Mittelwert wurde durch die Standardabweichung (STDEV) dargestellt und die Bestimmung der Signifikanz erfolgte durch den t-Test.

#### 2.2.4.4 *ATP-Bestimmung*

ATP ist der wichtigste Energieträger der Zellen und wird durch die Atmungskette in den Mitochondrien gebildet. Sinkt der ATP Spiegel werden Enzyme des Glykogen- und Fettabbaus und der Glykolyse aktiviert. Steigt der ATP Spiegel hingegen so werden die Glykogen- und Fettspeicherung initiiert. Anhand des ATP-Bestimmung-Kits (Biovision) wurde der ATP-Gehalt in NHDF bestimmt. Die Bestimmung beruht dabei auf die Phosphorylierung von Glycerol durch ATP, unter Ausbildung eines Farbstoffes, welcher bei 570 nm detektierbar ist. Anhand einer ATP-Standardreihe (0-40 µM) ist eine Quantifizierung möglich. Die Zellen wurden dafür nach Behandlung mit eiskaltem PBS gewaschen und mittels Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 x g, 5 min, 4°C pelletiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach Zentrifugation in 100 µl eiskalten ATP-Testpuffer (Biovision) aufgenommen und umgehend auf Trockeneis eingefroren. Für die Messung wurde das Zellysat durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und anschließend unverdünnt in die Messung eingesetzt. Die Proben wurden dafür im Verhältniss 1:1 mit dem ATP-Reaktionsmix gemischt und 30 min bei RT, im dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurden die Hintergrundaktivität durch einen ATP-Reaktionsmix ohne „ATP-Converter“ in jeder Probe bestimmt. Die Vermessung der Proben wurde in einem 384-Mikrotiterplatten Format

durchgeführt. Von jeder Reaktion wurden 10 µl pro Kavität überführt und jede Probe wurde in Triplikate vermessen. Die Messung der optischen Dichte bei 570 nm erfolgte am Multi-Detektions-Mikroplatten-Reader POLARstar Omega. Von jeder Probe wurden somit biologische und technische Triplikate hergestellt. Die Abweichung vom Mittelwert wurde durch die Standardabweichung (STDEV) dargestellt.

#### 2.2.4.5 ADP-Bestimmung

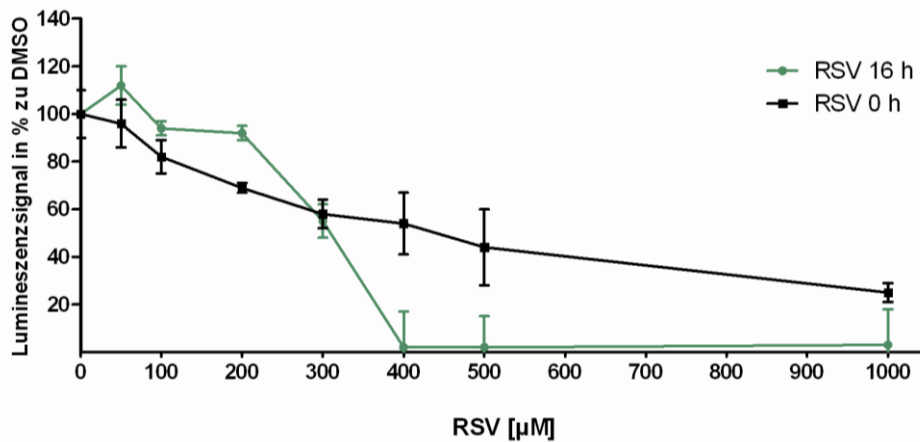
Das energieärmere ADP entsteht unter anderem durch die Dephosphorylierung von ATP und ist in der Regulation vieler Enzyme des Zellstoffwechsels beteiligt.

Mit Hilfe des ADP-Bestimmung-Kits (Biovision) wurde der ADP-Gehalt in NHDF bestimmt. Die Bestimmung beruht dabei auf die Umwandlung von ADP zu ATP und Pyruvat. Dabei wird ein Farbstoff gebildet, welcher bei 570 nm detektiert werden kann. Anhand einer ADP-Standardreihe (0-40 µM, gelöst in ATP-Testpuffer) ist eine Quantifizierung möglich. Die Zellen wurden dafür, nach Behandlung, mit eiskaltem PBS gewaschen und mittels Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 x g, 5 min, 4°C pelletiert und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in 100 µl eiskalten ATP-Testpuffer (Biovision) aufgenommen und umgehend auf Trockeneis eingefroren. Für die Messung wurde das Zellysate durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen getrennt und anschließend unverdünnt in die Messung eingesetzt. Die Proben wurden dafür im Verhältniss 1:1 mit dem ADP-Reaktionsmix gemischt und 30 min bei RT, im dunkeln inkubiert. Zusätzlich wurden die Hintergrundaktivität durch einen ADP-Reaktionsmix ohne „ADP-Converter“ in jeder Probe bestimmt. Die Vermessung der Proben wurde in einem 384-Mikrotiterplatten Format durchgeführt. Von jeder Reaktion wurden 10 µl pro Kavität überführt und jede Probe wurde in Triplikaten vermessen. Die Messung der optischen Dichte bei 570 nm erfolgte am Multi-Detektions-Mikroplatten-Reader POLARstar Omega. Von jeder Probe wurden somit biologische und technische Triplikate hergestellt. Die Abweichung vom Mittelwert wurde durch die Standardabweichung (STDEV) dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zytotoxische Wirkung von Resveratrol auf dermale Fibroblasten

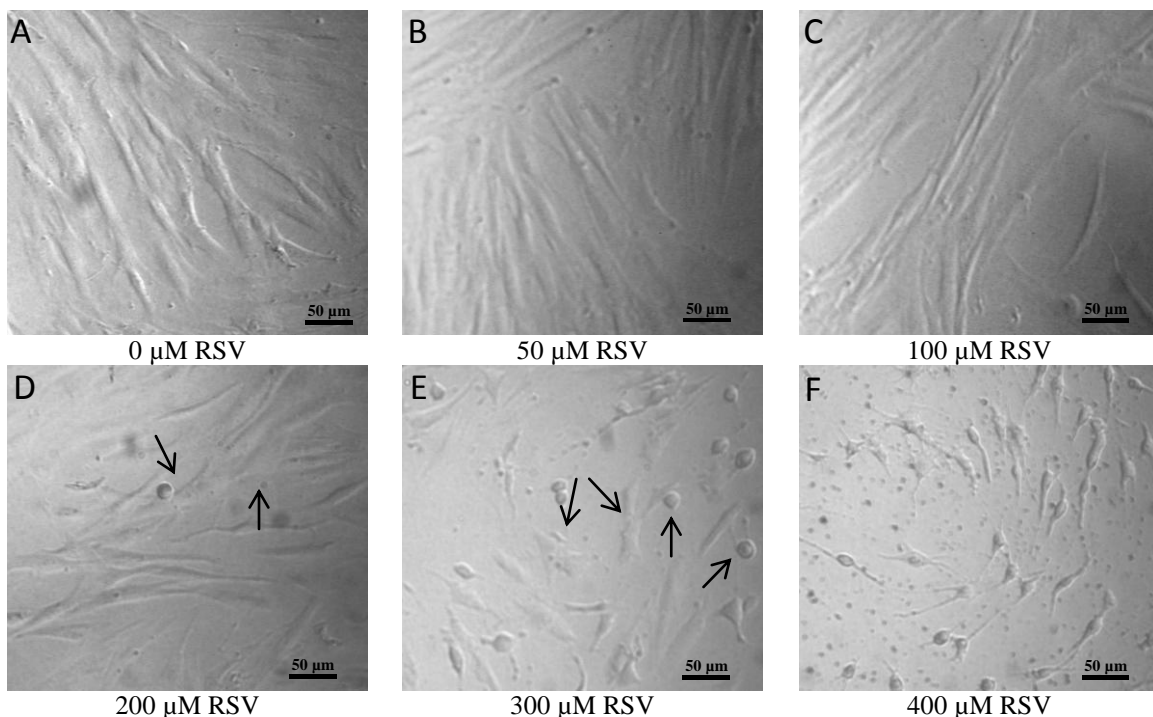
Für die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Resveratrol auf dermale Fibroblasten wurde der ATP-Gehalt behandelter Zellen mit Hilfe des Lumineszenz-basierten CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Testes untersucht. Der ATP-Gehalt dient dabei als Maß für metabolisch aktive Fibroblasten. Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Konzentration des Lösemittels DMSO behandelt und das entsprechende Lumineszenzsignal als 100 % Vitalität definiert. Zellen, die 16 h mit Resveratrol behandelt wurden, zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme bis hin zum Ausbleiben des Luciferasesignals ab einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  (Abbildung 8). Da bekannt ist, dass Resveratrol die Enzymaktivität der „Firefly Luciferase“ inhibieren kann (Hook, 2011), wurden Zellen zusätzlich direkt vor der Messung mit steigender Resveratrol-Konzentration behandelt (0 h) und das Luciferasesignal gemessen. Mit zunehmender Konzentration nahm das Lumineszenzsignal im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen ab (Abbildung 8) und bestätigt den inhibierenden Einfluss von Resveratrol auf die Enzymaktivität.



**Abbildung 8**, CellTiter-Glo<sup>®</sup> Test, dermale Fibroblasten (NHDF) wurden 16 h und 0 h mit Resveratrol (RSV; 0-1 mM) behandelt und der ATP Gehalt relativ zu DMSO (0-1 %) behandelten Zellen bestimmt.

Somit ist eine quantitative Auswertung der Viabilität Resveratrol-behandelter Zellen nur bedingt möglich. Aus diesem Grund wurden die Zellen zusätzlich mikroskopisch begutachtet und die Morphologie bewertet.

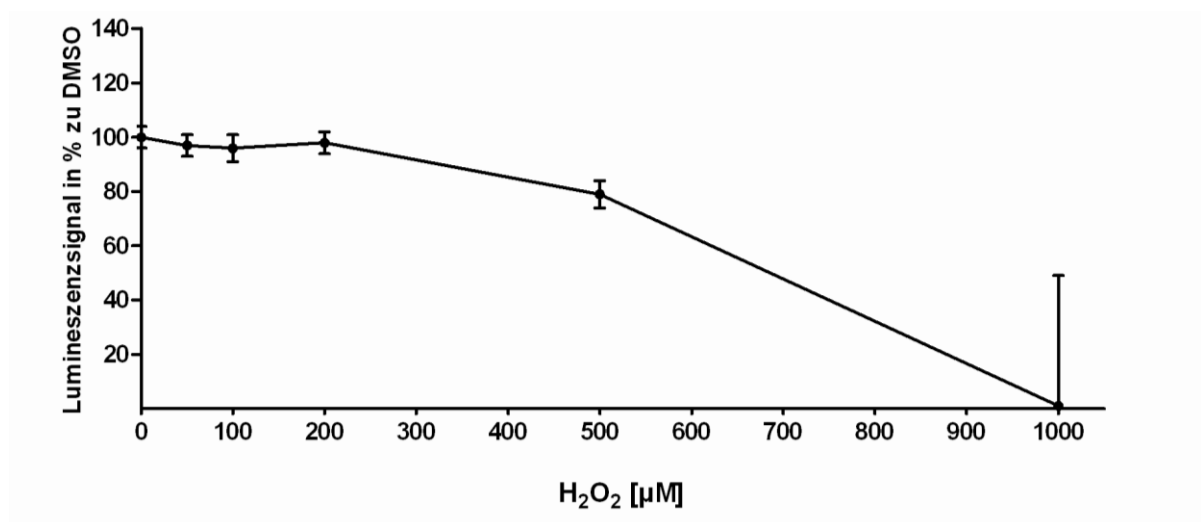
Bis zu 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol war keine morphologische Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennbar (Abbildung 9 A-C). Ab einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Resveratrol begannen die Zellen jedoch ihre fibroblastentypische, langgezogene und parallele Anordnung zu verlieren (Abbildung 9 D). Dieses Verhalten verstärkte sich mit steigender Konzentration und ab 300  $\mu\text{M}$  Resveratrol waren bereits erste zytotoxische Effekte, in Form von starken morphologischen Änderungen, wie dem Abrunden oder Verlust einer klaren Zellgrenze erkennbar (Abbildung 9 E). Zudem begannen die Zellen sich von der Flaschenoberfläche zu lösen. Des Weiterem war mit steigender Resveratrol-Konzentration eine Abnahme der Zelldichte zu erkennen.



**Abbildung 9**, Dermale Fibroblasten wurden in einer 384-Mikrotiterplatte für 16 h mit steigender Resveratrol-Konzentration (RSV: 50-400  $\mu\text{M}$ ) behandelt und anschließende mikroskopisch bewertet.

Anhand dieser Erkenntnisse wurde für alle weiteren Versuche eine Behandlungskonzentration von 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol gewählt, welche einer DMSO Konzentration von 0,1 % entspricht.

Eine zusätzliche Kontrolle stellt die Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  dar. Der Zerfall von Resveratrol führt zur Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dabei entspricht die generierte Peroxidmenge ca. 50 % der ursprünglichen Resveratrol-Konzentration (Yang et al., 2010). Bei der gewählten Behandlungskonzentration von 100  $\mu\text{M}$  RSV würden dementsprechend ca. 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehen. Um einen peroxid-induzierten zytotoxischen Effekt auszuschließen, wurde ebenfalls der CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Tests durchgeführt. Dabei wurden alle Verdünnungen mit 0,1 % DMSO versetzt und das Lumineszenzsignal DMSO-behandelter Zellen als 100 % Vitalität definiert. In der folgenden Abbildung 10 ist zu erkennen, dass bis zu einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  das Lumineszenzsignal nahezu konstant war. Des Weiteren waren die Zellen morphologisch nicht verändert (nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  als Kontrolle eingesetzt.



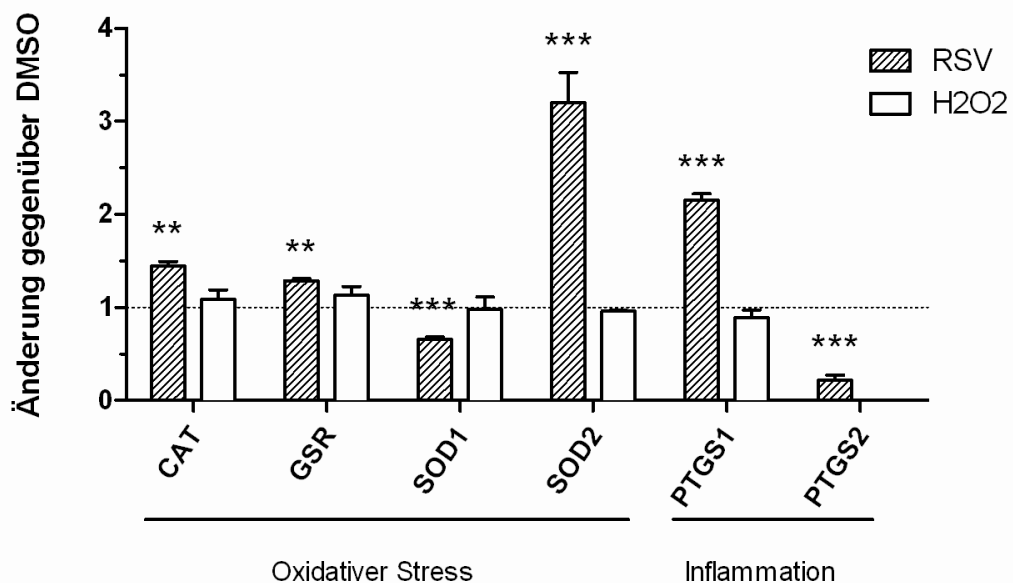
**Abbildung 10**, CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Test, dermale Fibroblasten (NHDF) wurden 16 h mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0-1 mM) 0,1 % DMSO behandelt und der ATP Gehalt relativ zu 0,1 % DMSO-behandelten Zellen bestimmt.



### 3.2 Effekte von Resveratrol auf die Genexpression dermalen Fibroblasten

Resveratrol besitzt in einer Vielzahl von Zellmodellen antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften sowie eine positive Wirkung auf den Zellmetabolismus. Mit Hilfe ausgewählter Gene aus den Bereichen Transkriptionsfaktoren, oxidativem Stress, Inflammation, Energie- und Fettmetabolismus, sollten Wirkmechanismen von Resveratrol und  $H_2O_2$  untersucht werden. Dafür wurde mittels RT-PCR die Genexpression relativ zur Lösemittelkontrolle DMSO quantifiziert.

Die an der Bewältigung von ROS und oxidativen Stress beteiligte Katalase (CAT) und Glutathion Reduktase (GSR) wurden durch die Resveratrol-Behandlung 1 verstärkt exprimiert, während die Superoxid-Dismutase2 (SOD2) rund 3-fach stärker exprimiert wurde. Dahingegen war die Expression der Superoxid-Dismutase1 (SOD1) signifikant reduziert (Abbildung 11).

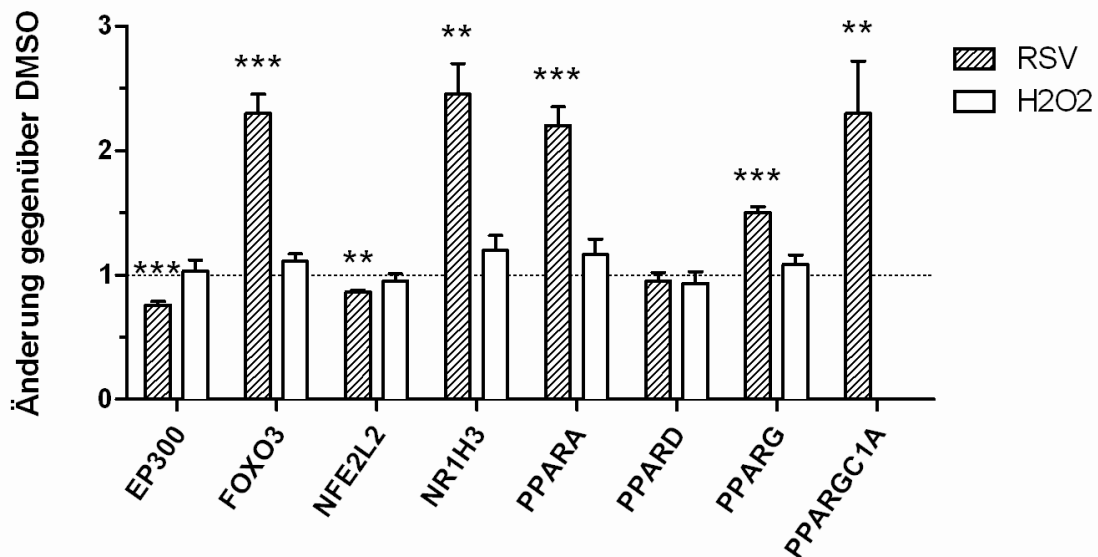


**Abbildung 11, Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR,** NHDF wurden 16 h mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) oder 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  behandelt und die Änderung der Genexpression gegenüber DMSO 0,1 % ermittelt;  $\pm$  SD biologischer und technischer Triplikate; \*\*:p-Wert < 0,01; \*\*\*:p-Wert < 0,001.

Die beiden getesteten Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen (PTGS1, PTGS2) dienen als Inflammationsmarker. Während die konstitutive PTGS1 signifikant hochreguliert wurde, zeigte die induzierbare PTGS2 signifikante Herunterregulation (Abbildung 11).

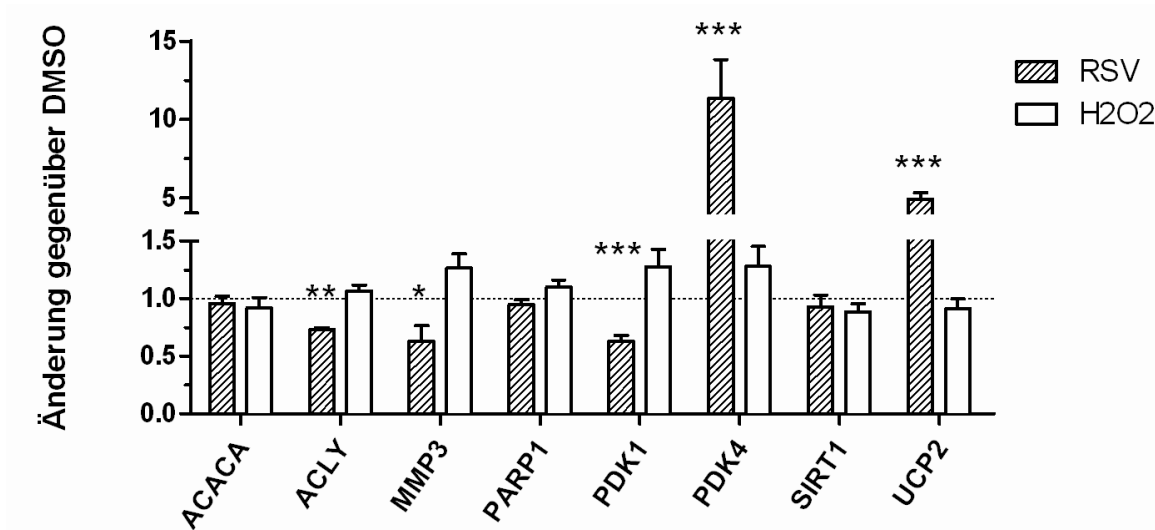
Fibroblasten, die unter den gegebenen Bedingungen mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt wurden, zeigten in den untersuchten Genen für oxidativen Stress und Inflammation keine signifikanten Veränderungen.

Genexpressionsänderungen nach Resveratrol-Behandlung konnte auch bei den untersuchten Transkriptionsfaktor- und Coreulatorgenen gezeigt werden (Abbildung 12). Hierbei waren Transkriptionsfaktoren, die bei der mitochondrialen Biogenese (Peroxisomen Proliferation-Aktivierter Rezeptor Gamma, Coaktivator 1 alpha; PPARGC1A) sowie der ROS-Eliminierung (forkhead box O3; FOXO3) von Bedeutung sind, verstärkt exprimiert. Auch den Metabolismus regulierende Faktoren wie PPARA, PPARG und NR1H3 ( $\text{LXR}\alpha$ ) zeigten eine signifikant höhere Genexpression. Eine Ausnahme ist der nukleare Rezeptor PPARD (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\delta$ ), dessen Expression unverändert war. Eine signifikante Herunterregulation konnte sowohl beim Transkriptionsfaktor NFE2L2 (NF-E2 verwandter Faktor 2), welcher an der Regulation der antioxidativen Antwort beteiligt ist, als auch bei dem als Histonen-Acetyltransferase fungierenden Coaktivator EP300 (E1A Bindendes Protein p300) gezeigt werden. Die Kontrollbehandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wies keine signifikante Regulation der Genexpression gegenüber DMSO auf.



**Abbildung 12, Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR**, NHDF wurden 16 h mit 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol (RSV) oder 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt und die Änderung der Genexpression gegenüber DMSO 0,1 % ermittelt;  $\pm$  SD biologischer und technischer Triplikate; \*\*:p-Wert < 0,01; \*\*\*:p-Wert < 0,001.

Die letzte Gruppe untersuchter Gene umfasst Enzyme, die unter anderem in der Energiegewinnung und Chromatinmodifikation beteiligt sind (Abbildung 13). Die Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) wurde rund 11-fach und das Entkopplerprotein 2 (UCP2) rund 5-fach stärker exprimiert.



**Abbildung 13, Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR**, NHDF wurden 16 h mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) oder 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und die Änderung der Genexpression gegenüber DMSO 0,1 % ermittelt;  $\pm$  SD biologischer & technischer Triplikate; \*: p-Wert < 0,05; \*\*:p-Wert < 0,01; \*\*\*:p-Wert < 0,001.

Die Isoform 1 der PDKs (PDK1), wie auch die ATP-Citrat-Lyase (ACLY) und Matrix-Metalloprotease 3 (MMP) hingegen waren signifikant schwächer exprimiert.

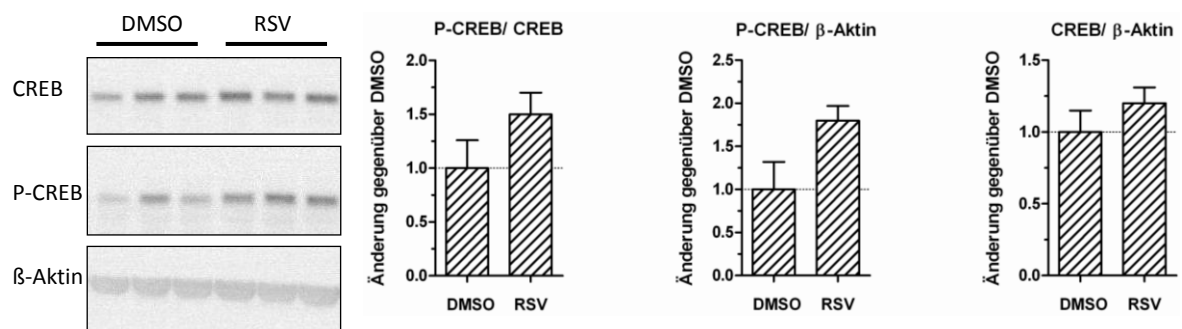
Ferner war keine Regulation der Acety-CoA Carboxylase (ACACA) zu beobachten. Auch die beiden NAD<sup>+</sup> abhängigen Proteine Sirtuin1 (SIRT1) und Poly(ADP-ribose) Polymerase1 (PARP1) wurden ebenfalls nicht durch Resveratrol reguliert. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontrolle zeigte auch für dieses Gruppe keine signifikanten Änderungen in der Genexpression, so dass sie für die Untersuchungen auf Proteinebene nicht berücksichtigt wurden.

### 3.3 Effekte von Resveratrol auf die Proteinexpression und Phosphorylierung

Im nächsten Schritt wurde die Veränderung der Proteinexpression durch Resveratrol mittels Immundetektion untersucht. Dafür wurden die Proteine über LDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und über Antikörperfärbung nachgewiesen. Da posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen die Funktion und Aktivität vieler Enzyme beeinflussen, wurden zusätzlich einige Phosphorylierungen an den Targetproteinen detektiert.

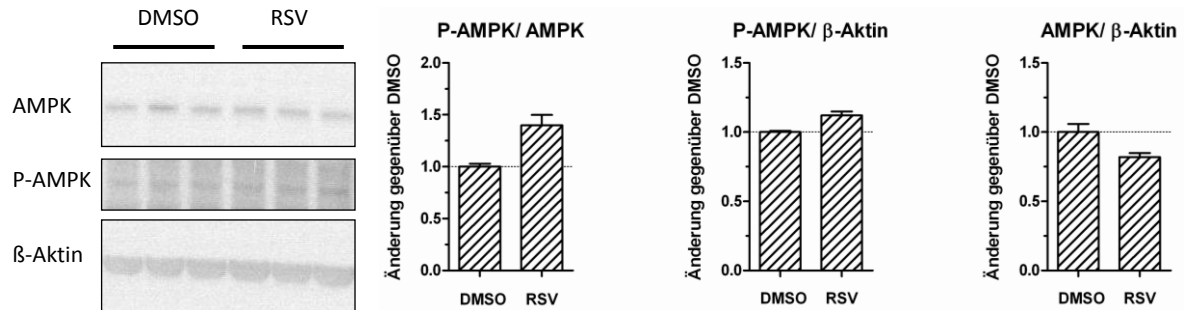
Zu den untersuchten Targets gehörten unter anderem Proteine, die laut Literatur in der Aktivierungskaskade von PGC-1 $\alpha$  durch Resveratrol beteiligt sind. Ein postulierter Mechanismus beschreibt die Hemmung der Phosphodiesterase 4 (PDE4) durch Resveratrol, welches zu einem erhöhten cAMP Spiegel führt (Park et al., 2012). Proteinkinase A (PKA) und Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CamKII) werden aktiviert und im Zuge dessen wird cAMP Responseelement Bindeprotein (CREB) phosphoryliert. Dieser Reaktionsmechanismus wurde mittels Immunfärbung überprüft und bekräftigt (Abbildung 14).

So konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung sowohl die P-CREB Menge (P-CREB/ $\beta$ -Aktin) als auch der P-CREB/CREB Verhältnis ansteigt.



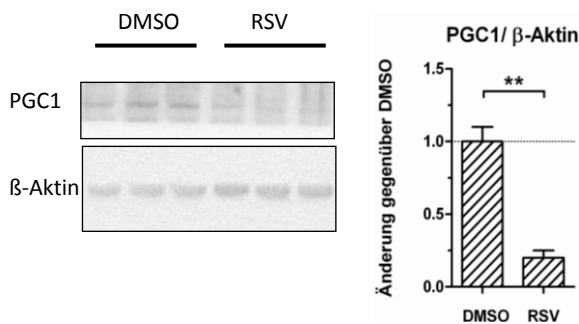
**Abbildung 14**, Immundetektion von cAMP Responseelement Bindeprotein (CREB; 43 kD) und P-CREB (Ser133) in NHDF Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO, normalisiert durch  $\beta$ -Aktin (43 kD);  $\pm$  SD biologischer Triplikate.

Die als metabolischer Sensor fungierende Kinase AMPK wird durch Phosphorylierung aktiviert und kann PGC-1 $\alpha$  phosphorylieren. Anhand des P-AMPK/AMPK Verhältnisses in Abbildung 15 ist eine erhöhte Phosphorylierung nach Resveratrol-Behandlung zu erkennen.



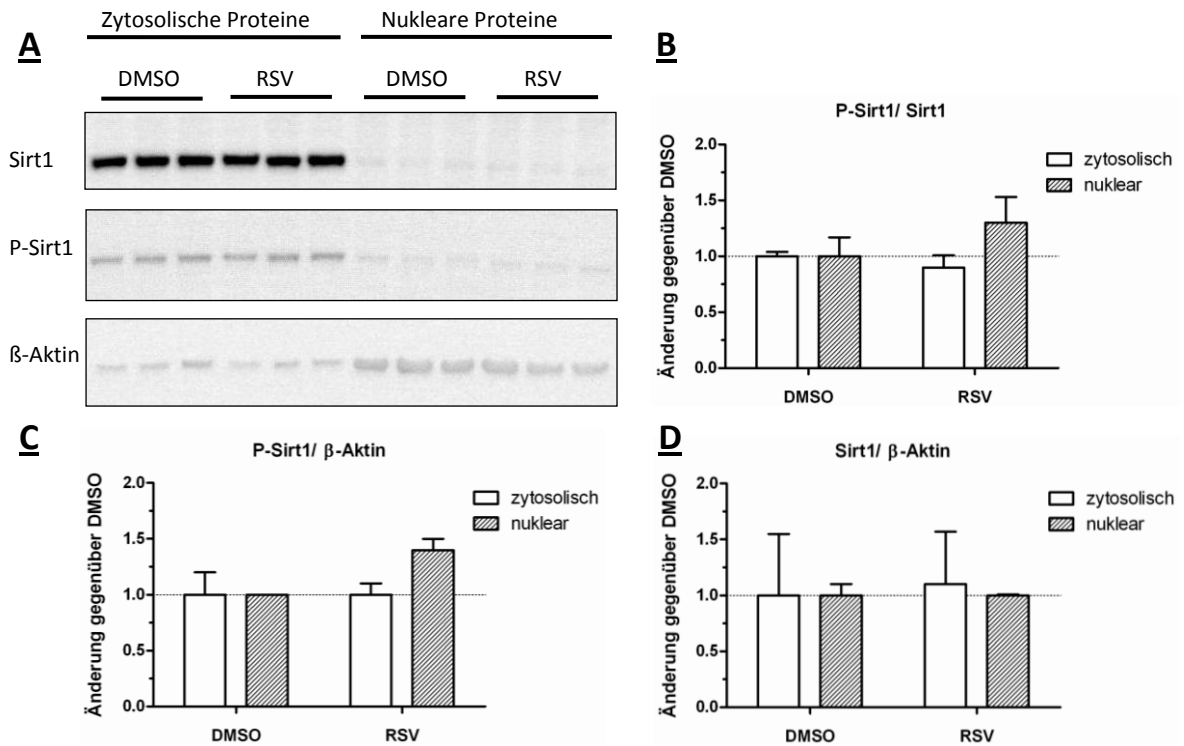
**Abbildung 15**, Immundetektion von Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK; 62kD) und P-AMPK (Thr172) in NHDF Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO, normalisiert durch  $\beta$ -Aktin (43 kD);  $\pm$  SD biologischer Triplikate.

Der in Abbildung 16 dargestellte Nachweis von PGC-1-Blot zeigt jedoch eine signifikante Abnahme des Proteins nach Resveratrol-Behandlung.



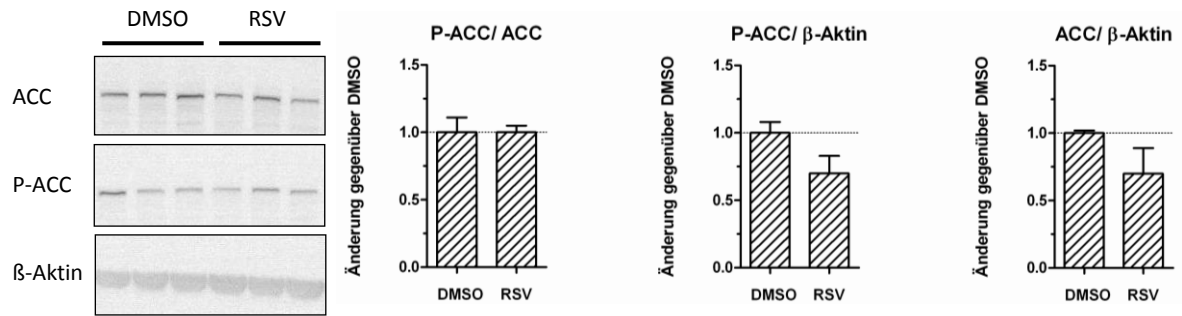
**Abbildung 16**, Immundetektion Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Coaktivator 1 (PGC1; 90 kD) im NHDF Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO, normalisiert durch  $\beta$ -Aktin (43 kD);  $\pm$  SD biologischer Triplikate.

Sirt1 wird durch Phosphorylierung aktiviert und ist ebenfalls an der Regulation von PGC-1 $\alpha$  beteiligt. Nach der Auftrennung nuklearer und zytosolischer Proteine ist zu erkennen, dass Sirt1 überwiegend im Cytoplasma zu finden ist (Abbildung 17 A). Die Behandlung mit Resveratrol führt zu einem Anstieg des phosphorylierten (Ser47) Sirt1 im Zellkern, aber nicht im Zytoplasma (C). Zudem bleibt der Gesamt-Sirt1-Anteil konstant (D). Dementsprechende ist das Verhältnis P-Sirt1/Sirt1 im Zellkern behandelter Zellen gegenüber den Kontrollzellen erhöht (B).



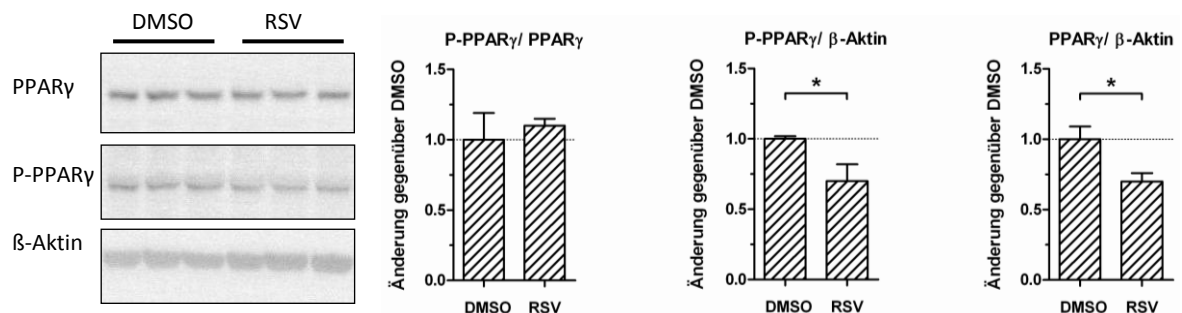
**Abbildung 17**, Immundetektion von Sirtuin1 (Sirt1; 120 kD) und P-Sirt1 (Ser47) im NHDF nuklearen und zytosolischen Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO (=1), normalisiert durch  $\beta$ -Aktin (43 kD);  $\pm$  SD biologischer Triplikate.

Ein weiteres Target von AMPK ist Acetyl-CoA Carboxylase (ACC). AMPK phosphoryliert ACC, wodurch das Enzym inaktiviert wird. Auf Proteinebene kann dies allerdings nicht mit Hilfe des P-ACC/ACC Verhältnisses (Abbildung 18) gezeigt werden. Jedoch vermindert sich die Menge des ACC Proteins.



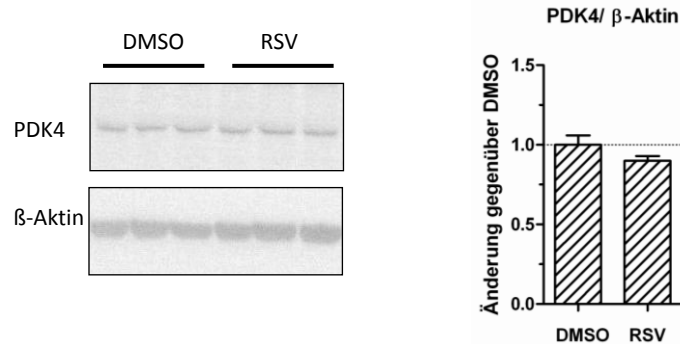
**Abbildung 18**, Immundetektion von Acetyl-CoA Carboxylase (ACC; 280 kD) und P-ACC (Ser79) in NHDF Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100 μM Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO (=1), normalisiert durch β-Aktin (43 kD); ± SD biologischer Triplikate.

PPAR $\gamma$ , ein Transkriptionsfaktor dessen Funktion in der Regulation der Energiehomöostase liegt, wurde ebenfalls nach Resveratrol-Behandlung immunologisch detektiert und der Phosphorylierungsstatus geprüft. Dabei zeigt sich sowohl eine signifikante Abnahme des gesamten als auch des phosphorylierten PPAR $\gamma$  Anteils, bei gleichbleibendem Verhältnis zueinander (Abbildung 19).



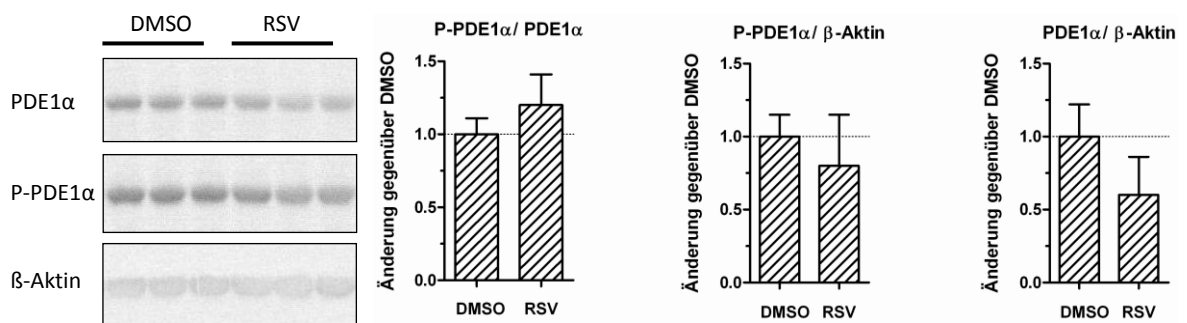
**Abbildung 19**, Immundetektion von Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ; 55/58 kD) und P-PPAR $\gamma$  (Ser273) in NHDF Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100 μM Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO (=1), normalisiert durch β-Aktin (43 kD); ± SD biologischer Triplikate.

Die RT-PCR zeigte eine signifikant erhöhte Expression der Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 nach Resveratrol-Behandlung (PDK4, Abbildung 13). Die Untersuchung auf Proteinebene konnte eine entsprechende Veränderung nicht bestätigen (Abbildung 20).



**Abbildung 20**, Immundetektion von Pyruvat Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4; 46 kD) in NHDF Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO (=1), normalisiert durch  $\beta$ -Aktin (43 kD);  $\pm$  SD biologischer Triplikate.

Die Funktion der PDKs liegt in der Phosphorylierung der Pyruvat Dehydrogenase Untereinheit E1 $\alpha$  (PDE1 $\alpha$ ), wodurch diese inhibiert wird. Durch die Untersuchung des PDK4 Targets, PDE1 $\alpha$ , konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle leicht zunimmt (Abbildung 21). Zudem war der gesamt PDE1 $\alpha$  Proteingehalt durch Resveratrol vermindert.

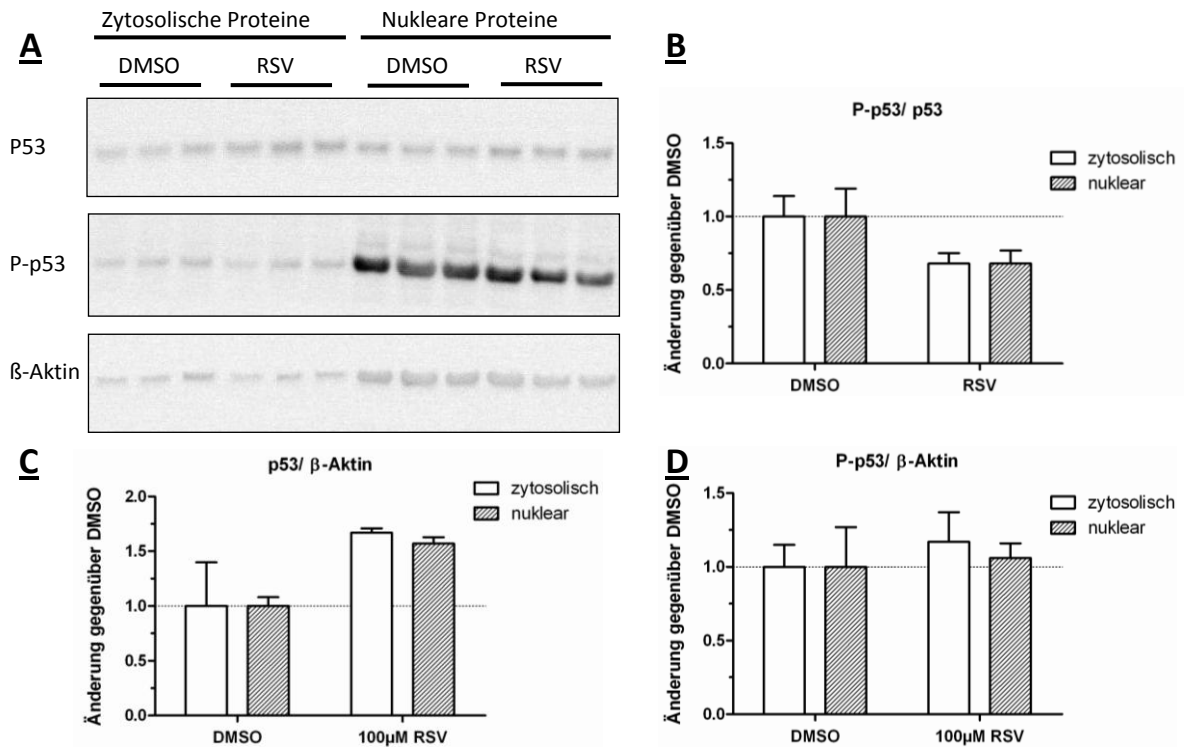


**Abbildung 21**, Immundetektion von Pyruvat Dehydrogenase E1 $\alpha$  (PDE1 $\alpha$ ; 43 kD) und P-PDE1 $\alpha$  (Ser293) in NHDF Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO (=1), normalisiert durch  $\beta$ -Aktin (43 kD);  $\pm$  SD biologischer Triplikate.



Zusätzlich wurde das Protein 53 (P53) und sein Phosphorylierungsstatus am Serin392 im Zytoplasma und im Zellkern untersucht. P53 ist in beiden Zellkompartimenten verteilt und nimmt in beiden erkennbar durch die Resveratrol-Behandlung zu (Abbildung 22 A/C).

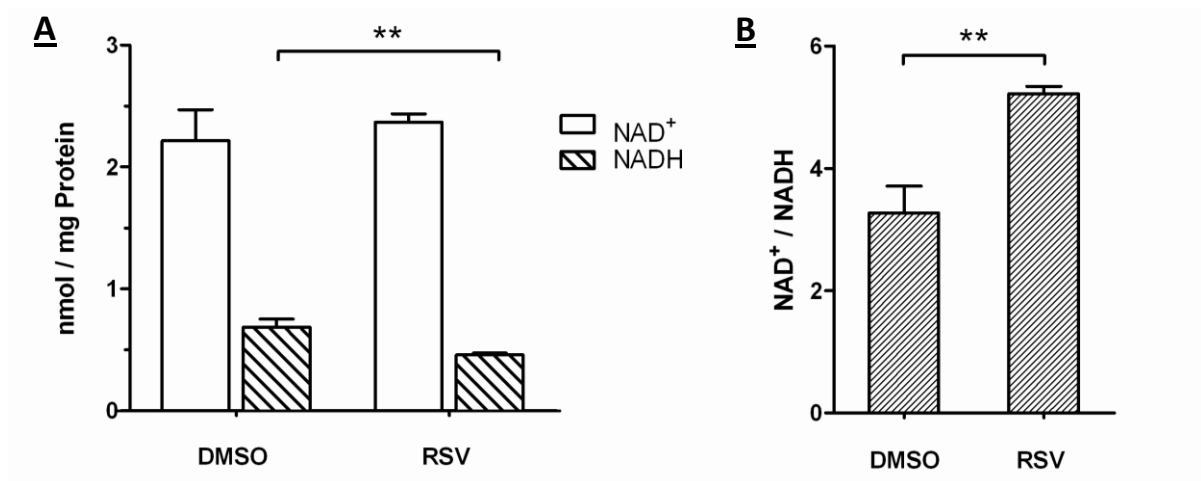
Dabei verändert sich jedoch nicht die totale Menge an P-p53 (D). Dies bedeutet, dass p53 nicht stärker phosphoryliert wird und sich dadurch das Verhältnis von P-p53/p53 vermindert (B).



**Abbildung 22** Immundetektion des Protein 53 (P53; 53 kD) und P-P53 (Ser392) im NHDF nuklearen und zytosolischem Proteinextrakt nach 16 h Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) gegenüber der Kontrolle 0,1 % DMSO (=1), normalisiert durch  $\beta$ -Aktin (43 kD);  $\pm$  SD biologischer Triplikate.

### 3.4 NAD<sup>+</sup>/NADH Bestimmung

Um den Einfluss von Resveratrol auf Stoffwechselforgänge der dermalen Fibroblasten zu untersuchen wurden Metaboliten quantifiziert, die in der Energiegewinnung, und in der Regulation von Enzymen beteiligt sind. Das Verhältnis von NAD<sup>+</sup> zu NADH spielt dabei eine entscheidende Rolle, da dieses den Redox-Status der Zelle widerspiegelt und somit Auskunft über die metabolische Aktivität und den Gesundheitszustand der Zelle liefert. Zudem beeinflusst NAD<sup>+</sup> als Coenzym die Aktivität vieler Stoffwechsellenzyme und lenkt dadurch den Metabolismus der Zelle (Houtkooper et al., 2010). Die Behandlung mit Resveratrol zeigte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine signifikante Reduktion von NADH von 0,69 (±0,07) auf 0,46 (±0,02) nmol / mg Protein, bei leicht erhöhter NAD<sup>+</sup> Konzentration (Abbildung 23.A). Dieses spiegelt sich auch im NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis wider, welches sich dadurch signifikant erhöht (Abbildung 23.B).

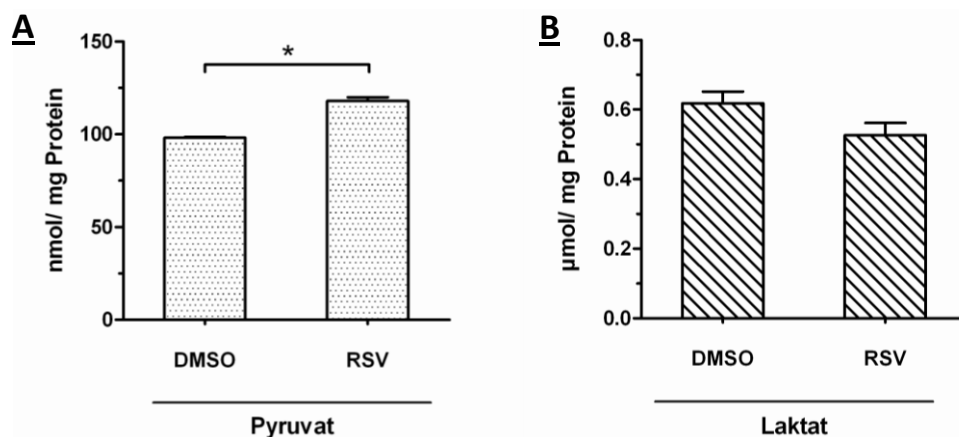


**Abbildung 23**, NAD<sup>+</sup>/ NADH Quantifizierung in dermalen Fibroblasten. NHDF wurden 16 h mit 100 µM Resveratrol behandelt und die Änderung der NAD<sup>+</sup>/NADH- Konzentration gegenüber DMSO 0,1 % ermittelt; A. Absolutwerte normalisiert auf Proteingehalt, B. Quotient aus NAD<sup>+</sup>/ NADH; ± SD biologischer und technischer Triplikate; \*\*: p-Wert < 0,01.

### 3.5 Pyruvat und Laktat- Bestimmung

Im Zuge der Energiegewinnung wird beispielsweise beim Abbau von Glucose das Zwischenprodukt Pyruvat gebildet. Pyruvat wird durch die Pyruvat Dehydrogenase (PDH) unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches in den Zitronensäurezyklus eingespeist wird. Pyruvat ist als zusätzliche Energiequelle auch in dem verwendeten Zellkulturmedium DMEM enthalten, so dass eine Bestimmung im Zellkulturüberstand stattfand und damit die Aufnahme des Pyruvats aus dem Medium ermittelt wurde. Dabei wurde die Menge Pyruvat bestimmt (normalisiert auf den Proteingehalt), die nach der Behandlung noch im Medium vorhanden war. Zu erkennen ist eine signifikante Zunahme ( $p < 0,05$ ) des Pyruvats von  $98 (\pm 0,5)$  nmol/ mg Protein auf  $118 (\pm 2)$  nmol/ mg Protein im Medium Resveratrol-behandelter Zellen (Abbildung 24.A). Dieses bedeutet, dass im Vergleich zur Kontrolle weniger Pyruvat aufgenommen wurde, da die intrazelluläre Pyruvat-Konzentration wahrscheinlich hoch genug war.

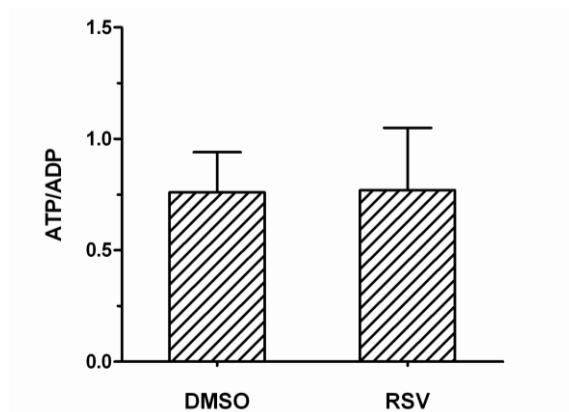
Durch die Laktatdehydrogenase wird die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat, unter Oxidation von  $\text{NADH}$  zu  $\text{NAD}^+$ , katalysiert. Diese Reaktion findet vor allem unter anaeroben Bedingungen zur schnellen Gewinnung von  $\text{NAD}^+$  statt. Laktat kann jedoch auch in einer Rückreaktion durch die Laktatdehydrogenase zu Pyruvat umgesetzt werden und durch die aerobe Verbrennung der Zelle mehr Energie liefern. Die Bestimmung der extrazellulären Laktat-Konzentration (normalisiert auf den Proteingehalt) zeigte eine leichte Abnahme von  $0,65 (\pm 0,05)$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Protein auf  $0,56 (\pm 0,04)$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Protein bei Resveratrol-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 24.B).



**Abbildung 24**, Laktat (A) und Pyruvat (B) Quantifizierung im Medium von dermalen Fibroblasten. NHDF wurden 16 h mit 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol behandelt und die Änderung des Laktat/Pyruvat Gehalts im Zellkulturüberstand, normalisiert auf die Zellproteine gegenüber DMSO 0,1 % ermittelt;  $\pm$  SD biologischer und technischer Triplikate; \*: p-Wert  $< 0,05$ .

### 3.6 ATP/ADP

ATP und ADP sind wichtige Metaboliten des Energiestoffwechsels. Ein verändertes Verhältnis der beiden Nukleotide kann Auskunft über den Gesundheitsstatus der Zelle liefern. So deutet ein vermindertes ATP/ADP Verhältnis, sprich eine Zunahme von ADP bei gleichzeitiger Abnahme von ATP, auf Apoptose oder auch Nekrose hin. Die Behandlung mit Resveratrol resultierte jedoch nicht in einem veränderten ATP/ADP Verhältnis gegenüber der Kontrolle (Abbildung 25).



**Abbildung 25**, ATP/ADP-Verhältnis, NHDF wurden 16 h mit 100  $\mu$ M Resveratrol (RSV) behandelt und die Änderung des Verhältnisses zu 0,1 % DMSO ermittelt;  $\pm$  SD biologischer und technischer Triplikate.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkmechanismen des Naturstoffs Resveratrol auf humane dermale Fibroblasten untersucht. Zwar wurden in vielen Studien die Mechanismen von Resveratrol in unterschiedlichsten Konzentrationen *in vitro* getestet (Hu et al., 2011; Ndiaye et al., 2011), doch es war bis dato nicht bekannt bei welcher Konzentration Resveratrol schädlich auf dermale Fibroblasten wirken könnte. Daher wurde dies zunächst ausgetestet. Die Behandlung mit Resveratrol in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erwies sich als optimal. Höhere Konzentrationen führten zu Veränderungen der Zellenmorphologie. Fibroblasten haben *in vitro* eine langgezogene Form und suchen über ihre Fortsätze den Kontakt zu benachbarten Zellen. Diese Form veränderte sich jedoch mit steigender Resveratrol-Konzentration, die Zellen wurden kugelig, verloren den Kontakt zueinander und wiesen zum Teil keine klaren Zellgrenzen auf (Abbildung 9). Mittels des CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Tests wurde die Viabilität der Fibroblasten nach Resveratrol-Behandlung quantitativ untersucht. Die beschriebene Inhibierung der Luciferase durch Resveratrol (Bakhtiarova et al., 2006) konnte hierbei bestätigt werden. Das Lumineszenzsignal nahm proportional zur Resveratrol-Konzentration ab (Abbildung 8). Somit wurde die Messung des ATP-Gehalts im Zelllysate behandelter Zellen verfälscht, wodurch eine Auswertung der Ergebnisse nur bedingt möglich war. Dementsprechend wurde bei der Wahl der Behandlungs-Konzentration in erster Linie der mikroskopische Phänotyp miteinbezogen.

Ein in der Zellkultur beobachteter Effekt, der zur Bildung von Artefakten führt, ist die allgemeine Instabilität von Polyphenolen. So findet eine Oxidation Resveratrols, in Abhängigkeit von Hydrogencarbonat, unter Bildung von Wasserstoffperoxid statt (Yang et al., 2010). Um zu prüfen, ob die durch Resveratrol vermittelten Effekte spezifischer Natur sind und nicht auf die Bildung von Wasserstoffperoxid zurückzuführen sind, wurde eine Kontrolle in der zu erwartenden Wasserstoffperoxid-Konzentration (rund 50 % der Resveratrol-Ausgangsmenge) mitgeführt. Diese entspricht bei 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Effekte des Wasserstoffperoxids wurden ebenfalls im CellTierGlo<sup>®</sup>-Test untersucht. Unter den gegebenen Bedingungen ergab sich für die Fibroblasten eine hohe Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid, so lag die Viabilität bei 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  noch bei 80 % (Abbildung 10). Wahrscheinlich ist das im Medium

enthaltende Pyruvat für diesen Effekt verantwortlich, da es als Radikalfänger fungiert (Long et al., 2010).

Nach Ausschluss zytotoxischer Effekte durch Resveratrol und Wasserstoffperoxid wurden ausgewählte Gene und Proteine nach 16 h-Behandlung untersucht. Die erste Gruppe umfasst Gene von Enzymen, die in der Regulation von oxidativem Stress und Beseitigung von ROS beteiligt sind. Entstehen in der Zelle Superoxid Radikale, so werden diese durch SODs zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt. Die Transkription der mitochondrialen Eisen/Mangan enthaltenden SOD2 wurde durch Resveratrol signifikant induziert, wohingegen die Kupfer/Zink enthaltende SOD1 signifikant vermindert wurde (Abbildung 11). Das weniger reaktive Wasserstoffperoxid kann durch Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgewandelt werden, wodurch es für die Zelle unschädlich wird (Mailloux und Harper, 2011). Die Genexpression der Katalase war signifikant erhöht. Ein weiteres Enzym in der Bewältigung von ROS ist Glutathionperoxidase, welche Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Glutathion reduziert, wobei Wasser und Glutathion-Disulfid entstehen. Die Wiederbereitstellung von Glutathion erfolgt durch die Reduktion der Disulfidbrücke durch Glutathionreduktase. Die Expression dieses Gens wurde ebenfalls signifikant hochreguliert (Abbildung 11). Demzufolge waren durch Resveratrol-Behandlung deutliche antioxidative Mechanismen aktiviert, die zum Schutz der Zelle beitragen.

Die Prostaglandin-Endoperoxidase-Synthasen PTGS1 und PTGS2 sind Inflammationsmarker, die an der Synthese von Prostaglandin beteiligt sind. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Immunantwort, Inflammation und Schmerzentwicklung. PTGS1 wird dabei konstitutiv exprimiert und PTGS2 durch pro-inflammatorische Faktoren oder Cytokine induziert. Resveratrol-behandelte Fibroblasten zeigten eine signifikant höhere Genexpression der PTGS1 und eine signifikante Abnahme an PTGS2 (Abbildung 11).

PTGS2 wird sowohl in gestressten, als auch in stressinduziert alternden, dermalen Fibroblasten verstärkt exprimiert. Dies führt zu einer Inflammation, bei der die Produktion von Prostaglandin-E2 stark ansteigt und zum Phänotypen alternder Zellen beiträgt (Zdanov et al., 2007). Zudem wird eine erhöhte PTGS2 Expression und daraus resultierende Prostaglandin-E2 Produktion mit einer Vielzahl von Tumoren, unter anderem auch Basalzellenkrebs, in Verbindung gebracht (Karahan et al., 2011; Wang et al., 2005). Folglich vermittelt die Inhibierung der PTGS2-Transkription durch Resveratrol einen antiinflammatorischen Effekt auf dermale Fibroblasten.

Resveratrol vermittelt positive metabolische Effekte bei Mäusen unter Hochfettdiät, indem es die metabolische Rate erhöht, Insulinsensitivität verbessert, mitochondriale Biogenese und physiologische Ausdauer erhöht. Ein wichtiger Mediator dieser Effekte ist der Coaktivator PGC1 $\alpha$  (Lagouge et al., 2006). PGC1 $\alpha$  kontrolliert die mitochondriale Biogenese und Atmung. Vor allem in metabolisch wichtigen Geweben, wie Leber, Fett und Muskeln wurden die Funktionen vom PGC1 umfassend untersucht und beschrieben, wohingegen sehr wenige Informationen zu Hautzellen vorhanden sind.

Im Fibroblasten-Modell konnte durch Resveratrol eine signifikante Hochregulation von PGC1 $\alpha$  auf transkriptioneller Ebene, jedoch nicht auf Proteinebene gezeigt werden (Abbildung 12 und Abbildung 16). Der Proteinnachweis zeigte zum Zeitpunkt der Untersuchung eine signifikante Abnahme. Jedoch wird die Aktivität von PGC1 $\alpha$  durch eine Vielzahl posttranslatonaler Modifikationen bestimmt. Zum Beispiel wird bei Deacetylierung durch Sirt1 und bei direkter Phosphorylierung durch AMPK, die Aktivität PGC1 $\alpha$ 's gesteigert (Jager et al., 2007; Rodgers et al., 2005). Die Regulation des Coaktivators ist sehr komplex und die Mechanismen bei weitem nicht vollständig aufgeklärt (Canto und Auwerx, 2009).

AMPK, ein metabolischer Sensor der Zelle, kann durch Resveratrol aktiviert werden (Um et al., 2010). AMPK reagiert auf zellulären Stress sowie auf den Gehalt an AMP, ADP und ATP und lenkt dadurch den Metabolismus (Xiao et al., 2011). AMPK wird durch CaMKK $\beta$  und LKB1 phosphoryliert und aktiviert. In Muskelzellen bewirkt dieses eine Erhöhung des NAD<sup>+</sup> Gehalts und die Aktivierung von Sirt1 und PGC1 $\alpha$  (Canto et al., 2009). In den Fibroblasten wurde zunächst der ATP/ADP Status der Zellen untersucht, jedoch war keine Veränderung auf metabolischer Ebene erkennbar (Abbildung 25). Anschließend wurde der Phosphorylierungsstatus der AMPK untersucht, wobei ein erhöhtes P-AMPK/AMPK-Verhältnis nach Resveratrol-Behandlung gezeigt werden konnte (Abbildung 15). Somit findet eine Aktivierung der Kinase statt wodurch sie wiederum weitere Zielproteine, wie die bereits genannten SIRT1 und PGC1 $\alpha$ , als auch Transkriptionsregulatoren wie CREB, PPARs und FOXOs aktivieren kann.

CREB ist als Transkriptionsfaktor an der Steuerung der Geneexpression vieler Proteine beteiligt. Die Zielproteine sind dabei an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt (Mayr und Montminy, 2001). CREB selbst kann durch zahlreiche Kinasen, wie PKA und AMPK aktiviert werden (Thomson et al., 2008).

Die Proteinexpression von CREB und auch die Phosphorylierung wurde durch Resveratrol erhöht (Abbildung 14), was auf eine gesteigerte Aktivität schließen lässt. Die Gene, die durch CREB reguliert werden und hier untersucht wurden, waren alle hochreguliert. Dazu zählen SOD2, PDK4, UCP2 und PGC1 $\alpha$  (Abbildung 11-13). Somit wurde die Aktivität von CREB eindeutig erhöht.

An der Anpassung des Metabolismus auf veränderte zelluläre Bedingungen sind unter anderem Transkriptionsfaktoren der PPAR Familie und der Leber-X-Rezeptor (LXR $\alpha$ ; NR1H3) beteiligt. Zusammen mit PGC1 $\alpha$  erhöhen sie die mitochondriale Biogenese und den Fettsäure Katabolismus (Lopez-Lluch et al., 2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch Resveratrol-Behandlung eine signifikante Aktivierung der Transkription von PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  und NR1H3 bewirkt wird (Abbildung 12). PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  sind bei der Bewältigung von oxidativem Stress und altersbedingter Inflammation dermalen Zellen von Bedeutung, da sie die Expression von Zytokinen und MMPs inhibieren und Katalase stimulieren können (Chung et al., 2008; Kim et al., 2012). Die Genexpression der MMP3 wurde hier übereinstimmend durch Resveratrol signifikant herunterreguliert (Abbildung 13) und Katalase wie bereits beschrieben hochreguliert. Der Nachweis der Proteinexpression von PPAR $\gamma$  zeigte allerdings eine Abnahme des Proteins (Abbildung 19). Der gewählte Zeitpunkt zur Analyse der zellulären Effekte (nach 16 h) könnte dabei ein entscheidender Faktor sein, da eine Hochregulation auf Proteinebene möglicherweise zeitverzögert stattfindet.

Eine weitere Familie von durch Resveratrol beeinflussbaren Transkriptionsfaktoren stellen die FOXOs dar. Sirt1 deacetyliert FOXO3a wodurch dessen Aktivität erhöht wird (Brunet et al., 2004). Die aktivierte FOXO3a induziert daraufhin die Expression von SOD2 in pulmonalen Fibroblasten. Sowohl die FOXO3, als auch SOD2 wurden durch die Resveratrol-Behandlung signifikant verstärkt exprimiert (Abbildung 12). In Muskelzellen sind FOXOs mit dem Schutz vor oxidativem Stress assoziiert (Gross et al., 2009), dieses entspricht ebenfalls dem durch Resveratrol beschriebenen Mechanismus.

Die Aktivierung der Deacetylase Sirtuin1 durch Resveratrol wurde bisher in vielen Zellkultur- und Tiermodellen beobachtet (Zhu et al., 2011). Durch seine Fähigkeit Histone zu Deacetylieren ist es an der Modulation des Chromatins beteiligt und führt dadurch zu einer Transkriptionsrepression (Zhang und Kraus, 2010). Dabei ist der genaue Mechanismus



über den Sirt1 durch Resveratrol aktiviert wird nicht eindeutig geklärt. Sirt1 wird, neben der Konzentration des Cofaktors  $\text{NAD}^+$ , auch durch Phosphorylierungen aktiviert. Die Deacetylierung von Zielproteinen erfolgt durch den Verbrauch von  $\text{NAD}^+$ , wobei das Produkt NAM entsteht. Durch die Enzyme NAMPT und NMNAT kann NAM zu  $\text{NAD}^+$  regeneriert werden. Aktive AMPK ist dabei von Bedeutung, da es NAMPT aktiviert und dadurch zu einem erhöhten  $\text{NAD}^+$  Level und indirekt zur Aktivierung Sirt1 in der Zelle beiträgt (Canto et al., 2009; Fulco et al., 2008). In Konkurrenz um  $\text{NAD}^+$  steht Sirt1 mit dem Enzym PARP. PARP wird bei Schädigung der DNA aktiviert und verbraucht  $\text{NAD}^+$  bei der Bildung von ADP-Ribose Polymeren (Bai et al., 2011b). Eine gesteigerte PARP Aktivität würde somit, durch einen verminderten  $\text{NAD}^+$  Spiegel, zur Inhibierung von Sirt1 beitragen (Canto und Auwerx, 2011). Einige Zielproteine von Sirt1, der Cofaktor  $\text{NAD}^+$ , als auch die Gen- und Proteinexpression von Sirt1 wurden in dieser Studie nach Resveratrol-Behandlung untersucht. Auf Genexpressionsebene konnte keine erhöhte Transkription Sirt1 ermittelt werden und auch die Genexpression von PARP war unverändert (Abbildung 13). Bei der Untersuchung auf Proteinebene wurden die Lokalisationen Sirt1 und dessen Phosphorylierung am Ser47 überprüft. Im Zellkern erkennt man die Zunahme des phosphorylierten Sirt1 nach Resveratrol-Behandlung, bei sonst gleichbleibenden Sirt1 Konzentrationen im Zytoplasma und Zellkern (Abbildung 17).

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Sirt1 bei oxidativem Stress durch c-Jun N-terminale Kinasen (JNK1) reguliert wird. Dies führt zur Translokation sowie Phosphorylierung von Sirt1, wodurch spezifisch die Deacetylierung des Histon3 bewirkt wird (Nasrin et al., 2009). Da eine stärkere Phosphorylierung im Zellkern auch in dieser Arbeit beobachtet wurde, ist es möglich, dass der Stressfaktor Resveratrol einen ähnlichen, wenn nicht den gleichen Mechanismus bewirkt. Somit könnte eine Modifikation des Chromatins zu engerer Packung der DNA und dadurch zum Schutz vor Schäden durch ROS führen.

Die Aktivierung von Sirt1 durch Resveratrol konnte durch weitere Beobachtungen bekräftigt werden. Dazu zählt unter anderem die signifikante Erhöhung des  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Verhältnisses, was für die Coaktivierung von Sirt1 von Bedeutung ist (Abbildung 23). Die Zielproteine FOXO3 und PGC1 $\alpha$  zeigten durch die Behandlung eine höhere Aktivität (siehe oben), was ebenfalls für die Aktivierung Sirt1 durch Resveratrol spricht.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der eine bedeutende Rolle in der Bekämpfung von ROS spielt, ist der NF-E<sub>2</sub>-verwandte Faktor 2 (Nrf2; NFE2L2). Dieser bindet spezifisch an antioxidativ-responsive-Elemente (ARE) und reguliert dadurch die Transkription antioxidativer Enzyme (Kang et al., 2005; Zhu et al., 2008). Resveratrol kann Nrf2 in Endothelzellen aktivieren und somit zum zellulären Schutz vor ROS beitragen (Ungvari et al., 2010). Die untersuchten Fibroblasten zeigten jedoch eine signifikante Herunterregulation der NFE2L2 auf mRNA Ebene (Abbildung 12). Allerdings wurden Gene, wie CAT und GSR, die mitunter von Nrf2 reguliert werden, signifikant stärker exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor aktiviert wurde, ohne dass eine verstärkte Genexpression des NFE2L2 hervorgerufen wurde. Ähnliches wurde auch bei dem Transkriptions-Coaktivator EP300 beobachtet. Dieser wurde durch die Resveratrol-Behandlung signifikant herunterreguliert (Abbildung 12). Da Ep300 eine Histonacetylierung bewirkt und somit das Chromatin öffnet, ist er ein Gegenspieler der Histondeacetylase Sirt1. Die Inhibierung von Ep300 ist zum Schutz der DNA vor ROS von Interesse (Sadoul et al., 2008).

Die ATP-Citrat-Lyase (ACLY) spielt in der *de novo* Synthese von Fettsäuren eine wichtige Rolle, in dem sie die Synthese von Acetyl-CoA aus Citrat, unter Hydrolyse von ATP zu ADP katalysiert. Resveratrol bewirkt eine signifikante Herunterregulation der Transkription (Abbildung 13). Ein weiteres Schlüsselenzym, das an der Fettsäuresynthese beteiligt ist, ist Acetyl-CoA Carboxylase (ACC). Wird ACC durch AMPK phosphoryliert, wird es in seiner Aktivität inhibiert (Hardie und Pan, 2002). Die Behandlung dermalen Fibroblasten zeigte diesen Effekt nicht. Es konnte keine veränderte Genregulation festgestellt werden (Abbildung 13), jedoch nahm die gesamte Enzymmenge durch die Behandlung ab. Dabei blieb das Verhältnis von aktivem und inaktivem Enzym unverändert (Abbildung 18). Folglich deuten die Ergebnisse auf eine Inhibierung der Fettsäure-Synthese hin.

Die durch CREB aktivierten Gene PDK4 und UCP2 wurden näher untersucht. Beide Proteine spielen im Energiemetabolismus der Zelle eine Rolle. PDK4 phosphoryliert den Pyruvat Dehydrogenase (PD) Komplex, welches die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert. Auf RNA-Ebene wurde PDK4 durch Resveratrol-Behandlung signifikant stärker exprimiert, dieser Effekt spiegelte sich jedoch nicht auf Proteinebene wider (Abbildung 20). Eine weitere Isoform, PDK1, wurde hingegen signifikant herunterreguliert (Abbildung 13).

PDK1 wird im Gegensatz zur ubiquitär exprimierten PDK4, überwiegend im Herzen gebildet und ist wahrscheinlich irrelevant in Fibroblasten. Die Untereinheit E1 $\alpha$  des PDK wies allerdings eine erhöhte Phosphorylierung auf (Abbildung 21). Dies bewirkt eine verminderte Enzymaktivität der PD und lässt auf eine erhöhte PDK-Aktivität schließen. Pyruvat, das Substrat der PD wurde im Zellkulturüberstand vermessen und zeigte eine signifikant höhere Konzentration nach Resveratrol-Behandlung (Abbildung 24). Dies bestätigt die Annahme, dass die Zellen weniger Pyruvat umsetzen können und folglich weniger Pyruvat aus der Umgebung aufnehmen.

Pyruvat kann zudem über die anaerobe Atmung zu Laktat umgesetzt werden, da aber die Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand abnahm, ist es unwahrscheinlich, dass diese Reaktion verstärkt stattfand (Abbildung 24).

Ebenfalls signifikant hochreguliert war das Entkopplungsprotein UCP2. In vielen Geweben übernimmt UCP2 die Kontrolle der mitochondrialen ROS Produktion (Mailloux und Harper, 2011). In den Fibroblastenzellen war die Genexpression signifikant erhöht. Dies weist ebenfalls auf die transkriptionelle Aktivierung, unter anderem, durch CREB hin. Da die Haut durch äußere Einflüsse verstärkt mit ROS konfrontiert wird, kann eine erhöhte Expression von UCP2 zum Schutz der Zelle beitragen.

Der Tumorsuppressor p53 wird häufig als Wächter über das Genom bezeichnet, da er wichtige Funktionen bei DNA-Schädigung, Zellzyklusarrest, Zellalterung und der Apoptose übernimmt (Kruse und Gu, 2009). Kommt es zur Schädigung der DNA, so wird p53 in der Zelle akkumuliert, wodurch DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden und der Zellzyklus gestoppt wird. Als Antwort auf geringen oxidativen Stress werden durch p53 antioxidative Mechanismen aktiviert (Liu und Xu, 2011). Der durch die Resveratrol-Behandlung induzierte Anstieg von p53 auf Proteinebene (Abbildung 22), weist auf eine zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress hin. Als Antwort auf starken oxidativen Stress übt p53 jedoch prooxidative Aktivitäten aus, wie zum Beispiel eine Inhibierung antioxidativer Enzyme, und führt zur Induktion der Apoptose (Polyak et al., 1997). Die in der Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigten einen durch Resveratrol-Behandlung induzierten oxidativen Stress, der die Hochregulation von p53 und antioxidativen Reaktionen hervorrief. Somit ist der Resveratrol-vermittelte oxidative Stress in einem Bereich, in dem die Zelle sich schützen kann, ohne dass eine Apoptose hervorgerufen wird.

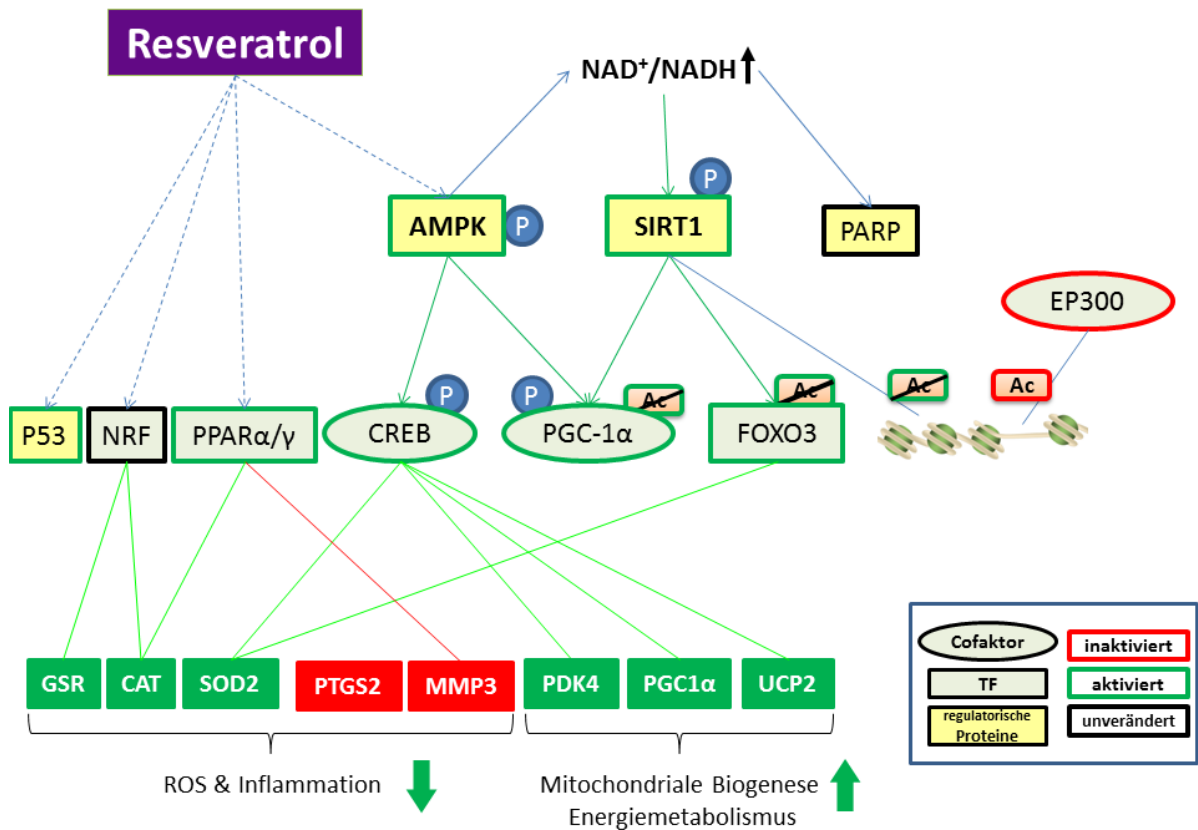
Zusätzlich wurde eine Protease, die an der Degradation der extrazellulären Matrix der Haut beteiligt ist, untersucht. Auf Genexpressionsebene konnte eine signifikante Herunterregulation durch Resveratrol-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 13). Die Funktion der MMP3 liegt im Abbau von Kollagen Typ IV. In der ROS induzierten Inflammation, die unter anderem durch UV-Strahlung hervorgerufen wird, kommt es in der Haut zu einem Anstieg der proteolytischen Aktivität und in Folge dessen zum erhöhten Abbau extrazellulärer Matrix. Die Haut verliert an Spannung und weist verstärkt Zeichen der Hautalterung auf. Durch Herunterregulation der MMP3, einem proteolytischen Enzym, kann Resveratrol einen protektiven Einfluss auf die extrazelluläre Matrix der Haut ausüben. Schutz vor Degradation kann die Hautalterung verzögern, wodurch die Applikation von Resveratrol auch für kosmetische Behandlungen interessant sein könnte.

Mittels der Wasserstoffperoxid-Kontrolle sollte überprüft werden, ob die beobachteten Effekte auf die Oxidation Resveratrols und der damit einhergehenden Wasserstoffperoxid-Generation zurückzuführen sind. Die Untersuchung des Genexpressionsprofils nach 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte allerdings keine Veränderung zur Kontrolle. Dies spricht dafür, dass sich die Wirkung von Resveratrol aus einem anderen Mechanismus, als der Wasserstoffperoxid-Generation ergibt. Möglich ist allerdings auch, dass eine zu geringe Wasserstoffperoxid-Konzentration gewählt wurde und diese durch die Medienwahl (Pyruvat und sonstige Proteine) sofort gequenchet wurde. Resveratrol wird in komplexen Medien oxidiert, wobei neben dem Wasserstoffperoxid weitere ROS entstehen. Superoxide, Quinone, Semiquinone und radikale Zwischenprodukte könnten daher auch die Resveratrol-vermittelten Effekte hervorrufen. Eine Substanz, die freie Radikale generiert, wie Paraquat oder 4-Hydroxynonenal, könnte daher als Kontrolle besser geeignet sein (Gruber et al., 2007; Siddiqui et al., 2010).

Da viele Radikale ab einer bestimmten Konzentration zytotoxisch auf die Zellen wirken, ist ein Hormesis-Effekt wahrscheinlich. Hormesis beschreibt die positive Wirkung von sonst schädlichen oder toxischen Substanzen, wenn diese in einer geringen Dosis verabreicht werden (Calabrese et al., 2010). Ein durch Resveratrol vermittelter hormetischer Effekt, der bewirkt, dass die Zellen gestresst werden ohne sie zu schädigen, kann zum Schutz der Zelle beitragen.

Ein kürzlich durch Park et al (2012) aufgedeckter Wirkmechanismus von Resveratrol beruht auf der Inhibition der cAMP Phosphodiesterase (PDE4), wodurch es zum Anstieg des zellulären cAMP-Gehalts kommt. Cyclisches-AMP bewirkt die Aktivierung des Effektorproteins Epac1, wodurch der  $Ca^{2+}$ -Gehalt in der Zelle ansteigt. In Folge dessen wird über mehrere Schritte der CamKK $\beta$ -AMPK-Signalweg aktiviert und dadurch die positiven Effekte auf den Organismus vermittelt (Park et al., 2012). Die Inhibition der PDE4 durch Resveratrol ist jedoch nicht effektiver, als durch bereits bekannte PDE4 Inhibitoren, wie Rolipram. Zudem konnte gezeigt werden, dass Resveratrol auf viele Enzyme inhibierend wirkt (Bakhtiarova et al., 2006; Slater et al., 2003). Park et al haben somit einen weiteren Wirkmechanismus Resveratrols dargestellt, aber auch dieser kann nicht alleinig für die gesamte Auswirkung verantwortlich sein.

In Abbildung 26 sind die untersuchten Proteine und deren Interaktionen zusammenfassend dargestellt. Aus den beobachteten Effekten geht hervor, dass Resveratrol die Fähigkeit hat oxidativen Stress auszulösen, auf den die Fibroblasten durch Aktivierung mehrerer Signalwechselwege entgegenwirken.



**Abbildung 26**, Darstellung aktivierter (grün) und inaktivierter (rot) Regulatoren in humanen dermalen Fibroblasten, nach 16-stündiger Behandlung mit 100  $\mu$ M Resveratrol.

#### **4.1 Ausblick**

Die Untersuchung der Effekte von Resveratrol in der vorliegenden Arbeit beruhte auf ausgewählten Genen und Proteinen. Um den globalen Effekt von Resveratrol zu validieren und die beobachteten Effekte zu bestätigen, ist eine Untersuchung des Transkriptomts mittels Mikroarray notwendig. Des Weiteren wurde in der Muskelzelllinie C2C12 beobachtet, dass Resveratrol eine starke Translokation von Sirt1 über das gesamte Chromatin bewirkt und dadurch die Transkription beeinflusst. Die Untersuchung dieser Relokation Sirt1s nach Resveratrol-Behandlung soll auch in Fibroblasten erfolgen und die wichtige Rolle von Sirt1 in der Resveratrol-Behandlung bestätigen.

In der Haut sind, neben den Fibroblasten, Keratinozyten von entscheidender Bedeutung. Sie machen den Hauptzellanteil der Haut aus und bilden die Epidermis, die den äußeren Einflüssen direkt ausgesetzt ist. Die Wirkung von Resveratrol soll auch in diesem Zelltypen untersucht werden und mit den Effekten in Fibroblasten verglichen werden und diese bestenfalls bekräftigen.

## 5 Zusammenfassung

Resveratrol ist ein Phytoalexin, das von einigen Pflanzen als Antwort auf schädigende Einflüsse zum Schutz der Pflanze gebildet wird. Das Interesse an Resveratrol als Wirkstoff entstand durch den Nachweis seiner antiinflammatorischen und antioxidativen Wirkung sowie dem Potential die mitochondriale Biogenese zu aktivieren. Dabei wurde fokussiert die Wirkung bei Tumor- und Kardioerkrankungen sowie metabolischen Krankheiten untersucht. Oxidativer Stress und Inflammation spielen aber auch in der Entstehung vieler dermatologischer Erkrankungen eine wichtige Rolle. So ist die Haut vielen äußeren Einflüssen, wie UV-Strahlung ausgesetzt, die in den Zellen zur ROS Formation und folglich zu Entzündungen führen. Ebenso ist die Akkumulation von oxidativen Schäden, neben einer mitochondrialen Dysfunktion, im Hautalterungsprozess von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine 16-stündige Behandlung von humanen dermalen Fibroblasten mit 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol sowohl antiinflammatorische und antioxidative Mechanismen als auch die mitochondriale Biogenese in die Wege leitet. So bewirkt Resveratrol die Aktivierung der metabolischen Sensoren AMPK und Sirt1 unter Erhöhung des  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Verhältnisses bei unverändertem ATP/ADP Gehalt. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung des mitochondrialen Regulators PGC1 $\alpha$  und CREB sowie der Transkriptionsfaktoren FOXO3, PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$ , was unter anderem die Genexpression von SOD2, CAT, GSR, PTGS2, UCP und PDK4 signifikant erhöht und die Expression von MMP3 signifikant herunterreguliert. Diese Ergebnisse bestätigen die in anderen Zellmodellen beobachteten Mechanismen auch für dermalen Fibroblasten. Der Verdacht, dass die Wirkung Resveratrols einzig durch entstehendes Wasserstoffperoxid hervorgerufen wird, konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr beruht die Wirkung auf die Bildung unterschiedlicher ROS, die in den Zellen einen oxidativen Stress hervorrufen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen: Resveratrol bewirkt einen zellulären Stress, auf den die dermalen Fibroblasten mit antioxidativen und antiinflammatorischen Mechanismen reagieren. Die hormetische Wirkung Resveratrols kann der Akkumulation von oxidativen Schäden entgegenwirken und somit zum Zellüberleben beitragen. Zudem kann dem Alterungsprozess der Haut durch Reduktion von oxidativem Stress und Reduktion von extrazelluläre-Matrix-verdauenden Proteasen entgegengewirkt werden.

## 6 Abstract

Resveratrol, a well-known phytoalexin, is present in numerous plants, and produced as protection against environmental risks. In mammals Resveratrol exhibits diverse effects, including anti-inflammatory and anti-oxidative properties as well as a broad range of health benefits by activating mitochondrial biogenesis. Most studies have shown the impact in cardiovascular diseases, cancer and metabolic dysfunctions, but little is known about the influence on the skin. Many skin diseases are associated with oxidative stress and inflammation.

Daily, human skin is exposed to environmental oxidants including UV radiation, which leads to formation of reactive oxygen species (ROS) and thereby causing inflammation. An accumulation of oxidative damage and decrease of mitochondrial function are resulting in enhanced skin aging processes.

This study shows the anti-inflammatory and anti-oxidative effects of resveratrol in human dermal fibroblasts, accompanied by the induction of mitochondrial biogenesis. Cells were treated for 16 hours with 100  $\mu$ M resveratrol. This results in activation of metabolic sensors such as AMPK and Sirt1, while  $\text{NAD}^+/\text{NAD}$  ratio is increased and  $\text{ATP}/\text{ATP}$  remained unchanged. Moreover, activity of PGC1 $\alpha$ , CREB and transcription factor FOXO3, PPAR $\alpha$ , and PPAR $\gamma$  was increased. As a result, significant increase in SOD2, CAT, GSR, PTGS2, UCP and PDK4 gene expression was detected, whereas MMP3 was significantly down regulated. Taken together, these results confirm known mechanisms observed in several cell models. Additionally, there was no evidence of resveratrol causing generation of hydrogen peroxide only. Formation of several ROS and thereby inducing oxidative stress seems more likely.

In summary: resveratrol was shown to exhibit cellular stress and thereby activating anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in human dermal fibroblast. This hormesis effect of resveratrol might protect cells against accumulation of oxidative damage and support cell survival. Furthermore, skin aging might be postponed by reduction of oxidative stress and thus reduced ROS formation. In addition reduction of proteases helps to maintain skin's connective tissue and might delay skin photoaging.



## 7 Quellen

- Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seeram, N.P., Shishodia, S. und Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research* 24, 2783-2840.
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P. und Pain, D. (2011). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*.
- Bai, P., Canto, C., Brunyanszki, A., Huber, A., Szanto, M., Cen, Y., Yamamoto, H., Houten, S.M., Kiss, B., Oudart, H., *et al.* (2011a). PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell metabolism* 13, 450-460.
- Bai, P., Canto, C., Oudart, H., Brunyanszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H., *et al.* (2011b). PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell metabolism* 13, 461-468.
- Bakhtiarova, A., Taslimi, P., Elliman, S.J., Kosinski, P.A., Hubbard, B., Kavana, M. und Kemp, D.M. (2006). Resveratrol inhibits firefly luciferase. *Biochemical and biophysical research communications* 351, 481-484.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., *et al.* (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337-342.
- Baur, J.A. und Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery* 5, 493-506.
- Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K.W., Lu, S.C., Atangan, L. und Wang, M. (2009). Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chemical biology & drug design* 74, 619-624.
- Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 409-418.
- Bordone, L. und Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature reviews Molecular cell biology* 6, 298-305.
- Brohem, C.A., Cardeal, L.B., Tiago, M., Soengas, M.S., Barros, S.B. und Maria-Engler, S.S. (2011). Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment cell & melanoma research* 24, 35-50.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., *et al.* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E. und Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 3337-3340.

- Calabrese, E.J., Mattson, M.P. und Calabrese, V. (2010). Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Human & experimental toxicology* 29, 980-1015.
- Canto, C. und Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current opinion in lipidology* 20, 98-105.
- Canto, C. und Auwerx, J. (2011). Interference between PARPs and SIRT1: a novel approach to healthy ageing? *Aging* 3, 543-547.
- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P. und Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-1060.
- Chalkiadaki, A. und Guarente, L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nature reviews Endocrinology*.
- Cherniack, E.P. (2011). Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition* 27, 617-623.
- Chung, J.H., Seo, A.Y., Chung, S.W., Kim, M.K., Leeuwenburgh, C., Yu, B.P. und Chung, H.Y. (2008). Molecular mechanism of PPAR in the regulation of age-related inflammation. *Ageing research reviews* 7, 126-136.
- Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R. und Sinclair, D.A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305, 390-392.
- Dali-Youcef, N., Lagouge, M., Froelich, S., Koehl, C., Schoonjans, K. und Auwerx, J. (2007). Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Annals of medicine* 39, 335-345.
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E.P., McBurney, M.W., Sauve, A.A. und Sartorelli, V. (2008). Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Developmental cell* 14, 661-673.
- Fung, A., Vizcaychipi, M., Lloyd, D., Wan, Y. und Ma, D. (2012). Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. *Brain research*.
- Gross, D.N., Wan, M. und Birnbaum, M.J. (2009). The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Current diabetes reports* 9, 208-214.
- Gruber, J., Tang, S.Y. und Halliwell, B. (2007). Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 530-542.
- Guarente, L. (2011). Franklin H. Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. *The New England journal of medicine* 364, 2235-2244.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of biochemistry and biophysics* 476, 107-112.

- Handy, D.E. und Loscalzo, J. (2012). Redox Regulation of Mitochondrial Function. Antioxidants & redox signaling.
- Hardie, D.G. und Pan, D.A. (2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochemical Society transactions* 30, 1064-1070.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11, 298-300.
- Hook, B.a.S., T. (2011). Comparison of luciferases as ATP sensors in the presence of inhibitors: CellTiter-Glo® Assay shows less compound interference than the Perkin Elmer ATPlite™ 1step assay (<http://www.promega.com/resources/articles/pubhub/celltiter-glo-assay-shows-less-compound-interference-than-other-luminescent-assays/>).
- Houtkooper, R.H., Canto, C., Wanders, R.J. und Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD<sup>+</sup>: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine reviews* 31, 194-223.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., *et al.* (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- Hu, Y., Liu, J., Wang, J. und Liu, Q. (2011). The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol. *Free radical biology & medicine* 51, 250-256.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. und Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.
- Iwabu, M., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Sato, K., Nakagawa, T., Funata, M., Yamaguchi, M., Namiki, S., Nakayama, R., Tabata, M., *et al.* (2010). Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. *Nature* 464, 1313-1319.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J. und Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12017-12022.
- Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E.A., Caldwell, S.D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P.S., Fields, S., *et al.* (2005). Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *The Journal of biological chemistry* 280, 17038-17045.
- Kang, K.W., Lee, S.J. und Kim, S.G. (2005). Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1664-1673.
- Karahan, N., Baspinar, S., Bozkurt, K.K., Caloglu, E., Ciris, I.M. und Kapucuoglu, N. (2011). Increased expression of COX-2 in recurrent basal cell carcinoma of the skin: a pilot study. *Indian journal of pathology & microbiology* 54, 526-531.

- Kim, J.K., Mun, S., Kim, M.S., Kim, M.B., Sa, B.K. und Hwang, J.K. (2012). 5,7-Dimethoxyflavone, an activator of PPARalpha/gamma, inhibits UVB-induced MMP expression in human skin fibroblast cells. *Experimental dermatology* 21, 211-216.
- Kruse, J.P. und Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.
- Kundu, J.K. und Surh, Y.J. (2004). Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF-kappaB and AP-1 as potential targets. *Mutation research* 555, 65-80.
- Lagouge, M., Armann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., *et al.* (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127, 1109-1122.
- Langcake, P.a.P., R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* 9, 77-86.
- Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R. und Prolla, T.A. (1999). Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285, 1390-1393.
- Lee, J.S., Park, K.Y., Min, H.G., Lee, S.J., Kim, J.J., Choi, J.S., Kim, W.S. und Cha, H.J. (2010). Negative regulation of stress-induced matrix metalloproteinase-9 by Sirt1 in skin tissue. *Experimental dermatology* 19, 1060-1066.
- Lin, S.J., Defossez, P.A. und Guarente, L. (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.
- Liu, D. und Xu, Y. (2011). p53, oxidative stress, and aging. *Antioxidants & redox signaling* 15, 1669-1678.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Long, L.H., Hoi, A. und Halliwell, B. (2010). Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Archives of biochemistry and biophysics* 501, 162-169.
- Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P., *et al.* (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1768-1773.
- Lopez-Lluch, G., Irusta, P.M., Navas, P. und de Cabo, R. (2008). Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Experimental gerontology* 43, 813-819.
- Mailloux, R.J. und Harper, M.E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free radical biology & medicine* 51, 1106-1115.
- Mayr, B. und Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 599-609.

- Nasrin, N., Kaushik, V.K., Fortier, E., Wall, D., Pearson, K.J., de Cabo, R. und Bordone, L. (2009). JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PloS one* 4, e8414.
- Ndiaye, M., Philippe, C., Mukhtar, H. und Ahmad, N. (2011). The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. *Archives of biochemistry and biophysics* 508, 164-170.
- Nichols, J.A. und Katiyar, S.K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research* 302, 71-83.
- Park, S.J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, H., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A.L., *et al.* (2012). Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell* 148, 421-433.
- Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinsky, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., *et al.* (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism* 8, 157-168.
- Petersen, K.F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D.L., DiPietro, L., Cline, G.W. und Shulman, G.I. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300, 1140-1142.
- Philip, M., Rowley, D.A. und Schreiber, H. (2004). Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in cancer biology* 14, 433-439.
- Pillai, S., Oresajo, C. und Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *International journal of cosmetic science* 27, 17-34.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- Renaud, S. und Gueguen, R. (1998). The French paradox and wine drinking. *Novartis Foundation symposium* 216, 208-217; discussion 217-222, 152-208.
- Robb, E.L., Page, M.M., Wiens, B.E. und Stuart, J.A. (2008). Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochemical and biophysical research communications* 367, 406-412.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. und Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113-118.
- Rogina, B. und Helfand, S.L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15998-16003.

- Ruderman, N.B., Xu, X.J., Nelson, L., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Lan, F. und Ido, Y. (2010). AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298, E751-760.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M. und Khochbin, S. (2008). Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* 90, 306-312.
- Shaw, D.I., Hall, W.L. und Williams, C.M. (2005). Metabolic syndrome: what is it and what are the implications? *The Proceedings of the Nutrition Society* 64, 349-357.
- Siddiqui, M.A., Kashyap, M.P., Kumar, V., Al-Khedhairi, A.A., Musarrat, J. und Pant, A.B. (2010). Protective potential of trans-resveratrol against 4-hydroxynonenal induced damage in PC12 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24, 1592-1598.
- Slater, S.J., Seiz, J.L., Cook, A.C., Stagliano, B.A. und Buzas, C.J. (2003). Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochimica et biophysica acta* 1637, 59-69.
- Tang, S.Y. und Halliwell, B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and biophysical research communications* 394, 1-5.
- Thomson, D.M., Herway, S.T., Fillmore, N., Kim, H., Brown, J.D., Barrow, J.R. und Winder, W.W. (2008). AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol* 104, 429-438.
- Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R.H., van de Weijer, T., Goossens, G.H., Hoeks, J., van der Krieken, S., Ryu, D., Kersten, S., *et al.* (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell metabolism* 14, 612-622.
- Tissenbaum, H.A. und Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230.
- Um, J.H., Park, S.J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M.W., Kim, M.K., Viollet, B. und Chung, J.H. (2010). AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59, 554-563.
- Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F.A., Sonntag, W.E., Pearson, K., de Cabo, R. und Csiszar, A. (2010). Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 299, H18-24.
- Ungvari, Z., Sonntag, W.E., de Cabo, R., Baur, J.A. und Csiszar, A. (2011). Mitochondrial protection by resveratrol. *Exercise and sport sciences reviews* 39, 128-132.
- Van Remmen, H. und Jones, D.P. (2009). Current thoughts on the role of mitochondria and free radicals in the biology of aging. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 64, 171-174.

- Wang, D., Buchanan, F.G., Wang, H., Dey, S.K. und DuBois, R.N. (2005). Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer research* 65, 1822-1829.
- Wu, J.M., Hsieh, T.C. und Wang, Z. (2011). Cardioprotection by resveratrol: a review of effects/targets in cultured cells and animal tissues. *American journal of cardiovascular disease* 1, 38-47.
- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., *et al.* (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472, 230-233.
- Yang, N.C., Lee, C.H. und Song, T.Y. (2010). Evaluation of resveratrol oxidation in vitro and the crucial role of bicarbonate ions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74, 63-68.
- Zdanov, S., Bernard, D., Debacq-Chainiaux, F., Martien, S., Gosselin, K., Vercamer, C., Chelli, F., Toussaint, O. und Abbadie, C. (2007). Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Experimental cell research* 313, 3046-3056.
- Zhang, T. und Kraus, W.L. (2010). SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochimica et biophysica acta* 1804, 1666-1675.
- Zhu, H., Jia, Z., Zhang, L., Yamamoto, M., Misra, H.P., Trush, M.A. und Li, Y. (2008). Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 463-474.
- Zhu, X., Liu, Q., Wang, M., Liang, M., Yang, X., Xu, X., Zou, H. und Qiu, J. (2011). Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF-alpha induced inflammation in fibroblasts. *PLoS one* 6, e27081.