



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der Resveratrol-vermittelten Hemmung von  
Angiotensin II- und EGF-induzierten Signalwegen in glatten  
Gefäßmuskelzellen mittels Resveratrol-Derivaten

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Julia Geßlbauer  
Matrikel-Nummer: 0402759  
Studienrichtung /Studienzweig Pharmazie  
(lt. Studienblatt):  
Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch

Wien, im Mai 2010







## Zusammenfassung

Resveratrol (RV) ist, wie andere pflanzliche Polyphenole, für seine antioxidative Aktivität bekannt. Neben vielen anderen pharmakologischen Eigenschaften konnte gezeigt werden, dass RV die Ang II- und EGF-induzierte Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase Akt in glatten Muskelzellen (VSMC) hemmt, deren Aktivierung mit der Weiterleitung wachstumsfördernder Signale gleichgesetzt wird.

Nachdem es viele Hinweise gibt, dass vor allem im Rahmen des Ang II-*Signaling* die Signaltransduktion auf den *Second Messenger* ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) angewiesen ist, wollten wir untersuchen, ob und inwieweit die antioxidativen Eigenschaften von RV für die Hemmung der Akt-Phosphorylierung in VSMC notwendig sind. Dies geschah unter Zuhilfenahme von drei methylierten RV-Derivaten. Mit der Methylierung aller drei Hydroxylgruppen (3,4',5-Trimethoxystilben-TMRV) ging neben der antioxidativen Eigenschaft auch die Fähigkeit zur Hemmung der Akt-Phosphorylierung verloren. Das nur noch gering antioxidativ wirkende 3-Hydroxy-4',5-dimethoxystilben (R2) hatte ebenso keinen Einfluss auf die gesteigerte Phosphorylierung von Akt nach Ang II- oder EGF-Behandlung. Die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen zeigen, dass die 4'-Hydroxylgruppe mehr Anteil an der antioxidativen Aktivität hat, als die anderen beiden Hydroxylgruppen. Dementsprechend wurde mit 3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilben (R1) ein Derivat untersucht, dessen 4'-Position durch eine redox-inaktive Methoxygruppe substituiert ist. R1 zeigte kaum antioxidative Eigenschaften, dennoch konnte es die Ang II- und EGF-vermittelte Phosphorylierung von Akt genauso wie RV hemmen.

Aus diesen Resultaten geht hervor, dass die RV-vermittelte Inhibierung der Akt-Phosphorylierung nicht in der antioxidativen Aktivität begründet liegt, sondern eher auf spezifischere Interaktionen mit Biomolekülen zurückzuführen ist.



## Abstract

Resveratrol (RV) is, like other polyphenols, a well-known antioxidant. Beside many other pharmacological properties, in vascular smooth muscle cells (VSMC) RV was shown to inhibit the Ang II- and EGF-induced phosphorylation of the serine/threonine kinase Akt, whose activation is related to the transduction of growth-promoting signals.

As it was shown that there are several signaling events especially in the Ang II signaling that require certain ROS (Reactive oxygen species) and that are influenced by antioxidants, we wanted to examine whether and to which extent the RV-induced inhibition of the Akt phosphorylation in VSMC is due to its antioxidant properties. For this purpose, we tested three methylated derivatives of the stilbene RV. The methylation of all three hydroxyl groups (3,4',5'-Trimethoxystilbene-TMRV) leads to a loss of both antioxidant capacities and the inhibitory effect on the Akt phosphorylation. 3-Hydroxy-4',5'-dimethoxystilbene (R2), that hardly acts as an antioxidant, also does not influence the enhanced phosphorylation of Akt. It is known that the 4'-hydroxyl group is more important than the two other hydroxyl groups for the antioxidant activity of RV. Therefore we tested 3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilbene (R1) a derivative whose 4'-position is substituted with a redox-inactive methoxy group. We could confirm that the antioxidative effects of R1 are minimal compared to RV. Nevertheless this derivative was able to inhibit the Ang II- and EGF-induced phosphorylation of Akt in VSMC to a similar extent than RV.

These results lead to the conclusion that the RV-mediated inhibition of the Akt phosphorylation is not based on its antioxidant activity, but probably on more specific interactions with cellular targets different than ROS.



# I Inhaltsverzeichnis



# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>Blutgefäße .....</b>	<b>7</b>
1.1	Blutkreislauf .....	7
1.2	Atherosklerotische Veränderungen .....	8
1.3	VSMC .....	8
1.4	Wachstum von VSMC .....	9
1.4.1	Hyperplasie/Proliferation .....	9
1.4.2	Hypertrophie .....	9
<b>2</b>	<b>Stimulatoren .....</b>	<b>10</b>
2.1	Angiotensin II .....	10
2.1.1	Physiologische Effekte .....	10
2.1.2	Rezeptoren .....	11
2.1.3	Signaltransduktionswege .....	12
2.1.3.1	G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionswege .....	12
2.1.3.2	Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen .....	13
2.1.3.3	Tyrosinkinasen .....	14
2.1.3.4	NAD(P)H-Oxidasen und ROS-Signaling .....	16
2.2	EGF .....	16
2.2.1	Physiologische Effekte .....	16
2.2.2	Rezeptoren .....	16
2.2.3	Signaltransduktionswege .....	17
<b>3</b>	<b>Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....</b>	<b>18</b>
3.1	Definition .....	18
3.2	Effekte von ROS .....	19
3.3	Oxidativer Stress .....	19
3.4	Redox-Regulation von Ang II- und EGF-induzierten Signalwegen in VSMC .....	20
3.4.1	Einfluss von ROS auf Signaltransduktionskaskaden .....	20
3.4.2	Einfluss von ROS auf Transkriptionsfaktoren .....	21
3.4.3	Einfluss von ROS auf die Translation .....	21
3.5	Wasserstoffperoxid .....	22

<b>4</b>	<b>Antioxidantien</b> .....	<b>22</b>
4.1	Definition .....	22
4.1.1	„Chemische“ Antioxidantien .....	23
4.1.2	„Biologische“ Antioxidantien .....	23
4.2	Antioxidantien in lebenden Organismen .....	24
4.2.1	Zelluläre antioxidative Abwehrmechanismen .....	24
4.2.1.1	Antioxidative Enzyme .....	24
4.2.1.2	Sequestration von Metallionen .....	25
4.2.2	Exogene Antioxidantien .....	25
4.2.2.1	Glutathion .....	25
4.2.2.2	Vitamine .....	25
4.2.2.3	Metallchelatoren .....	26
4.2.2.4	Antioxidantien pflanzlicher Herkunft .....	26
<b>5</b>	<b>Resveratrol</b> .....	<b>278</b>
5.1	Allgemeines .....	28
5.2	Vielseitige pharmakologische Eigenschaften .....	28
5.2.1	Antioxidative Eigenschaften .....	28
5.2.2	Pro-apoptotische und zellzyklushemmende Eigenschaften .....	29
5.2.3	Antiinflammatorische Effekte und Hemmung der Plättchenaggregation .....	31
5.2.4	RV als Anti-Aging Agens .....	31
5.2.5	RV als Phytoestrogen .....	32
<b>6</b>	<b>Resveratrol-Derivate</b> .....	<b>32</b>
6.1	Chemische Struktur des Resveratrols .....	32
6.2	TMRV .....	33
6.3	R1 .....	34
6.4	R2 .....	34
<b>7</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>35</b>

---

<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>39</b>
<b>1</b>	<b>ZELLKULTUR .....</b>	<b>39</b>
1.1	Isolierung.....	39
1.2	Kultivierung .....	39
1.3	Einfrieren und Auftauen .....	40
1.4	Aufbewahrung der Lösungen .....	41
1.4.1	Lösungen in der Zellkultur .....	41
1.4.2	Versuchslösungen.....	41
<b>2</b>	<b>Western Blotting.....</b>	<b>42</b>
2.1	Probenvorbereitung/ Proteinlysate.....	42
2.2	Proteinquantifizierung .....	43
2.3	SDS-PAGE.....	43
2.4	Western Blotting.....	44
2.5	Detektion .....	44
<b>3</b>	<b>ROS-Messungen.....</b>	<b>46</b>
3.1	Intrazelluläre ROS-Messung mittels FACS .....	46
3.2	Extrazelluläre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Messung mittels Amplex Red™ Assay .....	47
<b>4</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>48</b>
<b>IV</b>	<b>RESULTATE .....</b>	<b>51</b>
<b>1</b>	<b>RV vermindert die Ang II- und EGF-vermittelte Akt-Phosphorylierung.....</b>	<b>51</b>
<b>2</b>	<b>Antioxidative Eigenschaften von RV und seinen Derivaten.....</b>	<b>51</b>
2.1	Intrazelluläre ROS-Konzentration .....	52
2.2	Extrazelluläre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration .....	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse durch Western Blot Analyse .....</b>	<b>55</b>
3.1	Ang II-induzierte Effekte.....	55
3.1.1	Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Akt.....	56
3.1.2	Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von p38 .....	57
3.1.3	Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Erk.....	58
3.1.4	Effekte von RV und TMRV auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Shp2 .....	59

3.2	EGF-induzierte Effekte .....	61
3.2.1	Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Akt.....	61
3.2.2	Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von p38 .....	62
3.2.3	Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Erk.....	63
3.2.4	Effekte von RV und TMRV auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Shp2 .....	64
3.3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Effekte .....	64
3.3.1	Effekte von RV und TMRV auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Phosphorylierung von Akt.....	65
3.3.2	Effekte von RV und TMRV auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Phosphorylierung von p38.....	65
3.3.3	Effekte von RV und TMRV auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Phosphorylierung von Erk .....	66
3.3.4	Effekte von RV und TMRV auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Phosphorylierung von Shp2 .....	67
<b>V</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>71</b>
1	<b>Antioxidative Eigenschaften von RV und RV-Derivaten .....</b>	<b>71</b>
2	<b>Einfluss von RV und RV-Derivaten auf intrazelluläre Signalwege .....</b>	<b>72</b>
2.1	Akt .....	72
2.2	p38 .....	73
2.3	Erk 1/2.....	74
2.4	Shp2.....	74
3	<b>Abschließende Bemerkungen .....</b>	<b>75</b>
<b>VI</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>VII</b>	<b>APPENDIX.....</b>	<b>93</b>
1	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>93</b>
2	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>97</b>
3	<b>Danksagung .....</b>	<b>99</b>

## II Einleitung



## II Einleitung

### 1 Blutgefäße

#### 1.1 Blutkreislauf

Der Blutkreislauf gewährleistet die permanente Versorgung des Organismus mit Sauerstoff, Nährstoffen und Informationen. Neben dem Herz bilden die Blutgefäße die zweite wichtige Komponente der Blutzirkulation. Während das Herz durch seine Pumpfähigkeit den Blutkreislauf antreibt, ermöglichen die Gefäße diesen Transport überhaupt erst.

Grundsätzlich haben alle Blutgefäße einen ähnlichen Aufbau. Die innerste Schicht, die Intima, besteht aus einer Endothelzellschicht, die einen dichten Abschluss gegenüber dem Gefäßlumen bewirkt. Solange die Intima intakt ist, gewährleistet sie eine ausschließlich kontrollierte Passage von Stoffen durch die Gefäßwand. Die äußerste Schicht, die Adventitia, bildet den Kontakt zum umliegenden Gewebe und besteht aus Bindegewebe und Fibroblasten. In der Mitte dieser beiden liegt die Media, aus glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC – *vascular smooth muscle cells*) und extrazellulärer Matrix (ECM – *extracellular matrix*) aufgebaut, ist sie hauptverantwortlich für die Kontraktionsfähigkeit der Blutgefäße. Besonders diese Schicht kann bei den verschiedenen Gefäßtypen in ihrer Zusammensetzung und Dicke variieren. Arterien zeichnen sich durch eine besonders stark entwickelte Muskelschicht aus.

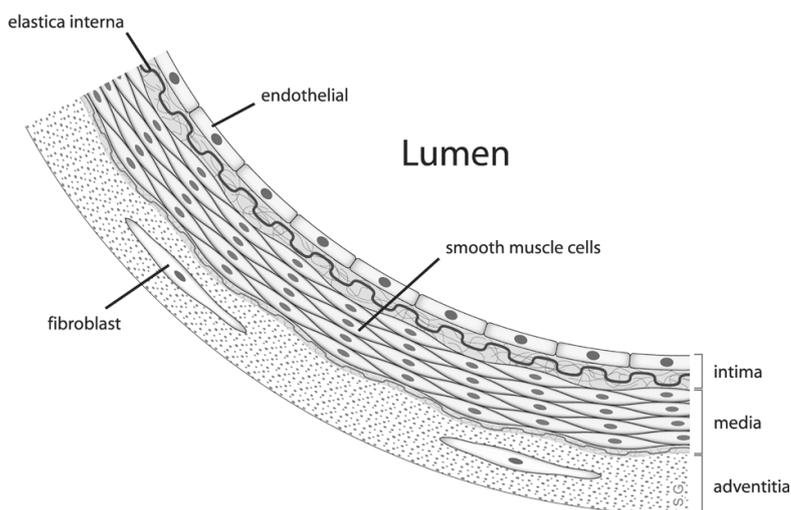


Abbildung 1: **Aufbau einer Gefäßwand**

*Endothelzellen bilden den Abschluss gegenüber dem Gefäßlumen. Die in der Media lokalisierten VSMC sind für die Kontraktionsfähigkeit der Blutgefäße hauptverantwortlich.*

*([http://de.academic.ru/pictures/dewiki/97/anatomy\\_artery.png](http://de.academic.ru/pictures/dewiki/97/anatomy_artery.png))*

Glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen sind in gesunden Gefäßwänden differenziert und proliferieren kaum, jedoch können sie unter gewissen physiologischen sowie pathologischen Reizen dedifferenzieren und wieder in den Zellzyklus eintreten [3].

## 1.2 Atherosklerotische Veränderungen

Mit ungefähr 40 %, das entspricht 2 Millionen Toten pro Jahr, stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache in der EU dar ([http://ec.europa.eu/health-eu/health\\_problems/cardiovascular\\_diseases/index\\_de.htm](http://ec.europa.eu/health-eu/health_problems/cardiovascular_diseases/index_de.htm)). Zu den Herz-Kreislaferkrankungen zählt neben anderen die Atherosklerose. An der Entstehung dieser Krankheiten können viele Komponenten beteiligt sein, zum Beispiel oxidativer Stress [4], Veränderungen im Lipidstoffwechsel [5], Entzündungsvorgänge [6] oder verstärkte Thrombozytenaggregation [7].

Atherosklerotische Veränderungen sind durch neointimale Verdickungen gekennzeichnet. Diese beruhen auf einer Akkumulation von zellulärem und extrazellulärem Material im Raum zwischen der Endothelschicht und der darunterliegenden Media, die das Gefäßlumen einengt [3].

Erste atherosklerotische Veränderungen sind meist durch eine zu starke Beanspruchung (mechanischer Stress, Hypertonie u.a.) der Endothelzellschicht gekennzeichnet, die dadurch geschädigt wird und seine Schutzfunktion verliert. Dieser Verlust wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und führt zu einer erhöhten Permeabilität der Endothelzellschicht, wodurch es unter anderem zur Einwanderung und Einlagerung von Low-Density-Lipoproteinen (LDL), Blutplättchen und Monozyten in die Intima kommt. Aus der Media migrieren VSMC in diese Neointima, die vermehrt ECM bilden.

Durch Oxidation entsteht aus LDL oxidiertes LDL (oxLDL), das von Makrophagen aufgenommen wird und zur Entstehung von cholesterinreichen Schaumzellen führt, die sich in den Blutgefäßen ablagern können. Die Makrophagen, Blutplättchen und Endothelzellen setzen verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren frei, die die Dedifferenzierung und Proliferation von VSMC veranlassen. Die dedifferenzierten VSMC migrieren zum Lumen und tragen durch die Produktion von ECM zur Vergrößerung der Läsionen bei, man spricht von der Bildung von *fatty streaks* [3].

Die Sekretion von Chemokinen und Cytokinen setzt zusätzlich Entzündungsprozesse in Gang, an denen sowohl zelluläre, als auch humorale Immunmechanismen beteiligt sind, weswegen Atherosklerose auch als chronische Entzündung gewertet werden kann [8].

## 1.3 VSMC

Glatte Gefäßmuskelzellen bilden die mittlere Schicht (Media) der Gefäßwände. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Regulierung des Gefäßtonus durch Kontraktion und Dilatation der Blutgefäße. In Homöostase sind die VSMC differenziert und proliferieren nicht, jedoch kann es als Reaktion auf mechanische Verletzungen oder durch Wachstumsfaktoren zur Wiederaufnahme der Zellteilung kommen. Sie wandeln sich von einem kontraktilen, nicht proliferativen Phänotyp in Zellen, die proliferieren, zur

chemotaktischen Migration fähig sind und vermehrt ECM-Proteine (Kollagen, Elastan und Proteoglykane) synthetisieren. Man spricht auch von aktivierten VSMC. Diese Umwandlung bewirkt die Expression von Genen, die Rezeptoren von Wachstumsfaktoren kodieren, sowie zur Bildung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen führen, durch die VSMC sich selbst, sowie andere Zellen, die ebenfalls an der Atherogenese beteiligt sind, aktivieren und beeinflussen können [9].

In vivo ist diese Transformation für die Behebung von Gewebeschäden vorteilhaft [10]. Auf der anderen Seite trägt sie maßgeblich zur Entstehung und Exazerbation von Atherosklerose bei. Besonders in frühen atherosklerotischen Läsionen bilden VSMC den größten zellulären Anteil [11], wohingegen dieser in fortgeschrittenen Läsionen verringert ist [12].

In vitro sind VSMC einer ähnlichen Transformation unterworfen. Sie verändern sich in einen nicht kontraktile Zustand, das heißt, dass keine kontraktile Proteine, dafür vermehrt ECM-Proteine exprimiert werden [10]. Außerdem entwickeln sich VSMC in Kultur hin zu einem proliferativen Phänotyp, der den neointimalen VSMC gleichgesetzt werden kann [13, 14].

Demzufolge stellen kultivierte VSMC ein geeignetes Modell dar, um Signalwege in aktivierten glatten Muskelzellen atherosklerotischer Läsionen der Neointima zu untersuchen.

#### **1.4 Wachstum von VSMC**

An der Bildung von atherosklerotischen Veränderungen in Blutgefäßen sind aktivierte VSMC hauptsächlich über ihr Wachstum beteiligt [3]. Neben der vermehrten ECM-Produktion kann das über zwei grundlegende zelluläre Mechanismen ablaufen.

##### **1.4.1 Hyperplasie/Proliferation**

Unter Hyperplasie versteht man die Vermehrung der Zellzahl, durch vermehrte Zellteilung. Die Zellen treten in den Zellzyklus ein, es kommt zur Duplikation von DNA und Proteinen, sowie zur Einleitung der Mitose, der die Cytokinese folgt. Klassische Stimuli, die Proliferation induzieren, sind Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (*EGF-epidermal growth factor*) [15].

##### **1.4.2 Hypertrophie**

Hypertrophie bedeutet Wachstum, bei dem sich nicht die Anzahl der Zellen erhöht, sondern das Volumen. Dies geschieht durch vermehrte Proteinsynthese und Proteineinlagerungen in die Zelle. Neben seinen vasokonstriktorisches Effekten ist Angiotensin II (Ang II) ein bekannter hypertropher Stimulus [16].

## 2 Stimulatoren

Eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Cytokinen ist in der Lage, Hypertrophie oder Hyperplasie in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* sowie *in vivo* zu induzieren [3]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Ang II als hypertropher und der Wachstumsfaktor EGF als proliferativer Stimulus verwendet.

### 2.1 Angiotensin II

#### 2.1.1 Physiologische Effekte

Angiotensin II (Ang II) ist das Schlüsselmolekül des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Das RAAS ist wesentlich an der Regulation des kardiovaskulären Systems beteiligt. Durch die Kontrolle des Wasser- und Salzhaushaltes zählt es zusammen mit dem vegetativen Nervensystem zu den Haupteinflussfaktoren des Blutdrucks. Ang II stellt neben Aldosteron einen wirksamen Signalstoff des RAAS dar.

Die Bildung von Angiotensin II erfolgt in zwei Schritten. Renin wird in der Niere freigesetzt, wenn der Blutdruck abfällt und/oder es zu einem Verlust von NaCl oder Flüssigkeitsvolumen kommt. Die Proteinase Renin spaltet von dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen Angiotensin I ab. In weiterer Folge werden durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE – *Angiotensin Converting Enzyme*), das in der Lunge gebildet wird, zwei Aminosäuren vom Angiotensin I abgespalten und es entsteht das Octapeptid Angiotensin II, das seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entfaltet.

ACE und Renin stellen zugleich Angriffspunkte in der Therapie von Bluthochdruck dar. ACE-Hemmer zählen zu den weltweit am meisten verabreichten Antihypertensiva. Seit 2007 ist mit Aliskiren ein Renin-Inhibitor auf dem Markt (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108862.htm>).

Die Inaktivierung von Ang II passiert wie die Biosynthese durch Peptidasen.

Angiotensin II wirkt stark vasokonstriktiv. Das führt zu einer direkten Blutdruckerhöhung. In der Nebenniere stimuliert Ang II die Freisetzung von Aldosteron und Adrenalin, in der Hypophyse von Vasopressin. Im Hypothalamus löst Ang II ein Durstgefühl aus. Daraus ergibt sich die Bedeutung des RAAS an der Regulation des Blutdrucks.

Durch den Einsatz von ACE-Hemmern bei arterieller Hypertonie wurde ein positiver Nebeneffekt dieser Arzneimittelklasse entdeckt. ACE-Hemmer konnten Hypertrophie in Gefäßwänden stärker unterdrücken als andere blutdrucksenkende Arzneimittel. Das ließ auf einen Hypertrophie-induzierenden Effekt von Ang II schließen [16, 17]. Mittlerweile konnte bewiesen werden, dass die chronische Stimulation mit Ang II an der Entstehung von kardialer Hypertrophie beteiligt ist und dass sie Hypertrophie von VSMC

induziert [16, 18]. Ang II hat kaum proliferative Effekte [14], jedoch kommt es zu einer etwa 20 %-igen Zunahme des Proteingehaltes bei viertägiger Behandlung mit einem  $\mu\text{M}$  Ang II. Eine erste Erhöhung der Proteinsynthese konnte nach dreistündiger Inkubation gezeigt werden [16]. In VSMC beeinflusst Ang II außerdem die Migration und die ECM-Ablagerung, wirkt pro-inflammatorisch [19] und als Stimulus zur Bildung von Wachstumsfaktoren und weiteren vasoaktiven Stoffen [20].

### 2.1.2 Rezeptoren

Es konnten verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert werden, deren Agonist Ang II ist: Die bedeutendsten davon sind der Angiotensin Typ 1 Rezeptor ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) und der Angiotensin Typ 2 Rezeptor ( $\text{AT}_2\text{R}$ ), die nur 34 % Homologie aufweisen [21].

Der  $\text{AT}_2\text{R}$  findet sich hauptsächlich im fetalen Gewebe, was die Vermutung nahe legt, dass er eine wichtige Rolle bei der fetalen Entwicklung spielt [22]. Dem Rezeptor wird eine gewisse Beteiligung an der Regulation des kardiovaskulären Systems zugesprochen, doch sind die Berichte darüber widersprüchlich. Der  $\text{AT}_2\text{R}$  scheint teilweise die Wirkungen des  $\text{AT}_1\text{R}$  zu antagonisieren [23, 24], dennoch wurde gezeigt, dass der  $\text{AT}_2\text{R}$  Ang II-unabhängig Hypertrophie in Kardiomyozyten verursachen und die  $\text{AT}_1\text{R}$ -induzierte Hypertrophie nicht hemmen kann [25].

Die meisten Effekte von Ang II werden über die Interaktion mit dem  $\text{AT}_1\text{R}$  vermittelt, der sich in vielen Organen, wie der Niere, Leber, Lunge, Gehirn, Nebenniere, Herz und in Blutgefäßen, findet. Auch die Ang II-induzierte Hypertrophie in VSMC wird über den  $\text{AT}_1\text{R}$  bewirkt [1].

Der aus 359 Aminosäuren aufgebaute Rezeptor zählt zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die wiederum zur Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine gehören. Während beim Menschen bislang keine Unterformen gefunden wurden, konnten in Ratten der  $\text{AT}_{1A}\text{R}$  und der  $\text{AT}_{1B}\text{R}$  nachgewiesen werden, die zu 94% ident sind und sich in ihrer Funktion nicht unterscheiden [26, 27]. Für die Ang II-Bindung sind vier Cysteinreste an der extrazellulären Domäne essentiell, die in der Lage sind, Disulfidbrücken auszubilden [28]. Der cytoplasmatische Abschnitt enthält viele Serin/Threonin-Reste, die durch G-Protein-Rezeptorkinasen (GRK) phosphoryliert werden können [1].

Direkt nach der Stimulation mit dem Agonisten wird das Gewebe unempfindlich für weitere Liganden. Dies geschieht durch Internalisierung der Rezeptoren. Innerhalb von zehn Minuten nach der Aktivierung des Rezeptors wird dieser durch Endozytose von der Zelle aufgenommen [29].

Mit Angiotensinrezeptorblockern ist eine weitere Arzneimittelklasse auf dem Markt, die in das RAAS eingreift. Antagonisten des  $\text{AT}_1\text{R}$  binden zwar wie Ang II an den Rezeptor, aktivieren diesen aber nicht. Daraus ergibt sich ihr Einsatz bei Bluthochdruck.

### 2.1.3 Signaltransduktionswege

Die Bindung von Ang II an den AT<sub>1</sub>R führt zur Aktivierung einer Reihe von Signaltransduktionskaskaden, die in weiterer Folge die physiologischen und pathologischen Effekte von Ang II vermitteln. Die verschiedenen *Signaling*-Systeme lassen sich nicht eindeutig voneinander abgrenzen, es kommt zu zahlreichen Interaktionen der einzelnen Kaskaden, die zur besseren Abstimmung der Effekte beitragen, die von Ang II, zum Beispiel in verschiedenen Geweben, ausgehen.

#### 2.1.3.1 G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionswege

Die vasokonstriktorischen Effekte von Ang II werden hauptsächlich über den, innerhalb von Sekunden, aktivierten „klassischen“ G-Protein-gekoppelten Signalweg vermittelt [1].

Die Aktivierung des AT<sub>1</sub>R durch einen Agonist führt zur Interaktion des Rezeptors mit verschiedenen G-Protein-Untereinheiten ( $G_{\alpha_{q/11}}$ ,  $G_{\alpha_{12/13}}$ ,  $G_{\beta\gamma}$ ) [30], die im Weiteren Effektoren wie Phospholipase C (PLC), Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und Phospholipase D (PLD) aktivieren [31].

Die Aktivierung von PLC zieht die Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) nach sich. Dies geschieht schon Sekunden nach der Ligandenbindung an den AT<sub>1</sub>R und zählt somit zu den schnellsten der Ang II-vermittelten Effekte [32]. IP<sub>3</sub> bindet an Rezeptoren des Sarcoplasmatischen Reticulums, wodurch es zur Öffnung von Ionenkanälen und zum Ca<sup>2+</sup>-Efflux kommt. Ca<sup>2+</sup> bindet an Calmodulin und aktiviert die Myosin-Leichtketten-Kinasen (MLCK), die die Myosin-Leichtketten phosphorylieren und somit die Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglichen, die für die Muskelkontraktion nötig ist [20].

Die Aktivierung von PLD führt durch Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Cholin und Phosphatidylsäure (PA), die wiederum in DAG verwandelt wird. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die den pH während der Kontraktion erhöht [33], sowie an der Aktivierung der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade beteiligt ist [1].

Die Aktivierung von PLA<sub>2</sub> durch Ang II veranlasst die Produktion von Arachidonsäure (AA) und ihrer Metabolite, die an der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und in VSMC an der NAD(P)H-Oxidase-Rekrutierung beteiligt sind [34]. Diese Komponenten sind für die proinflammatorischen Effekte von Ang II mitverantwortlich.

Abgesehen von Muskelkontraktionen führen G-Protein-vermittelte Signalwege zur Aktivierung von Signalmolekülen, die in weiterer Folge wachstums- und migrationsfördernd wirken. Die Regulation der Intensität und Dauer des G-Protein-gekoppelten *Signalings* wird durch Regulatoren des G-Protein-gekoppelten *Signalings* kontrolliert [35].

### 2.1.3.2 Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen

Ang II kann unabhängig von der Anwesenheit des Liganden verschiedene Rezeptortyrosinkinasen wie den PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), den Insulinrezeptor oder den EGFR (*epidermal growth factor receptor*) aktivieren.

Die Transaktivierung des EGFR ist ein wichtiger Schritt, durch den Ang II wachstumsfördernde Signalwege beeinflussen kann. Die Ang II-induzierte Aktivierung erfolgt Src- und ROS-abhängig [36], über die Aktivierung von ADAM (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) kommt es zur Freisetzung von Heparin-bindenden EGF (HB-EGF) [37, 38]. In VSMC konnte ADAM-17 als HB-EGF freisetzende Proteinase identifiziert werden [39]. Daneben wurde auch eine direkte Phosphorylierung des EGFR über Src beschrieben [40].

Der aktivierte EGFR setzt zwei wichtige Signalwege in Gang, zum einen den PI3K/PDK1/Akt-Weg, der mit Zellmetabolismus, Wachstum und dem Fortbestand der Zelle assoziiert wird und zum anderen über den Grb2/Shc/Sos-Komplex die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade, durch die MAPK-Proteine aktiviert werden, die vor allem wachstumsfördernde Effekte induzieren [1].

Phosphatidyl-inositol-3-kinasen (PI3K) sind Lipidkinasen, die *Second Messenger* erzeugen, die zelluläre Aktivitäten und Eigenschaften wie Proliferation und Überleben beeinflussen [41]. PI3K werden durch Rezeptortyrosinkinasen aktiviert und beeinflussen PKC sowie Akt [42]. Die Proteintyrosinphosphatase Shp2 ist maßgeblich an der Deaktivierung des PI3K/Akt-Signalweg beteiligt, indem es die p85-Bindungsstelle von Gab1 dephosphoryliert [43, 44].

Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase *downstream* der PI3K, die durch die 3-Phosphoinositide-abhängige Protein Kinasen PDK1 und PDK2 phosphoryliert wird. Akt übt seinen Einfluss auf den Zellzyklus über die deaktivierende Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (Glycogensynthasekinase-3 $\beta$ ) aus, die Cyclin D, c-Myc und eIF (*Eucaryotic Initiation Faktor*) im inaktiven Zustand hält [45]. Durch die Phosphorylierung von Mitgliedern der FOXO-Familie, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren kommt es zu deren Inaktivierung, die sich in der Hemmung der Transkription von Genen die Apoptose, Zellzyklusarrest und metabolische Prozesse regeln, äußert [46, 47]. Über die mTor-abhängige Aktivierung der p70<sup>S6K</sup> werden Proteinsynthese und Zellwachstum angeregt [2, 48]. Akt phosphoryliert MDM2, einen negativen Regulator der p53 Funktion [49]. Über die Phosphorylierung und Aktivierung der I $\kappa$ B Kinase (IKK) kann Akt die NF $\kappa$ B-Funktion erhöhen. Die IKK führt zur Freisetzung von NF $\kappa$ B, das inaktiv als Komplex mit I $\kappa$ B im Cytoplasma vorliegt. Die Freisetzung ermöglicht NF $\kappa$ B die Translokation in den Nukleus und die Aktivierung der Transkription diverser Gene.[49]

Über die Transaktivierung des EGFR bildet sich der Shc/Grb2/Sos-Komplex, der in weiterer Folge die MAPK-Proteine *Extracellular Signal-regulated* Kinase (Erk 1/2 auch p42/44) und p38MAPK (p38) aktivieren kann, die in VSMC an Differenzierung, Proliferation und Migration beteiligt sind [50, 51]. Auch c-Jun N-terminale Kinase (JNK) zählt zu den MAPK-Proteinen. Es wurde zwar auch eine Ang II-induzierte Aktivierung von JNK beschrieben, jedoch läuft diese im Gegensatz zu p38 und Erk EGFR-unabhängig ab [52].

Der Shc/Grb2/Sos-Komplex aktiviert Ras [53], Raf induziert über die Interaktion mit Ras die Aktivierung der MAPK/ERK-Kinase (MEK), die zur Phosphorylierung von Threonin/Tyrosinresten von Erk 1/2 führt [54]. Inaktiviert wird Erk durch die MAP Kinase Phosphatase-1 [55]. Die Aktivität von Erk scheint  $Ca^{2+}$ -abhängig zu sein, nachdem eine Hemmung der PLC zur Unterdrückung des Signals führt [56]. Die Aktivierung von Erk führt zum Anstieg des Transkriptionsfaktors c-fos und somit auch zu vermehrter AP-1-Aktivität. Aktivator Protein 1 (AP-1) ist ein Transkriptionsfaktorkomplex aus c-fos und c-jun, der schlussendlich Zelldifferenzierung und Migration durch veränderte Genexpression beeinflusst [4]. Über die Regulation des Transkriptionsfaktors PHAS-1 ist Erk am Ang II-vermittelten Zellwachstum und der Proteinsynthese beteiligt [57]. Gemeinsam mit Akt wird Erk mit antiapoptotischen und pro-mitogenen Effekten in Verbindung gebracht [58].

Neben diesen Signalwegen aktiviert Ang II auch *Apoptosis Signal Regulating* Kinase 1 (ASK 1), die in weiterer Folge p38MAPK (über MEK3/6) und JNK (über MEK 4/7) phosphoryliert. Die beiden werden zu den Stress-induzierten Kinasen gezählt, die mit Apoptose und Differenzierung in Verbindung gebracht werden [1]. Es konnte gezeigt werden, dass ASK 1 für die Ang II-induzierten Kardiomyozytenhypertrophie, sowie –remodeling von Bedeutung ist [59, 60].

Die Aktivierung von p38 ist nicht vollkommen verstanden, jedoch scheint sie von den Mechanismen, die Erk aktivieren, deutlich abzuweichen [61]. Aktivierte p38 führt über MAPKAPK-2 zur Phosphorylierung von HSP-27 [50], daneben konnte seine Beteiligung an der Aktivierung von p70<sup>S6K</sup> gezeigt werden [62]. Außerdem scheint p38 gemeinsam mit MAPKAPK-2 an der Aktivierung von Akt beteiligt zu sein [1, 50]. p38 wird als sehr redoxsensitiv beschrieben [61].

### 2.1.3.3 Tyrosinkinasen

Der AT<sub>1</sub>R besitzt keine intrinsische Kinaseaktivität, dennoch gibt es einige Tyrosinkinasen, die durch Assoziation an den Rezeptor, Signale an intrazelluläre Proteine übermitteln können.

c-Src ist eine Tyrosinkinase, die im Ang II-Signaling eine zentrale Rolle einnimmt, es steht am Anfang vieler Ang II-vermittelter Signalwege [63]. Die Aktivierung erfolgt ROS-abhängig über Interaktion mit G<sub>βγ</sub>-Proteinen und beeinflusst die Phosphorylierung vieler Proteine einschließlich Ras, FAK, JAK/STAT,

PLC- $\gamma$  [1], PLD<sub>2</sub>, PKC, PI3K und EGFR [63]. Die Aktivierung von FAK und Pyk2 führt im Weiteren zu Wachstum, sowie zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen [64].

Die Aktivierung von JAK hat die Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT Molekülen und deren Translokation in den Nukleus zur Folge. Im Nukleus kommt es zur Transkription von wachstumsfördernden Genen [1].

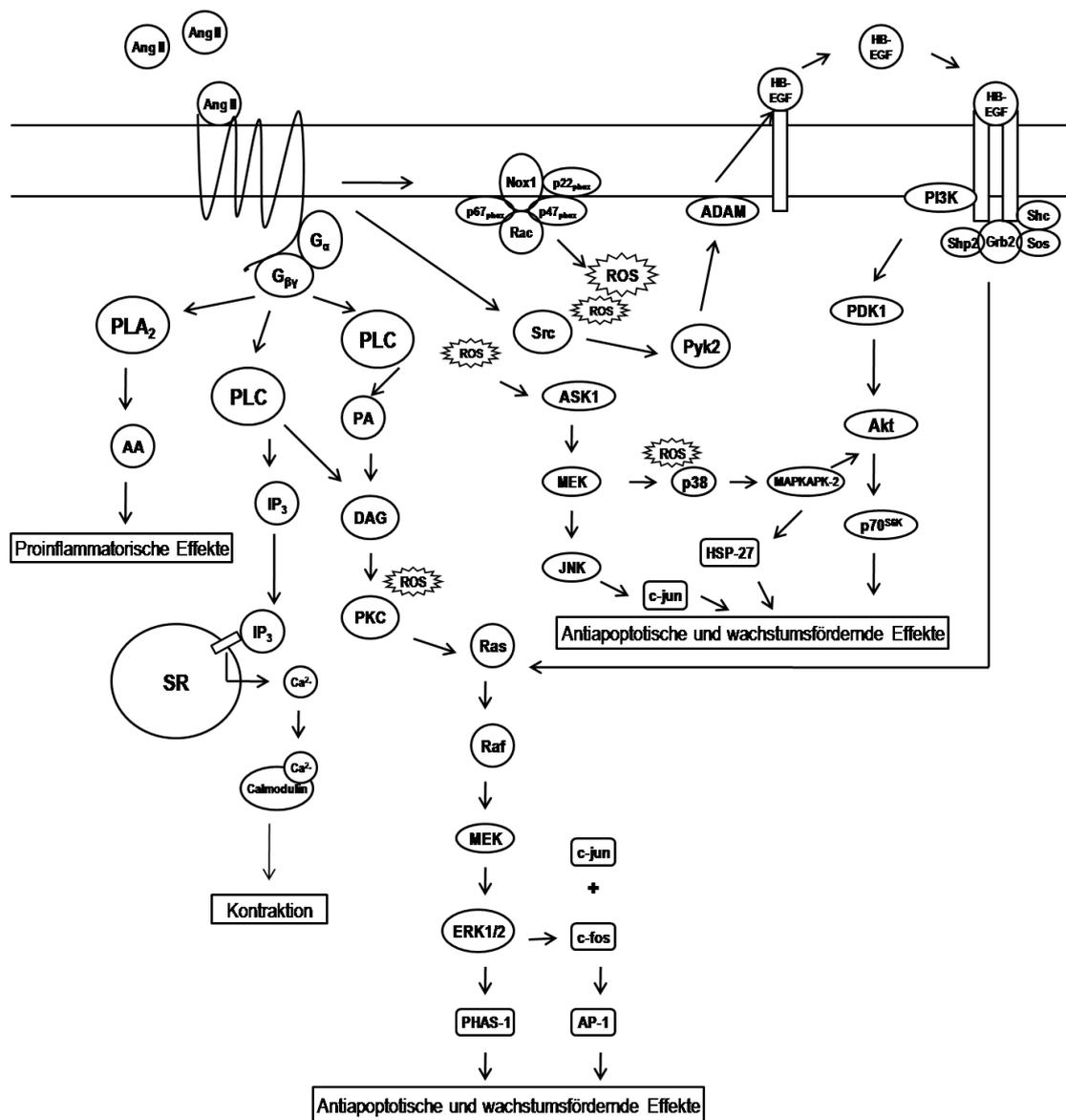


Abbildung 2: Überblick über das Ang II Signaling in VSMC

Ang II reguliert über verschiedene Signalwege essentielle Funktionen der VSMC: Kontraktion, proinflammatorische Effekte, antiapoptotische und wachstumsfördernde Signale. Adaptiert von Metha et al. [1] und Schreiner [2].

#### 2.1.3.4 NAD(P)H-Oxidasen und ROS-Signaling

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS - *reactive oxygen species*) werden mit der Regulation der Aktivität von Tyrosinkinasen und -phosphatasen in Verbindung gebracht [4, 65, 66]. Ang II ist ein Mediator von oxidativem Stress und viele seiner Effekte werden durch oxidatives *Signaling* vermittelt [4, 67], indem membranständige NAD(P)H-Oxidasen aktiviert werden, die dadurch ROS produzieren und so Signalwege beeinflussen [34, 68]. Die Ang II-induzierte Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen moduliert die Phosphorylierung der Src/EGFR/PI3K und der PLD/PKC-Kaskade [1, 63, 69].

Auch wenn ROS als *Second Messenger* bezeichnet werden, ist damit größtenteils H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemeint. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann Signalmoleküle reversibel modifizieren [70]. Einige solcher redox-sensitiver Moleküle spielen im Ang II-vermittelten *Signaling* eine Rolle, unter anderen Akt, Src, EGFR, p38 [1] und Shp2 [71].

## 2.2 EGF

### 2.2.1 Physiologische Effekte

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Wachstumsfaktor, der an der Regulation von Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt ist. Weiters wirkt EGF im Gastro-Intestinaltrakt durch Aufrechterhaltung der Schleimhaut, sowie durch Hemmung der Magensäuresekretion anti-ulcerogen [72]. In den Gefäßen ist EGF bei der Atherogenese wichtig, da er zur Transformation der VSMC von einem nicht proliferativen, differenzierten zu einem proliferativen, migrations-aktiven Phänotyp beiträgt und somit die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen fördert [73, 74]. Des Weiteren scheinen die wachstumsfördernden Effekte von EGF auf glatte Muskelzellen der Neointima ausgeprägter, als auf solche, die in der Media lokalisiert sind [75].

Das Polypeptid wurde erstmals aus der submandibulären Drüse einer Maus durch Cohen isoliert [76]. Humanes EGF besteht aus 53 Aminosäuren und wird durch drei Disulfidbrückenbindungen in die richtige Konformation gebracht [15].

EGF liegt als membrangebundenes Protein vor, das durch ADAM proteolytisch in die lösliche Form überführt wird, die den Rezeptor aktivieren kann [77]. Jedoch kann auch das membrangebundene EGF mit Rezeptoren in seiner direkten Umgebung interagieren, man spricht von *juxtakrinen Signaling* [78].

### 2.2.2 Rezeptoren

Genauso wie bei den Rezeptoren von anderen Wachstumsfaktoren handelt es sich beim EGF-Rezeptor (EGFR), auch als HER1 oder ErbB-1 bezeichnet, um eine Rezeptortyrosinkinase, die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Der EGFR war die erste Rezeptortyrosinkinase, die entdeckt wurde [79].

Gemeinsam mit HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 und HER4/ErbB-4 bildet der EGFR eine Unterfamilie aus engverwandten Tyrosinkinase, die durch EGF, HB-EGF, TGF  $\alpha$  aktiviert werden. Weitere Liganden, die ErbB aktivieren sind Amphiregulin, Betacellulin, Epigen und Epiregulin [80].

Ligandenbindung führt zur Dimerisierung und Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität, die wiederum zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der cytoplasmatischen Domäne führt, man spricht von Autophosphorylierung. Die phosphorylierten Tyrosinreste können intrazelluläre Signalmoleküle aktivieren und somit Signaltransduktionskaskaden in Gang setzen [81].

Die ErbB-Rezeptoren bilden Homo-, sowie Heterodimere, wobei alle paarweisen Kombinationen der vier Rezeptoren möglich sind [82]. Der inaktive Rezeptor, der keinen Liganden bindet, liegt als Monomer vor. In der extrazellulären Domäne ist der ungefähr zehn Aminosäuren umfassende "Dimerisierungsarm" so positioniert, dass es zu keinen Interaktionen zwischen den Rezeptormonomeren kommen kann [83]. ErbB-2 stellt hierbei eine Ausnahme dar: Für diesen Rezeptor ist kein direkter Ligand bekannt, der ihn aktiviert, jedoch stellt er auch ohne Ligandenbindung einen Dimerisierungspartner für die aktivierten ErbB-Mitglieder dar [84, 85]. Dies erklärt die Tatsache, dass eine Überexpression von ErbB-2 für die Entstehung vieler Malignome verantwortlich gemacht wird [86, 87]. 20% aller Brustkrebskrankungen werden mit ErbB-2 assoziiert, weswegen mit Trastuzumab ein monoklonaler Antikörper gegen diesen Rezeptor therapeutisch eingesetzt wird, weitere finden sich in klinischer Prüfung [88, 89].

Wie alle Rezeptortyrosinkinasen ist der EGFR zusammengesetzt aus einer extrazellulären Domäne, die den Liganden bindet, einem einfachen Transmembrangsegment, sowie der cytoplasmatischen Domäne, die den durch regulatorische Sequenzen geschützten Proteintyrosinkinasekern enthält [83].

Die Aktivität des EGFR ist größtenteils abhängig von der Verfügbarkeit an Liganden, die einerseits durch seine Expression und auf der anderen Seite durch posttranslationale Modifikationen und hier vor allem durch die proteolytische Freisetzung von EGFR-Liganden reguliert wird [90]. Eine wichtige Rolle spielen dabei sogenannte ADAM [91], denen im Rahmen der Transaktivierung des EGFR durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren große Bedeutung beigemessen wird [37, 38].

### 2.2.3 Signaltransduktionswege

Die Ligandenbindung an der extrazellulären Domäne des EGFR veranlasst eine Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Dimerisierung erlaubt. Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne werden autophosphoryliert. [73, 81]. Die Phosphorylierung kann auch durch Src induziert werden [40]. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für Proteine mit Phosphotyrosin-bindenden SH2 (*Src Homology 2*)-Domänen. Auf diese Weise werden die MAPK- und die PI3K/Akt-Kaskade initiiert, die in Wachstumssignalen enden [92].

Zu den Adaptermoleküle, die SH2-Domänen zur Anlagerung an den EGFR enthalten, zählen PLC $\gamma$ , PLD, Src, Grb2, Gab-1, Shp1 und Ras [2, 73, 92]. Über diese Signalmoleküle werden wachstumsfördernde Signale weitergeleitet, die sich in der Aktivierung verschiedener Proteine, wie schon bei der Transaktivierung des EGFR durch AT<sub>1</sub>R beschrieben, äußern.

DeYulia et al. zeigten [93], dass die Interaktion von EGF mit dem EGFR zur extrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion führt, die sich hemmend auf die Proteintyrosinphosphatase 1B (PTP1B) auswirkt.

### 3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

#### 3.1 Definition

Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden einige reaktionsfreudige, sauerstoffhaltige Verbindungen zusammengefasst. Dazu zählen einerseits stabile Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hypochlorit (HOCl) und Hydroperoxide (ROOH), zum anderen freie Radikale wie Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Hydroxylradikale (OH<sup>•</sup>) und Peroxylradikale (ROO<sup>•</sup>). Freie Radikale sind Moleküle, die ungepaarte Elektronen besitzen, das heißt nur mit einem Elektron besetzte Orbitale enthalten [94].

Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) und Stickstoffmonoxid (NO) werden als reaktive Stickstoffspezies zusammengefasst, die neben ROS die zweite wichtige oxidative Komponente im Organismus darstellen.

Die Entstehung von ROS kann durch exogene Faktoren (z.B.: UV-Licht, ionisierende Strahlung, Toxine) verursacht werden oder aus endogenen Quellen stammen. In VSMC konnten NAD(P)H-Oxidasen, Mitochondrien, Xanthin-Oxidasen und Lipoxygenasen als ROS-Quellen identifiziert werden, wobei den Mitochondrien und den NAD(P)H-Oxidasen die größte Bedeutung beigemessen wird [95]. In den Mitochondrien entsteht ROS als Nebenprodukt der Atmungskette bei der ATP-Produktion durch Elektronen-Transport mittels Cytochrom-c-Oxidase [96].

Eine wichtige ROS-Quelle in VSMC sind die NAD(P)H-Oxidasen, die Komplexe aus verschiedenen Proteinen darstellen, deren Zusammensetzung je nach Zelltyp variieren kann [95]. NAD(P)H-Oxidasen wurden zuerst in Neutrophilen und Makrophagen entdeckt, wo sie an der Immunabwehr maßgeblich beteiligt sind, indem sie große Mengen an mikrobiziden Superoxidanionen bilden [97]. NAD(P)H-Oxidasen, die sich in den glatten Muskelzellen der Aorten von Ratten finden, sind aus p22phox, der katalytischen Subunit Nox1 oder Nox4 aufgebaut. Im Gegensatz zum konstitutiv aktiven Nox4/p22phox-Komplex, benötigen NAD(P)H-Oxidasen, die Nox1 enthalten, die Rekrutierung von drei cytosolischen Untereinheiten (Rac1, p47phox, p67phox) zur Aktivierung [95].

In seinem aktivierten Zustand nehmen NAD(P)H-Oxidasen Elektronen von NAD(P)H auf und geben sie an molekularen Sauerstoff ab, wodurch Superoxidanionen gebildet werden. Daraus ergibt sich folgende chemische Gleichung:  $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$  [4].

In NAD(P)H-Oxidasen gebildetes  $O_2^{\cdot-}$  wird sofort in  $H_2O_2$  umgewandelt und dies ist an physiologischen und pathologischen Prozessen in VSMC, wie Hypertrophie, Proliferation, Migration und Inflammation maßgeblich beteiligt [34].

### **3.2 Effekte von ROS**

Lange Zeit nahm man an, ROS wären nur pathologische Stimuli, die ausschließlich Schaden anrichten. Zwar werden ROS mit der Entstehung vieler Krankheiten in Verbindung gebracht, doch weiß man heute, dass ROS, im speziellen  $H_2O_2$ , in niedriger Konzentration als *Second Messenger* in Signaltransduktionskaskaden eingreifen, die an Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt sind [65, 66]. ROS beeinflussen die Signalweiterleitung hauptsächlich durch oxidative Veränderungen an Proteinen. Darüber hinaus sind ROS, in großen Mengen durch ihre toxischen Eigenschaften ein integraler Bestandteil der Immunabwehr [97].

Unter diesem Aspekt wird deutlich, dass die Regulation der Konzentration von ROS in der Zelle von großer Bedeutung ist. Die nötige Balance wird zum einen durch die Entstehung von ROS und andererseits durch antioxidative Abwehrmechanismen eingestellt. Zu wenig ROS in der Zelle führt zu einer ungenügenden Weiterleitung von ROS-abhängigen Signalen [98]. Auf der anderen Seite spricht man bei einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von ROS von oxidativem Stress [99].

ROS können mit verschiedenen Signalproteinen interagieren. Es kommt zu reversiblen und irreversiblen Veränderungen an Biomolekülen. Die irreversiblen Reaktionen treten vor allem bei oxidativem Stress auf. Auf der anderen Seite sind ROS essentiell für die Weiterleitung vieler wachstumsfördernder Signale. Als Signaltransduktor agiert hauptsächlich  $H_2O_2$  über reversible Veränderungen an Proteinen [100]. So führt der aktuelle Redoxhaushalt zu einer weiteren Beeinflussung der Signaltransduktionswege und dies zu einer Zunahme der Effekte und somit der Komplexität, die von einem Signal ausgeht [101].

### **3.3 Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress wird mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht. Neurodegenerative Erkrankungen (M. Alzheimer, M. Parkinson, Chorea Huntington) [102], entzündliche Erkrankungen [103], kardiovaskuläre Erkrankungen [4, 104] und maligne Entartungen [105, 106] zählen dazu. Des Weiteren setzt oxidativer Stress Alterungsprozesse in Gang [107, 108].

Die schädlichen Effekte von ROS beruhen auf der irreversiblen Oxidation von zellulären Makromolekülen wie Lipiden, DNA und Proteinen, die DNA-Schäden, Lipidperoxidationen und Veränderungen von Proteinen, bis hin zu deren Funktionsverlust, mit sich ziehen [100].

### **3.4 Redox-Regulation von Ang II- und EGF-induzierten Signalwegen in VSMC**

ROS wirkt durch reversible Oxidation von Signalmolekülen in verschiedenen Signalkaskaden als *Second Messenger* [100, 109]. Von besonderer Bedeutung sind Cysteingruppen an Proteinen. Diese Cysteine tragen durch ihre Fähigkeit zur reversiblen Oxidation und Reduktion maßgeblich zum ROS-abhängigen *Signaling* bei [70]. Die Oxidation von Cysteinmolekülen führt zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Viele Rezeptoren und intrazelluläre Proteine können durch eine solche Modifikation in ihrer Aktivität beeinflusst werden [65]. Ein Beispiel dafür sind Rezeptortyrosinkinasen, deren Aktivierung über Dimerisierung durch Disulfidbrückenbindung abläuft [81]. Proteine, die Cysteinreste in ihren aktiven Domänen enthalten, sind potentielle Zielstrukturen für eine Oxidation durch  $H_2O_2$ , solche die Fe-S-Zentren haben, eher für Superoxidanionen [110].

#### **3.4.1 Einfluss von ROS auf Signaltransduktionskaskaden**

Die Transduktion der Signale von Ang II benötigt die Produktion von ROS. So konnte die Ang II-induzierte Hypertrophie in VSMC durch die Überexpression von Katalase, einem  $H_2O_2$ -abbauenden Enzym, sowie durch Hemmung der NAD(P)H-Oxidasen verhindert werden [68, 111, 112]. Die Hemmung von Nox1 führt zur Hemmung von Ang II-induzierten Signalen, die Hypertrophie vermitteln, wohingegen das EGF-Signaling unbeeinflusst bleibt. Nox4 hat keinen Einfluss auf Ang II- und EGF-Signalwege [2].

Ang II führt zu einer akuten Aktivierung von Nox1-enthaltenden NAD(P)H-Oxidasen, die sich in der Produktion von ROS äußert, und zur Aktivierung von c-Src führt [63, 95]. Seshiah et al. [63] konnten zeigen, dass Src eine zentrale Rolle im ROS-abhängigen Ang II-Signaling einnimmt, indem es im Weiteren zur Aktivierung von PLD<sub>2</sub>, PKC, PLA<sub>2</sub>, PI3K und EGFR führt [63, 113, 114]. Die ROS-abhängige Transaktivierung des EGFR scheint über die Src-vermittelte MMP-aktivierte Freisetzung von HB-EGF abzulaufen [52]. Die Transaktivierung des EGFR führt zu einer Fortsetzung der Ang II-vermittelten ROS-Produktion durch NAD(P)H-Oxidasen [63].

Einige Effekte von Ang II in VSMC werden über die PI3K vermittelt, die durch Src teilweise über EGFR-Transaktivierung aktiviert wird. PI3K aktiviert Rac1, das eine weitere ROS-Freisetzung durch NAD(P)H-Oxidasen mit sich bringt [63]. Ein weiteres Signalmolekül, das durch PI3K aktiviert wird, ist Akt. Über dieses Protein werden hypertrophiefördernde und antiapoptotische Effekte von Ang II weitergeleitet [67]. Die ROS-Sensitivität von Akt wird auf die MAPKAPK-2 und die p38MAPK [61] zurückgeführt, deren Aktivierung der Phosphorylierung von Akt vorangeht [1, 50].

Antioxidantien wirken sich hemmend auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und JNK aus [51]. Die Redoxabhängigkeit der Ang II-induzierten Aktivierung von Erk ist nicht eindeutig geklärt. Teilweise wurde eine Hemmung durch NAD(P)H-Oxidase-Inhibitoren gezeigt [115, 116]. In anderen Berichten hatten Antioxidantien keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk [51, 61, 117]. Durch das Antioxidans Resveratrol (RV) konnte die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von Erk in Kardiomyozyten reduziert werden [118].

Proteintyrosinphosphatasen (PTP) entfernen die Phosphorylierung an Proteinen. Ihre aktive Domäne beinhaltet eine redox-sensitive Cysteingruppe, deren Oxidation zur Inaktivierung des Proteins führt [71, 119]. PTP werden in den meisten Fällen durch Phosphorylierung von Tyrosin- oder Serinresten aktiviert, die Thiol-Oxidation führt zur Inaktivierung. Beide Modifikationen sind reversibel und führen zu einer besseren Feinabstimmung der Aktivität von PTP [120].

Eine wichtige PTP im Ang II-*Signaling* ist Shp2. Die Phosphorylierung von Shp2 bedeutet seine Aktivierung und somit die Dephosphorylierung von Substraten. Die Überexpression von Shp2 führte in VSMC zu einer Unterdrückung der Ang II-induzierten Erk-Phosphorylierung, während die Expression von katalytisch inaktiver Shp2 einen Anstieg der Phosphorylierung von Erk bewirkte [71, 121]. In spontan hypertensiven Ratten wurde die Aktivierung von Akt, nicht aber die von Erk oder p38, mit einer erhöhten Oxidation und verringerter Phosphorylierung von Shp2 in Verbindung gebracht. Dafür sind ROS notwendig, die in NAD(P)H-Oxidasen gebildet wurden, die Nox1 enthalten [71].

### **3.4.2 Einfluss von ROS auf Transkriptionsfaktoren**

Viele der Effekte von Ang II werden durch die Transkription verschiedener Gene vermittelt. Ein wichtiger ROS-sensitiver Transkriptionsfaktor ist AP-1, für dessen Aktivierung p22phox benötigt wird [122]. NFκB, ein Transkriptionsfaktor, der Proliferation, Überleben und Induktion von inflammatorischen Cytokinen steuert, scheint neben anderen auch auf die Anwesenheit von ROS angewiesen [123].

### **3.4.3 Einfluss von ROS auf die Translation**

ROS können auf allen Ebenen des Ang II-*Signalings* Einfluss nehmen. Neben den Signaltransduktionskaskaden und der Transkription von Genen, kann auch die Translation beeinflusst werden [95]. Ein wichtiger Schritt in der Initiation der Translation ist die Dissoziation vom phosphorylierten PHAS-1 von eIF4E, durch dessen Phosphorylierung die Translation eingeleitet wird. PHAS-1 hat zwei Phosphorylierungsstellen. Thr<sup>70</sup> wird weitgehend ROS-unabhängig durch Erk und PI3K phosphoryliert, wohingegen die Phosphorylierung von Ser<sup>65</sup> ROS-sensitiv durch p38, Akt und PP2A reguliert wird [124].

### 3.5 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde im Rahmen dieser Arbeit als Stimulus verwendet, sowie bei den Tests zur antioxidativen Aktivität stellvertretend für alle Arten von ROS detektiert. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist ein *Second Messenger*, der sich extern zugeführt als Stimulus eignet, wobei zu beachten ist, dass die so erzielten Effekte, denen von endogen produzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht komplett entsprechen müssen [109].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist bei physiologischem pH stabil und kann biologische Barrieren leicht durchdringen. Es entsteht im Organismus hauptsächlich beim Abbau von Superoxidanionen ( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ), der entweder spontan oder enzymatisch durch die Superoxiddismutase geschieht. Daraus ergibt sich, dass das Vorhandensein von Superoxidanionen die Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit sich bringt [99], wodurch sich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als repräsentatives Molekül zur Detektion von ROS, die in NAD(P)H-Oxidasen gebildet wurden, eignet. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann auch ohne Anwesenheit von O<sub>2</sub><sup>-</sup> durch Monoaminoxidasen sowie durch Aminosäureoxidasen gebildet werden [125].

In unaktivierten Zellen befindet sich die Konzentration von Wasserstoffperoxid im nanomolaren Bereich [109, 126]. Die höchste Konzentration von Wasserstoffperoxid konnte mit 5-10 mM in Phagosomen nachgewiesen werden [97]. An und für sich ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht sehr reaktiv, bei hohen Konzentrationen (>50 µM) kann es jedoch zu Interaktionen mit Biomolekülen kommen [127, 128].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird durch verschiedene Enzyme abgebaut, wie Katalase, Glutathionperoxidasen und Peroxiredoxine [129, 130]. Peroxiredoxine sind weniger effizient im Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als die anderen beiden Enzyme, jedoch scheinen sie in der Regulation von ROS-abhängigen *Signaling* verschiedener Wachstumsfaktoren von Bedeutung zu sein [131].

## 4 **Antioxidantien**

### 4.1 Definition

Mit der Bedeutung von ROS für die Signaltransduktion wird klar, dass Antioxidantien die ROS-abhängige Signalweiterleitung beeinflussen können.

Der Term Antioxidans ist jedem ein Begriff, dennoch bedeutet er nicht für alle das gleiche [132]. Chemisch gesehen sind Antioxidantien Stoffe, die Oxidationsreaktionen entgegen wirken, aus biologischer Sicht handelt es sich um Moleküle, die entweder die Entstehung von ROS unterdrücken können, oder deren Abbau fördern [133].

#### 4.1.1 „Chemische“ Antioxidantien

„Chemische“ Antioxidantien, die auch in lebenden Organismen antioxidativ wirken können, umfassen zum einen reduzierende Stoffe, wie zum Beispiel Vitamin C (Ascorbinsäure), die ein geringeres Redox-Potential aufweisen, als die zu schützenden Substanzen und somit leichter oxidiert werden als diese. Dies zieht den Verbrauch des Oxidans mit sich, das dadurch keinen schädlichen Einfluss mehr ausüben kann. Auch Radikalfänger zählen dazu, sie können freie Radikale einfangen und die Kettenreaktion, die aus der Reaktivität der Radikale hervorgeht, stoppen. Wenn zwei Radikale miteinander reagieren, bilden die zwei ungepaarten Elektronen eine kovalente Bindung aus, das Reaktionsprodukt ist kein Radikal mehr. Im Gegensatz dazu endet die Reaktion eines Radikals mit einem nicht radikalen Molekül, wie es die meisten Biomoleküle sind, in der Bildung eines neuen Radikals, es kommt zu einer Kettenreaktion [94]. Diese eben beschriebenen Arten von Antioxidantien finden in der Lebensmittel-, der Kosmetik- und der Kunststoffindustrie Einsatz, wo sie als Konservierungsmittel und Stabilisatoren eingesetzt werden.

Zu beachten ist jedoch, dass Radikalfänger durch die Interaktion mit den Radikalen selbst modifiziert werden, und auf diese Weise reaktive Stoffe entstehen können, die potentiell Schaden anrichten können [132]. Radikalfänger sind redox-aktive Moleküle, das heißt sie können in reduzierter, sowie oxidierter Form vorliegen. Aus diesem Grund sind viele antioxidative Stoffe in der Lage gleichermaßen pro-oxidativ zu wirken, indem sie zu Veränderungen an Lipiden und DNA führen können. Studien konnten die pro-oxidativen Eigenschaften von antioxidativen Vitaminen [134] sowie von Polyphenolen aus Pflanzen bestätigen [135]. Ob ein Molekül anti- oder pro-oxidativ wirkt, ist abhängig von der Konzentration des Moleküls und dem Zelltyp, sowie von der Anwesenheit von redox-aktiven Reaktionspartnern [134, 135].

#### 4.1.2 „Biologische“ Antioxidantien

„Biologische“ Antioxidantien führen zu einer Reduktion der ROS-Konzentration und somit zu einem Schutz vor ROS-bedingten Schäden auf Biomoleküle. Dies kann durch verschiedene Strategien geschehen. Antioxidantien in lebenden Organismen besitzen entweder Radikalfängereigenschaften, können die ROS-Produktion unterbinden oder fördern die zellulären antioxidativen Schutzmechanismen [132].

Es gibt kein Antioxidans, das jeder Matrix Schutz vor oxidativer Zerstörung bietet. Es kann sogar sein, dass es in einem System gut wirkt, einem anderen Schaden zufügt [132, 136].

## 4.2 Antioxidantien in lebenden Organismen

### 4.2.1 Zelluläre antioxidative Abwehrmechanismen

Die Tatsache, dass so viele Organismen aus dem aeroben Stoffwechsel ihre Lebenskraft beziehen, zeugt von der Energie, die in Sauerstoff ( $O_2$ ) steckt.  $O_2$  fungiert in der mitochondrialen Elektronentransportkette als terminaler Elektronenakzeptor. Dies ergibt ein sehr effizientes Energiegewinnsystem [128]. In diesem Energiereichtum liegt jedoch auch die Toxizität von  $O_2$  begründet. 1954 fand man heraus, dass die Toxizität von  $O_2$  hauptsächlich auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen zurückzuführen ist [137]. Man schätzt, dass 1-3 % des von Menschen aufgenommenen  $O_2$  in  $O_2^{\cdot-}$  umgewandelt wird [138].

Dies zeigt, dass der aerobe Stoffwechsel nicht ohne Produktion von schädlichen ROS auskommt. Des Weiteren geht aus der Funktion von ROS als *Second Messenger* hervor, dass auch sein Abbau einer genauen und schnellen Kontrolle unterworfen ist [109]. Aus diesem Grund entwickelten sich zelluläre Mechanismen, die ROS abbauen und so ein Redoxgleichgewicht herstellen. Als generelles Ziel der antioxidativen Abwehr kann die Umwandlung von ROS in Wasser angesehen werden [99].

#### 4.2.1.1 Antioxidative Enzyme

Ein wichtiges Enzym der zellulären antioxidativen Abwehr ist die Superoxiddismutase (SOD), die die Umwandlung von  $O_2^{\cdot-}$  in  $H_2O_2$  katalysiert. Nachdem das Endprodukt der SOD  $H_2O_2$  ist, müssen diese mit  $H_2O_2$ -abbauenden Enzymen zusammenarbeiten. Die in den Peroxisomen fast aller Säugetierzellen lokalisierte Katalase baut  $H_2O_2$  zu Wasser und Sauerstoff ab [125]. Ein weiteres Enzym, das die Entfernung von  $H_2O_2$  zur Aufgabe hat, ist die Glutathionperoxidase (GPx). Die aktive Domäne von GPx enthält ein Selenocystein, bei dem der Schwefel des Cysteins durch ein Selen ersetzt wurde (R-SeH). Diese funktionelle Gruppe reagiert mit dem Peroxid ( $H_2O_2$  oder Lipidperoxid), indem es zu R-SeOH oxidiert wird. Die Reduktion in den Ausgangszustand erfolgt durch zwei Glutathionmoleküle (GSH), die zu einem Disulfid (GSSG) oxidiert werden. [99].

Eine noch nicht so lange bekannte Art von Proteinen, die die Reduktion von Peroxiden katalysieren, sind die Peroxiredoxine (Prx). Die Regeneration der oxidierten Prx läuft über die Thioredoxin-Reduktase. Prx enthalten Cysteinreste, die das redox-aktive, katalytische Zentrum darstellen [139, 140]. Eine vorübergehende Überexpression von Peroxiredoxinen äußerte sich in kultivierten Zellen in einer Hemmung der durch Wachstumsfaktoren ausgelösten  $H_2O_2$ -Produktion, was auf eine Beteiligung der Peroxiredoxine an der Regulation der Wachstumsfaktor-induzierten Signaltransduktionswege schließen lässt [131].

#### 4.2.1.2 *Sequestration von Metallionen*

Ein weiterer endogener Abwehrmechanismus gegen oxidative Schäden ist die Sequestration von Metallionen. Ein Großteil der Toxizität von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ergibt sich aus der Umwandlung dieser in  $\text{OH}^{\cdot}$  [94, 138]. Für diese Konversion sind oft Eisen- oder Kupferionen verantwortlich [141]. Das erklärt die Schädlichkeit von Eisen- und Kupferionen für den Organismus, die durch ein ausgeklügeltes System aus Transport- und Speicherproteinen, möglichst gering gehalten wird [141]. So können an Transferrin oder Lactoferrin gebundene Fe-Ionen zu keiner Radikalbildung mehr führen [142].

### 4.2.2 **Exogene Antioxidantien**

#### 4.2.2.1 *Glutathion*

Glutathion (GSH) ist ein wichtiges Molekül der antioxidativen Abwehr, da es an der Regeneration vieler Antioxidantien beteiligt ist. GSH ist gleichermaßen ein endogenes wie exogenes Antioxidans, es kann teilweise aus der Nahrung aufgenommen werden, oder im Organismus synthetisiert werden, [143]. Die de Novo-Synthese erfolgt aus Glutamat, Cystein und Glycin, wobei sich N-Acetylcystein (NAC) als Ausgangsstoff für Cystein zur intrazellulären GSH-Synthese eignet [144]. Durch die Oxidation von GSH bildet sich das pro-oxidative  $\text{GS}^{\cdot}$ -Radikal, das sofort mit einem zweiten  $\text{GS}^{\cdot}$ -Radikal zum GSSG reagiert. GSSG wird durch die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase zu zwei Molekülen GSH reduziert [144]. Durch Interaktionen mit anderen Thiol-hältigen Proteinen, spielt GSH eine wichtige Rolle in der Regulation der Redoxhomöostase [143].

#### 4.2.2.2 *Vitamine*

Der Begriff Vitamin E bezieht sich auf eine Gruppe von 16 lipophilen Substanzen, die teilweise antioxidativ wirken. Wenn man von Vitamin E als Antioxidans spricht, ist meist  $\alpha$ -Tocopherol gemeint.  $\alpha$ -Tocopherol wird als eines der wichtigsten durch die Nahrung aufgenommenen Antioxidantien angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass es die ROS-induzierte Bildung von Lipidperoxidradikalen hemmt und somit weitere Lipide, sowie Proteine und DNA vor schädlichen oxidativen Einflüssen schützen kann [143, 145, 146].  $\alpha$ -Tocopherol wirkt als direkter Radikalfänger, dabei wird es selbst zu einem Radikal, das durch die Mesomeriestabilisierung des ungepaarten Elektrons relativ reaktionsträge ist [136].

Ascorbinsäure oder Vitamin C ist ein hydrophiles Vitamin. Vitamin C wirkt als reduzierendes Reagens, es wird leichter oxidiert als die meisten anderen Substanzen und kann diese so vor Oxidation schützen. Daneben reagiert es mit dem  $\alpha$ -Tocopherol-Radikal, wodurch es selbst zum Vitamin C-Radikal wird,

während das  $\alpha$ -Tocopherol regeneriert wird. Das Vitamin C-Radikal ist nicht reaktiv, da sein ungepaartes Elektron energetisch stabil ist. Durch GSH wird das Vitamin C-Radikal in Vitamin C umgewandelt [143].

Vitamin A (Retinol) und seine in der Nahrung häufig vorkommenden Vorstufe  $\beta$ -Carotin sind bekannte Antioxidantien, dennoch weisen Studien, besonders in Kombination mit Rauchen, auf ein erhöhtes Krebsrisiko bei Monotherapie hin [147]. Generell ist zu den positiven Wirkungen antioxidativer Vitamine zu sagen, dass sie sich in Kombination, wie sie in Obst und Gemüse natürlich vorkommen, besser entfalten als in Monotherapie.

### 4.2.2.3 *Metallchelatoren*

Die antioxidative Aktivität von Metallchelatoren, wie EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), beruht auf den gleichen Prinzipien, derer sich endogene Speicher- und Transportproteine bedienen. Durch Komplexierung von Metallionen schützen sie vor deren schädlichen Effekten, vor allem der Bildung von  $\text{OH}^\bullet$  [133, 143].

### 4.2.2.4 *Antioxidantien pflanzlicher Herkunft*

Viele Sekundärpflanzeninhaltsstoffe wirken antioxidativ und bieten den Pflanzen Schutz vor zerstörerischen Umwelteinflüssen. Die bekanntesten, Flavonoide, gelten erwiesenermaßen als sehr wirksame Radikalfänger in vitro und in vivo, indem sie  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $\text{HOCl}$  und teilweise  $\text{O}_2^{\bullet-}$  abfangen können [148]. Viele Flavonoide können mit Cu- oder Fe-Ionen Chelate bilden und so deren pro-oxidative Eigenschaften unterdrücken [148, 149]. Neben solchen unspezifischen Effekten können Flavonoide teilweise über spezifische Interaktionen mit Enzymen und anderen Biomolekülen antioxidativ wirken [150]. Auch andere Polyphenole wirken auf ähnliche Weise antioxidativ wie Flavonoide, dazu zählt das hydroxylierte Stilbenderivat Resveratrol [151].

Wie bei der Gabe von allen pharmakologisch aktiven Stoffen, ist die richtige Dosierung für die Wirkung enorm bedeutsam. In zu geringen Dosen wirkt der Stoff nicht, in zu hohen Dosen schadet er dem Organismus. Dies trifft auch auf Antioxidantien zu. Der Redoxhaushalt eines Organismus unterliegt einer sehr feinen Regulierung. Kleine Veränderungen haben große Auswirkungen. So ist die Supplementierung von Antioxidantien sehr vorsichtig zu genießen, da sie genauso viel Schaden wie Nutzen bringen kann [128].

Einen Überblick über einige wichtige Antioxidantien und deren Wirkmechanismus bietet Tabelle 1.

	Antioxidans	Wirkung	Besonderheiten
<b>Enzyme</b>	Superoxiddismutase (SOD)	$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	enthält je nach Vorkommen Mangan oder Kupfer und Zink [138]
	Katalase	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow + \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	Tetrameres Hämprotein, kommt vor allem in Peroxisomen vor [152]
	Glutathionperoxidase (GPx)	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{LOH}$	enthält Selen, Regeneration von Glutathion (GSH) über Glutathionreduktase [99]
	Peroxiredoxine (Prx)	Abbau von $\text{H}_2\text{O}_2$	Cystein als katalytisches Zentrum, Regeneration über Thioredoxinreduktase [139, 140]
<b>Vitamine</b>	$\alpha$ -Tocopherol	Baut $\text{LOOH}$ , $\text{OH}^{\cdot}$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ ab, unterbricht Lipidperoxidation	Fettlösliches Vitamin [145, 146]
	$\beta$ -Karotin	baut $\text{OH}^{\cdot}$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ ab, bindet an Metallionen, hemmt Oxidation von Vitamin A	Fettlösliches Vitamin
	Ascorbinsäure	Reduzierendes Agens, baut $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{OH}^{\cdot}$ und $\text{O}_2^{\cdot-}$ ab, Regeneration von $\alpha$ -Tocopherol	Wasserlösliches Vitamin [143, 146]
<b>Sonstige</b>	Transport- und Speicherproteine für Metallionen	binden Fe- und Cu-Ionen,	Endogene Proteine [141]
	Metallchelatoren (EDTA)	verhindern die Bildung von $\text{OH}^{\cdot}$	Komplexbildner [143]
	Pflanzliche Polyphenole	divers: meist Radikalfänger, Interaktion mit antioxidativen Enzymen	Flavonoide, hydroxylierte Stilbenderivate, u.a. [148, 150]

Tabelle 1: Einteilung wichtiger Antioxidantien, modifiziert nach Fisher, 1988

## 5 Resveratrol

### 5.1 Allgemeines

Resveratrol ist ein Polyphenol, das erstmals 1940 aus den Wurzeln von *Veratrum grandiflorum* (O. Loes) isoliert wurde [153] und später auch in einer großen Anzahl weiterer Pflanzen (u.a. Weintrauben, Maulbeeren und Erdnüssen) nachgewiesen werden konnte. Da die Biosynthese von RV nach Verletzungen, UV-Strahlung und Pilzinfektionen erhöht wird, wird es als Phytoalexin klassifiziert [151].

Erste Hinweise auf positive pharmakologische Effekte ergaben sich 1963 mit der Identifizierung von RV als dem wirksamen Bestandteil von *Polygonatum cuspidatum*, einer in der traditionell chinesischen Medizin verwendeten Pflanze [154]. 1976 wurde das Vorkommen von RV in Weintrauben entdeckt [155]. Die Biosynthese erfolgt in der Blattepidermis, sowie in der Haut der Weintrauben [156]. Nachdem im Zuge der Herstellung von Weißwein die Haut nicht fermentiert wird, findet sich RV in nennenswerten Mengen nur im Rotwein (2 - 40  $\mu\text{M}$ ) [157]. Mit der Isolierung aus Rotwein 1992 [158] kam das Molekül ins öffentliche Interesse, da ihm ein gewisser Beitrag zum sogenannten „französischen Paradoxon“ zugeschrieben wird [159].

### 5.2 Vielseitige pharmakologische Eigenschaften

RV werden viele, teils sehr diverse pharmakologische Eigenschaften zugeschrieben. Eine Auswahl davon wird hier genauer beschrieben.

#### 5.2.1 Antioxidative Eigenschaften

RV wirkt als freier Radikalfänger und als Modulator auf die Aktivität einiger antioxidativer Enzyme [135]. Die Radikalfängereigenschaften von RV sind etwa denen der Flavonoide Quercetin und Epicatechin gleichzusetzen [160].

Durch seine Hydroxylgruppen kann RV ein Radikal bilden, das durch die Delokalisation von zwei Elektronen über die beiden aromatischen Ringe, sowie die verbindende Methylenbrücke stabilisiert wird [161]. Die para-Hydroxylgruppe weist stärkere Radikalfängereigenschaften als die beiden meta-Hydroxylgruppen auf [160].

In VSMC konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit Resveratrol zu einem Anstieg von antioxidativen Enzymen wie SOD, Katalase, Glutathion, Glutathion-Reduktase, GPx, Glutathion-S-transferase und NADPH-Quinon-Oxidoreduktase führt [162]. Dies bedeutet eine gesteigerte antioxidative Abwehr der Zelle.

RV fördert die NO-vermittelte Vasorelaxation. Es reduziert die Bildung von  $H_2O_2$  [163] und führt zur Reduktion der ROS-Konzentration [2].  $O_2^-$  sind die Gegenspieler von NO, indem sie es zu Peroxynitrit inaktivieren und damit die vasorelaxierenden Eigenschaften unterdrücken [161].

In HL 60 Zellen (eine Zelllinie aus Promyelozyten einer Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie) konnte gezeigt werden, dass RV die Entstehung von freien Radikalen nach TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat)-Behandlung dosisabhängig unterbinden kann ( $ED_{50}=27\mu M$ ) [164]. Des Weiteren konnte in, mit DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracen) behandelten *Salmonella typhimurium* TM677-Zellen, die antimutagenen Eigenschaften von RV bewiesen werden [164].

RV kann kupfer-induzierte Oxidationen effektiver hemmen als die meisten Flavonoide, indem es Kupferionen durch Chelatbildung abschirmt. Nachdem LDL-Partikel eine hohe Affinität zu Kupfer haben und deren Anwesenheit mit vermehrter LDL-Oxidation in Verbindung gebracht wird, kann RV oxLDL-Bildung hemmen [165]. Für die Interaktion mit Kupfer ist das trans-RV dem cis-Isomer vorzuziehen [166].

Neben der Inhibierung der  $Cu^{2+}$ -induzierten oxLDL-Bildung, übt RV über Proteininteraktionen positive Effekte auf den Lipidstoffwechsel aus. Durch seine Lipophilie kann sich RV an die Lipidreste von LDL anlagern, aber auch mit dessen Proteinkomponenten interagieren. Durch eine Anlagerung an die apoB Domäne, die für die Rezeptorbindung wichtig ist, könnte RV die unspezifische Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen eindämmen [161, 167].

RV ist nicht nur in der Lage die schädlichen Effekte von ROS zu vermindern, sondern auch teilweise die von RNS. So kann RV LDL-Modifikationen durch Peroxynitrit unterbinden [168]. In LPS-stimulierten Makrophagen verminderte die Vorbehandlung mit RV die NO-Produktion durch *Down-Regulation* der iNOS (Induzierbare NO-Synthase) [169].

Dabei ist jedoch im Auge zu behalten, dass RV als redox-aktive Substanz neben seinen anti-oxidativen auch pro-oxidative Effekte induzieren kann [135].

### 5.2.2 Pro-apoptotische und zellzyklushemmende Eigenschaften

RV wirkt hemmend auf die MAPK-Kaskade. Es kann die Aktivierung einiger Kinasen wie Src unterdrücken [170]. So führt RV in Koronararterien von Schweinen zu einer Hemmung der Tyrosinphosphorylierung von Erk1/2, JNK und p38 ( $IC_{50}=37\mu M$ ), wodurch die Expression verschiedener Gene, die mit Vasokonstriktion, Angiogenese, Proliferation und Differenzierung in Zusammenhang gebracht werden, unterbunden wird [171]. Über die RV-vermittelte Hemmung von Erk, JNK und p38 scheint p53 phosphoryliert und somit Apoptose eingeleitet zu werden [172].

RV zeigt deutliche Effekte auf die PI3K/Akt-Kaskade. Die Insulin-induzierte Aktivierung der PI3K kann durch RV gehemmt werden ( $IC_{50} = 25 \mu M$ ) [173]. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der PI3K im Hinblick auf die Effekte von RV liefert die Tatsache, dass auch die Insulin-induzierte Phosphorylierung von Akt durch Wortmannin, einem PI3K-Inhibitor, genauso wie durch RV gehemmt wird [2]. Die Hemmung der Phosphorylierung von Akt konnte in vielen Krebszellen gezeigt werden, wie in humanen unterinären Krebszellen [174], in LNCaP Zellen [175], in humanen Myelomzellen [176] und in humanen Blasenkrebszellen T24 [177]. In humanen Gliomzellen U251 wurde neben einer Minderung der Phosphorylierung von Akt auch eine Reduktion der Expression gezeigt [178]. Die durch RV reduzierte Aktivität von Akt zeigte sich in MCF-7 Zellen vor allem in einer erhöhten Aktivität der Kaspase-9 [179].

Haider et al. konnten einen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung von Akt in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten feststellen. RV ist in der Lage den Ang II-vermittelten Anstieg der Phosphorylierung von Akt zu hemmen und somit auch eine Ang II-induzierte Hypertrophie zu vermindern [180]. Das geschieht durch die RV-vermittelte Hemmung der Phosphorylierung von  $p70^{S6K}$ , ein Schritt, für den die Aktivierung des Akt und Erk-Signalings wichtig ist [180].

Abgesehen von Proteinen, die für die Weiterleitung von Signalen wichtig sind, beeinflusst RV auch Transkriptionsfaktoren, die in weitere Folge die Genexpression steuern. Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion von RV mit der NF $\kappa$ B-Kaskade, dessen Aktivierung die Transkription diverser Gene steuert, die in inflammatorische Prozesse, Cancerogenese sowie in die Pathogenese von Atherosklerose involviert sind [161, 181]. NF $\kappa$ B liegt in seiner inaktiven Form im Cytoplasma als Komplex mit I $\kappa$ B vor. Durch Stimuli wie oxLDL und ROS wird die I $\kappa$ B Kinase (IKK) aktiviert. Diese phosphoryliert I $\kappa$ B, das daraufhin degradiert wird. In der Folge wird NF $\kappa$ B freigesetzt, das in den Nukleus transloziert und an spezifische  $\kappa$ B-DNA-Motive bindet und bestimmte Zielgene (z.B. Cytokine, COX, iNOS) transaktiviert. Als freier Radikalfänger und Hemmer der PKC kann RV die stimuli-vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B sowie die Aktivierung von IKK $\alpha$  unterdrücken [169, 182, 183].

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch RV gehemmt wird, ist das Aktivator Protein-1 (AP-1), das sich aus c-fos und c-jun zusammensetzt [183-186]. Diese Hemmung ist durch RV-vermittelte Unterdrückung der Src- und der MAPK-Kaskade-Aktivierung zurückzuführen [183, 187]. Durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren durch RV resultiert die verminderte Genexpression von iNOS sowie COX-2 [161, 169, 185, 188].

RV kann den Zellzyklus in der G1 Phase hemmen. In HL 60 Zellen konnte gezeigt werden, dass RV den Einbau von  $^{14}C$ -Cytidin unterdrückt, ein Mechanismus der in der Hemmung der Ribonukleotid Reduktase (RR), einem wichtigen Faktor für die de novo DNA-Synthese [189], begründet liegt. Diese Hemmung der RR ist auf Radikalfängereigenschaften von RV zurückzuführen, die mit einem Tyrosinradikal auf der R2-30

Untereinheit von RR interagieren [190]. Einen weiteren hindernden Effekt auf die de novo DNA Synthese stellt die RV-vermittelte Hemmung der replikativen DNA-Polymerase dar [191, 192]. RV kann Zellen von einem reversiblen G0/G1 Zellzyklusarrest in einen irreversiblen hin zur Apoptose lenken [49].

Survivin ist ein Inhibitor von Apoptoseproteinen (IAP), die die Caspase 3 und 7, sowie die Aktivierung der Caspase 9 hemmen. In normalen Zellen wird Survivin nicht gebildet, jedoch wird es in den meisten Tumorzellen überexprimiert, wo es neben der Unterdrückung der Apoptose auch an der Regulation der Mitose beteiligt ist [193]. RV konnte in vitro und in vivo Survivin transkriptionell und posttranskriptionell *downregulieren* und somit Apoptose induzieren [194, 195].

Aus diesen Effekten ergibt sich der Einsatz von RV in der Chemotherapie. Nachdem gezeigt wurde, dass RV nicht nur zelluläre Überlebenssignale hemmt, sondern auch die Zellen für apoptotische Stimuli sensibilisieren kann und die chemotherapeutisch-induzierte Apoptose erleichtern kann, bietet RV einen hoffnungsvollen Ansatz als Adjuvans in der konventionellen Krebstherapie [196].

### **5.2.3 Antiinflammatorische Effekte und Hemmung der Plättchenaggregation**

RV kann dosisabhängig die Plättchenaggregation hemmen [197]. Diese Eigenschaft wird mit der Unterdrückung der Bildung von Eicosanoiden assoziiert. Das geschieht durch die Hemmung der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2. RV kann COX-1 und COX-2 durch direkte Interaktion inhibieren, sowie die vermehrte Expression von COX-2 auf transkriptioneller Ebene unterdrücken [185]. Ebenso wurde gezeigt, dass RV auch die Lipoxygenase hemmt, die wie COX proinflammatorische Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels bildet [198, 199]. Über die negative Regulierung der Freisetzung von NFκB wirkt RV auf eine weitere Weise antiinflammatorisch [182, 183].

### **5.2.4 RV als Anti-Aging Agens**

Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Molekül, durch die Entdeckung als *Anti-Aging*-Stoff, zuteil. RV ist als wirksames Antioxidans in der Lage oxidative Veränderungen an Proteinen, Lipiden und DNA zu verhindern, die mit Altern in Verbindung gebracht werden [108]. Neben diesen unspezifischen Mechanismen wurde gezeigt, dass RV ein Aktivator von SIRT1 ist [200]. SIRT1, das zu den Sirtuinen, einer Gruppe von NAD<sup>+</sup>-abhängigen Protein-Deacetylasen, zählt, wird mit vielen zellulären Prozessen in Verbindung gebracht, wie Chromatin Remodelling, transkriptionelles *Silencing*, Stabilität der Chromosomen, Metabolismus und Regulation des Zellzyklus [201, 202].

In vielen Organismen wurde gezeigt, dass eine verminderte Kalorienzufuhr Altern verlangsamen und die maximale Lebensdauer verlängern kann. Diese ausgedehnte Lebensspanne wird mit der Aktivierung von Sirtuinen durch die verringerte Kalorienaufnahme assoziiert [200]. In Säugetierzellen kommt SIRT1 vor.

Die Deacetylase wirkt antiapoptotisch, indem sie p53 negativ reguliert [203]. RV kann diesen Effekt einleiten [200]. Neben p53 werden weitere Proteine durch die Aktivierung von SIRT1 deacetyliert und verändern somit ihren Aktivitätsstatus. Beispiele hierfür wären FOXO (*Forkhead Box Class O*) [204], verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NFκB [203] und PPARγ-Coaktivator 1α [205].

Die lebensverlängernde Aktivität von RV als allosterischer Agonist von verschiedenen Sirtuinen wurde in *Saccharomyces cerevisiae* [200], *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* [206] und Ratten [207] nachgewiesen [202]. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht unumstritten [206].

### 5.2.5 RV als Phytoestrogen

Die strukturelle Ähnlichkeit von RV mit dem synthetischen Estrogen Diethylstilbestrol erklärt die Aktivität als Phytoestrogen und die Wirkung als selektiver Estrogen Rezeptor Modulator (SERM) [208, 209].

## 6 Resveratrol-Derivate

### 6.1 Chemische Struktur des Resveratrols

RV gehört zu den Stilbenderivaten. Ein Stilben ist ein Ethenmolekül, an dessen beiden Kohlenstoffatomen jeweils ein Phenylring hängt. In Abbildung 3 ist die chemische Struktur von RV dargestellt. Die Biosynthese von RV erfolgt aus Phenylalanin über den Shikimatweg [210]. RV liegt als cis- und trans-Isomer vor, wobei trans-RV sterisch bevorzugt ist, das in Abwesenheit von Licht relativ stabil ist [135].

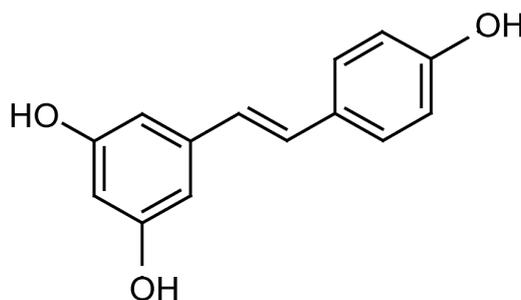


Abbildung 3: **Chemische Struktur von RV**

In der Natur konnten unterschiedlich hydroxylierte bzw. methoxylierte RV-Derivate nachgewiesen werden [151]. So wird RV, durch eine Cytochrom P450-katalysierte Reaktion, ins Piceatannol (3,3',4',5-Tetrahydroxystilben) und in zwei weitere Mono- und Dihydroxy-Stilbenderivate umgewandelt [211]. Ein weiteres natürlich vorkommendes Stilben-Derivat ist das in Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus*)

vorkommende Pterostilben (4'-Hydroxy-3,5-dimethoxystilben), dem einige Forschungsarbeit hinsichtlich seiner antifungalen, antioxidativen und antikanzerogenen Wirkung zu Teil wurde [212].

Insofern liegt der Gedanke nahe, auch andere methylierte Derivate hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität zu untersuchen. Zum einen, um die molekularen Wirkmechanismen hinter den Effekten besser zu verstehen, zum anderen um eventuell weitere aktive Stoffe zu finden. Besonders da bekannt ist, dass Methylierungen und ähnliche kleine Abänderungen, die mit einer Erhöhung der Lipophilie einhergehen, zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit führen können.

Für die biologische Aktivität von RV spielen die Anzahl und die Position der Hydroxylgruppen eine wichtige Rolle [213].

Untersuchungen der elektronischen Struktur und der thermodynamischen Stabilität verschiedener Phenoxyradikale wurden von Stivala et al. [191] mittels semiempirischer MO-Berechnungen durchgeführt. Die Phenoxyradikale leiten sich vom Verlust des Wasserstoffes der 3, 4' oder 5-Hydroxylgruppe ab. Beim 4'-Phenoxyradikal ist die Spindichte in der meta- und para-Position maximal und so kann die Spindichte über die Stilbendoppelbindung auf den anschließenden aromatischen Ring übergehen. Im Gegensatz dazu weist die Position zur Doppelbindung sowohl beim 3- als auch beim 5-Phenoxyradikal die geringste Spindichte auf. Dies erklärt, dass die Elimination des Wasserstoffes der 4'-Hydroxylgruppe bevorzugt ist, da sich daraus eine größere Resonanzstabilisierungsenergie ergibt [191].

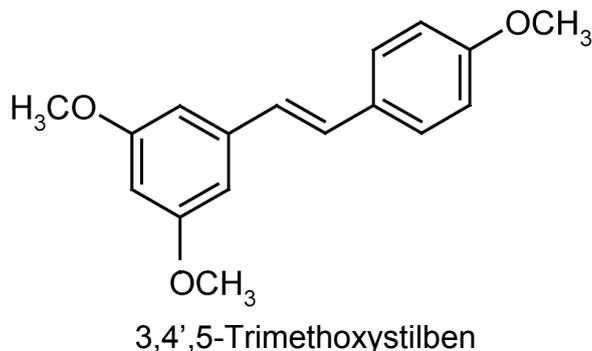
Der Vergleich der Radikalfängereigenschaften von RV mit 4-Hydroxystilben und 3,5-Dihydroxystilben ergab ein ähnliches Resultat. Das 4-Hydroxystilben ist bezüglich der Radikalfängereigenschaften dem RV gleichzusetzen, während 3,5-Dihydroxystilben deutlich geringere Effekte aufweist. Die para-Hydroxylgruppe scheint für die antioxidativen Eigenschaften von RV von größerer Bedeutung zu sein als die beiden meta-Hydroxylgruppen [160, 214]. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Anzahl der Hydroxylgruppen an einem Stilben-Derivat positiv mit dessen antioxidativen Eigenschaften korreliert. Jedoch wurden in diesem Fall nur Derivate getestet, die an Position 4' hydroxyliert waren [49].

## 6.2 TMRV

(E)-3,4',5-Trimethoxystilben (TMRV) ist eine Abwandlung des RV, bei dem alle drei Hydroxylgruppen durch Methoxygruppen ersetzt wurden (Abbildung 4). Die Synthese erfolgte in der Arbeitsgruppe um Prof. Erker (Department für Pharmazeutische Chemie, Universität Wien). Dieses Derivat weist weder antioxidative noch antiproliferative Eigenschaften auf [191]. Jedoch gibt es Studien, die auf antikanzerogene Effekte schließen lassen [211, 215]. Während die zellzyklushemmenden Effekte von

RV in einem Arrest in der G1 Phase begründet liegen, scheint TMRV den Zellzyklus in der G2/M Phase zu behindern [216]. Dies könnte auf die Hemmung der Tubulinpolymerisation zurückzuführen sein [217].

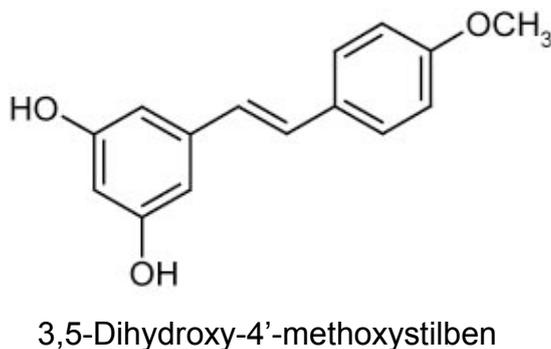
Abbildung 4: **Chemische Struktur von TMRV**



### 6.3 R1

(E)-3,5-Dihydroxy-4'-methoxystilben (R1) wurde ebenfalls von der Gruppe um Prof. Erker synthetisiert. Bei diesem Derivat ist die Hydroxylgruppe in der 4'-Position methyliert, wohingegen, die Hydroxylgruppen am anderen Phenylring unverändert sind (Abbildung 5). Nachdem die para-Hydroxylgruppe, die stärker zu den antioxidativen Eigenschaften von RV beiträgt, als die meta-Hydroxylgruppen, durch eine Methylierung abgeschirmt wird, besitzt dieses Molekül weit geringere antioxidative Aktivität als RV [214]. Laut den Ergebnissen von Stivala et. al. [191] gehen neben den antioxidativen auch die zellzyklushemmenden Effekte von RV auf die 4'-Hydroxylgruppe zurück, dementsprechend hat R1 keine Effekte auf den Zellzyklus [191].

Abbildung 5: **Chemische Struktur von R1**

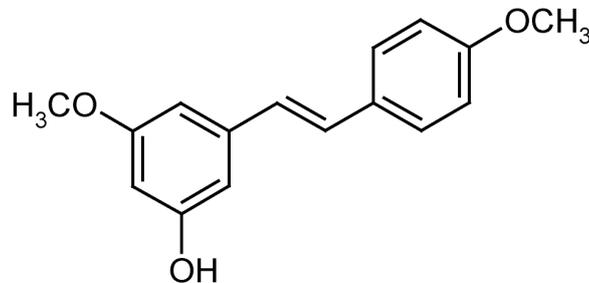


### 6.4 R2

(E)-3-Hydroxy-4',5-dimethoxystilben (R2) ist eine Abwandlung des RV, dessen 4'-Position gleich dem R1 methyliert ist. Zusätzlich ist am zweiten Phenylring eine der beiden Hydroxylgruppen durch eine Methoxygruppe ersetzt (Abbildung 6). Zu diesem ebenfalls von der Gruppe von Prof. Erker synthetisierten Derivat gibt es hinsichtlich seines Vorkommens und seiner biologischen Aktivität bislang

noch keine Publikationen. Den obigen Erkenntnissen zufolge sollte dieses Molekül jedoch kaum antioxidativ wirken.

Abbildung 6: Chemische Struktur von R2



3-Hydroxy-4',5-dimethoxystilben

## 7 Ziel der Arbeit

Haider et al. [180] zeigten, dass RV die Ang II- und EGF-induzierte Aktivierung des Signalmoleküls Akt hemmen kann. Der molekulare Mechanismus, der diesem Effekt zugrundeliegt ist jedoch noch unklar. Es gibt viele Hinweise, dass EGF- und vor allem Ang II-aktivierte Signalwege auf reaktive Sauerstoffspezies als *Second Messenger* angewiesen sind. Nachdem RV bewiesenermaßen antioxidativ wirkt, wollten wir untersuchen, ob und inwieweit die antioxidative Aktivität des Moleküls zu den inhibitorischen Effekten auf die Akt-Phosphorylierung beiträgt.

RV ist ein Stilbenderivat mit drei Hydroxylgruppen, die für dessen antioxidative Eigenschaften von Bedeutung sind. So wird die Hydroxylgruppe in Position 4' als essentiell für die ausgeprägte antioxidative Aktivität des Moleküls angesehen [214]. Im Rahmen dieses Projekts wurden drei redox-inaktive RV-Derivate untersucht, deren Hydroxylgruppen unterschiedlich methyliert sind. Das Ziel war es nun mit Hilfe dieser RV-Derivate herauszufinden, ob und wenn ja welche Hydroxylgruppen für die Hemmung der Akt-Phosphorylierung ausschlaggebend sind. Um Rückschlüsse auf die Bedeutung der antioxidativen Aktivität von RV im Zusammenhang mit seinen inhibitorischen Effekten auf Ang II- und EGF-vermittelte Signalwege ziehen zu können, wurden die RV-Derivate auch hinsichtlich ihrer antioxidativen Eigenschaften getestet.



## III Material und Methoden



### III Material und Methoden

#### 1 Zellkultur

##### 1.1 Isolierung

Die glatten Muskelzellen wurden aus den thorakalen Aorten männlicher *Sprague Dawley* Ratten isoliert. Die Aorten wurden entfernt und mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Anschließend wurden sie von Bindegewebe befreit, aufgeschnitten und für 15 Minuten bei 37°C in Aufschluss Puffer inkubiert, bevor man Endothelium und Adventitia entfernte. Die Media wurde zerkleinert und für weitere 4 Stunden in Aufschlusspuffer inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten, 230 g, 25°C) und in 25 cm<sup>2</sup> Mediumflaschen mit Wachstumsmedium überführt.

Mit Hilfe eines monoklonalen *Anti- $\alpha$ -smooth muscle Actin* FITC-konjugierten Antikörper konnten die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie als glatte Muskelzellen charakterisiert werden.

PBS <sup>+</sup>		Aufschlusspuffer	
NaCl	7,2 g	Kollagenase (246 U/mg)	0,1 g
KCl	0,2 g	HEPES	0,24 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g	Ascorbinsäure	0,005 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	Gentamicin-sulfat	0,005 g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g	Ham's F12 Medium (Pan™)	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g		
Aqua bidest.	ad	1000 ml	

##### 1.2 Kultivierung

Die Zellen wurden in Phenolrot-freiem *Dubelcco's modified Eagle's* Medium, dem 10 % Kälberserum (CS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugefügt worden waren (alle Reagenzien von Lonza Group Ltd.), in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die VSMC passagiert, wobei eine Konfluenz von 90% nicht überschritten wurde.

Um die Zellen zu passagieren wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, und im Anschluss mit Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) für 3-4 Minuten inkubiert. Damit sich die Trypsinierung

nur auf die Auflösung des *Zellmonolayers* beschränkt und nicht zur Zerstörung der einzelnen Zellen führt, wurde die Reaktion mit Wachstumsmedium abgestoppt und anschließend zentrifugiert (4 Minuten bei 230 g). Mit Hilfe des ViCell Counter wurde die Zellzahl bestimmt und dementsprechend in ausreichend Medium die benötigte Menge an Zellen ausgesät. Für Experimente wurden die Passagen 7-14 verwendet.

Experimente wurden bei einer Konfluenz von etwa 70 % durchgeführt, wobei die Zellen 24 Stunden davor mit Hungermedium, das im Unterschied zum Wachstumsmedium lediglich 0,1 % CS enthält, versetzt wurden. Zwei Stunden vor dem Versuch wurde das Hungermedium nochmals gewechselt, um Zellabfall in der Probe möglichst zu vermeiden.

### Wachstumsmedium

DMEM	500 ml
CS	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

### Hungermedium

DMEM	500 ml
CS	0,1 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

### PBS pH 7,4

NaCl	7,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,48 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,43 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

### Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin	0,5 g
EDTA	0,2 g
PBS	ad 1000 ml

### 1.3 Einfrieren und Auftauen

Um die VSMC einzufrieren, wurden Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup> Mediumflasche trypsinisiert, zentrifugiert und in 4°C kaltem *Freezing*-Medium (1,1 ml DMSO, 8 ml DMEM, 2 ml Kälberserum) suspendiert. 1 ml Aliquots, die in etwa 1x10<sup>6</sup> Zellen enthalten, wurden in *Cryovials* zuerst für 24 Stunden bei -20°C, dann für 3-4 Tage bei -80°C eingefroren und schlussendlich bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte, indem die *Cryovials* kurz im Wasserbad vorgewärmt und danach in auf 37°C gewärmten Wachstumsmedium suspendiert wurden. Um das *Freezing*-Medium, das DMSO enthält, zu entfernen, wurde zentrifugiert und erneut Wachstumsmedium zugesetzt.

## **1.4 Aufbewahrung der Lösungen**

### **1.4.1 Lösungen in der Zellkultur**

Media sowie sonstige Lösungen, die in der Zellkultur verwendet wurden, wurden bei 4°C gelagert (DMEM, Wachstumsmedium, Hungermedium, PBS, PBS<sup>+</sup>), *Aliquots* zur Bereitung der Media bei -20°C (CS, Antibiotikamix, Glutamin, Trypsin/EDTA-Lösung). Das Kälberserum wurde vor dem Aliquotieren für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

### **1.4.2 Versuchslösungen**

#### Ang II

Ang II (Sigma) wurde in 0,25 %-BSA Lösung gelöst und als 2 mM Stammlösung bei -80°C gelagert. Diese wurden mit 0,25 %-BSA Lösung zu 20 µM *Working Aliquots* verdünnt, die bei -20°C aufbewahrt wurden. Für Experimente wurde eine Ang II-Konzentration von 100 nM gewählt.

#### EGF

Die Konzentration der Stammlösung von EGF (Upstate) in PBS war 100 µg/ml und wurde bei -20°C aufbewahrt. Als Versuchskonzentration verwendete man 100 ng EGF/ml.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

30 % Wasserstoffperoxid (Sigma) wurde bei 4°C gelagert. Für die Experimente wurden Konzentrationen von 100 nM bis 10 mM verwendet.

#### Resveratrol

Die Stammlösung von RV (Sigma), 100 mM in DMSO, wurden bei -80°C gelagert, die *Working Aliquots* von je 10 µl gleicher Konzentration bei -20°C. Experimente wurden mit einer Konzentration von 50 µM durchgeführt.

#### TMRV

Eine 100 mM Stammlösung in DMSO wurde von TMRV, das von der Gruppe von Prof. Erker (Department für Pharmazeutische Chemie, Universität Wien) synthetisiert wurde, hergestellt, die in 10 µl *Aliquots* bei -20°C gelagert wurden. Die Testkonzentration betrug 50 µM.

R1, R2

Auch diese beiden Substanzen wurden von der Gruppe von Prof. Erker synthetisiert und in analoger Weise wie RV und TMRV verdünnt, gelagert und für Experimente verwendet.

## 2 Western Blotting

### 2.1 Probenvorbereitung/ Proteinlysate

Die Zellen wurden in 60 mm Petrischalen kultiviert, so dass sie zum Zeitpunkt des Experiments eine Konfluenz von etwa 70 % erreichten. Da vielfach Wachstumseffekte untersucht wurden, war es notwendig, 24 Stunden vor Start der Experimente auf Kälberserum, das Wachstumsfaktoren enthält, im Medium weitgehend zu verzichten und dementsprechend in diesem Zeitraum die Zellen mit Hungermedium zu kultivieren. Die Zellen wurden 30 Minuten mit RV und seinen Analoga preinkubiert, bevor mit Ang II für 10 Minuten oder mit EGF für 5 Minuten stimuliert wurde [14].

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen auf Eis gekühlt und zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Petrischalen mit je 110 µl der vorbereiteten Lysepufferverdünnung für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zusätzlich zur chemischen Lyse wurden die Zellen nach Ablauf dieser Zeit mechanisch abgekratzt und die Lysate in Eppendorf-Gefäße überführt, die bei 16 000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurden. 95 µl wurden aus dem Überstand entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, von dem wiederum 5 µl zur Proteinbestimmung nach Bradford weggenommen wurden. Die restlichen 90 µl wurden mit 45 µl WB-Probenpuffer (1:3) versetzt. Nachdem die Lysate für 5 Minuten bei 95°C denaturiert wurden, konnten sie bei -20°C aufbewahrt werden.

#### Lysepuffer Stammlösung (pH 7,5)

		1x Lysepuffer	
HEPES	50 mM		
NaCl	50 mM		
NaF	50 mM	Stammlösung	4,3 ml
Na <sub>4</sub> HP <sub>2</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	10mM	PMSF (in Isopropanol)	50 µl
EDTA	5 mM	Complete™ 25x	202 µl
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM	Triton X-100 (10%)	500 µl
Aqua bidest.	ad	430 ml	

<b>WB-Probenpuffer (Stammlösung)</b>		<b>WB-Probenpuffer</b>	
Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)	37,5 ml	Stammlösung	850µl
SDS	6 g	2-Mercaptoethanol	150 µl
Glycerol	30 ml		
Bromphenolblau	15 mg		

## 2.2 Proteinquantifizierung

Mit Hilfe des *Bradford Assays* kann auf die Proteinmenge in den einzelnen Lysaten rückgeschlossen werden [218]. Die entnommenen 5 µl wurden mit 45 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und 10 µl davon in 96-well-Platten mit 190 µl Bradford-Reagenz versetzt. Mit Konzentrationen von 0-500 µg/ml BSA wurde auf gleiche Weise eine Standardreihe erstellt. Von den Proben sowie den Standards wurden jeweils Triplettbestimmungen durchgeführt. Nach 5-minütigem Inkubieren wurde die Extinktion bei 595 nm mit dem Tecan Sunrise™ Microplate Reader vermessen.

## 2.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine spezielle Elektrophoresetechnik angewandt und zwar die Natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [219]. Entsprechend der Größe der zu untersuchenden Proteine wurden 10 % Gele gegossen. In jede Tasche wurde die durch die Bradfordmessung ermittelte Menge an Lysat aufgetragen, um eine gleichmäßige Proteinverteilung von 20 µg zu erreichen.

<b>Trenngel (10% PAA)</b>		<b>Sammelgel</b>	
PAA (30 %)	5 ml	PAA (30 %)	1,28 ml
Aqua bidest.	6,1 ml	Aqua bidest.	5,25 ml
Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)	3,75 ml	Tris-HCl (1,25 M; pH 6,8)	0,75 ml
SDS (10 %)	0,15 ml	SDS (10 %)	75 µl
TEMED	15 µl	TEMED	15 µl
APS (10 %)	75 µl	APS (10 %)	75 µl

Die Elektrophorese wurde in dem Mini-PROTEAN™ 3 Cell System (BIO-RAD) bei einer konstanten Spannung von 100 V und mit folgendem Puffer durchgeführt.

**10x Elektrophorese-Puffer**

Tris- Base		30 g
Glycin		144 g
SDS		10 g
Aqua bidest.	ad	1000 ml

**1x Elektrophorese-Puffer**

10x Elektrophorese-Puffer		100 ml
Aqua bidest.	ad	1000 ml

**2.4 Western Blotting**

Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 90 Minuten in *Blotting*-Puffer. Dabei wurde ein Mini Trans-Blot™ Electrophoretic Transfer Cell System (BIO-RAD) verwendet.

**5x Blotting-Puffer**

Tris- Base		15,2 g
Glycin		72,9 g
Aqua bidest.	ad	1000 ml

**1x Blotting-Puffer**

5x Blotting-Puffer		200 ml
Methanol		200 ml
Aqua bidest.	ad	1000 ml

**2.5 Detektion**

Um unspezifische Bindungsstellen abzuschirmen, wurden die Membranen nach dem *Blotten* für eine Stunde in einer 5 %-Trockenmilchlösung in TBS-T blockiert.

**10x TBS-T (pH 8,0)**

Tris- Base		3 g
NaCl		11,1 g
Tween 20		1 ml
Aqua bidest.	ad	1000 ml

**1x TBS-T**

10x TBS-T		100 ml
Aqua bidest.	ad	1000 ml

Nach dem Waschen mit TBS-T (3x für 10 Minuten) wurde über Nacht bei 4°C mit einem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBS-T gewaschen und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem *Horseradish-Peroxidase*-konjugierten sekundären Antikörper

inkubiert. Hierauf wurde nach erneutem Waschen mit TBS-T eine ECL-Lösung zur Detektion der *Horseradish-Peroxidase*-markierten Antikörper frisch bereitet. Die Detektion wurde mit LAS-3000™ (Fujifilm) luminescent image Analyzer durchgeführt, die Auswertung 2D-densitometrisch mit dem Programm AIDA Image Analyzer (raytest). Nach der Detektion wurde mit 0,2 M NaOH der nicht mehr benötigte Antikörper entfernt.

### ECL-Lösung

Aqua bidest.	4,5 ml
Tris-Base (1 M; pH 8,5)	0,5 ml
Luminol (0,25 M in DMSO)	25 µl
p-Cumarsäure (90 mM in DMSO)	11 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 µl

Antikörper gegen	Quelle	Verdünnung	Anbieter
Phospho Akt S 473	Rabbit, pc	1:1000	New England Biolabs
Phospho Erk 1/2 Y 202/204	Rabbit, pc	1:1000	New England Biolabs
Phospho p38 Y 180/182	Rabbit, pc	1:1000	New England Biolabs
Phospho Shp-2 Y 542	Rabbit, pc	1:1000	New England Biolabs
Tubulin	Mouse, mc	1:1000	Santa Cruz
Rabbit IgG	Goat	1:1000	New England Biolabs
Mouse IgG	Goat	1:1000	Upstate

Tabelle 2: verwendete Antikörper

### 3 ROS-Messungen

#### 3.1 Intrazelluläre ROS-Messung mittels FACS

Durch Messung des Oxidationsproduktes von 2',7'-Dihydrochlorofluorescein-diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) kann auf die Menge an intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies rückgeschlossen werden [220]. Bei H<sub>2</sub>DCF-DA handelt es sich um einen Farbstoff, der biologische Membranen leicht durchdringen kann, in der Zelle werden die Acetatreste durch zelluläre Esterasen abgespalten, wodurch der Farbstoff seine Membrangängigkeit verliert. Es entsteht H<sub>2</sub>DCF, das durch Oxidation mittels ROS leicht in das fluoreszente 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) umgewandelt werden kann. Dieses Produkt kann durch Durchflusszytometrie detektiert werden.

Die Zellen wurden in 6-well-Platten zu einer Konfluenz von etwa 70 %, wie beschrieben, kultiviert. Das Hungermedium wurde entfernt und nach dem Waschen mit vorgewärmten HBSS-Puffer wurden die Wells mit ebensolchem versetzt. Im Anschluss wurden RV sowie die RV-Analoga zugesetzt und für 15 Minuten inkubiert. Unter Lichtausschluss wurde H<sub>2</sub>DCF (20 µM) zugesetzt und die Platten für weitere 15 Minuten im Inkubator belassen. Für 10 Minuten wurde mit Ang II stimuliert, danach wurde der Puffer mit den Versuchssubstanzen entfernt und die Zellen trypsiniert. Die Trypsinreaktion wurde mittels 2 %-BSA-Lösung abgestoppt und die entstandene Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und sofort vermessen. Bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm wurde mit dem FACSCalibur™ (BD) die Fluoreszenz vermessen, die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der geometrischen Mittelpunkte durch die CellQuest™ Pro Software.

#### HBSS-Puffer

NaCl	8,18g
KCl	0,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	19,75 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mg
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,18 g
MgSO <sub>4</sub>	97,5 mg
Glucose	1 g
HEPES	4,76 g
Aqua bidest.	ad 1000ml

#### FACS Puffer

NaCl	40,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,75 g
KCl	1,4 g
LiCl	2,15 g
NaN <sub>3</sub>	1,0 g
Na <sub>2</sub> EDTA	1,8 g
Aqua bidest.	ad 5000 ml

**2%-BSA-Lösung**

BSA		2 g
PBS	ad	100 ml

**3.2 Extrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Messung mittels Amplex Red™ Assay**

Dieser Assay beruht auf der Umwandlung des Amplex Red™ (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin, Invitrogen, CA, USA) in das fluoreszente Resorufin, die in der Anwesenheit von *Horseradish-Peroxidase* (HRP) und Wasserstoffperoxid stattfindet [221].

Die Zellen wurden in 24-well-Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert und 24 Stunden vor dem Experiment wurde das Wachstums- durch Hungermedium ersetzt. Zu Beginn des Experiments wurden die VSMC mit PBS gewaschen, um sie anschließend in KRPG Puffer, dem Amplex Red™-Reagens und HRP zugesetzt worden war, zu suspendieren. Um Verfälschungen des Ergebnisses vorzubeugen wurde möglichst unter Lichtausschluss gearbeitet. Nach der Pufferzugabe wurden die Zellen sogleich mit RV und den RV-Derivaten bei 37°C inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Wasserstoffperoxidkontrollen hinzugegeben, nach weiteren 15 Minuten mit Ang II für 10 Minuten stimuliert.

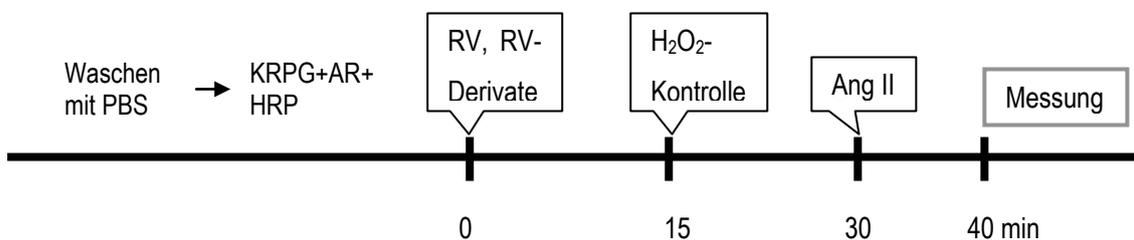


Abbildung 7: Stimulationszeiten für AR™ Assay

**KRPG-Puffer**

NaCl	1,45 mM
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5,7 mM
KCl	4,86 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,54 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,22 mM
Glucose	5,5 mM
Aqua bidest.	

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden aus den einzelnen Wells jeweils dreimal *Aliquots* entnommen und in 96-well-Platten zur Tripletbestimmung überführt. Die Fluoreszenz wurde mittels Tecan Sunrise™ Microplate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen.

In analoger Weise wurden die Versuche ohne Zellen durchgeführt. Aliquote Mengen KRPG Puffer wurden in 24-well-Platten gefüllt, teilweise mit RV und RV-Derivaten versetzt. 15 Minuten später wurde Wasserstoffperoxid zugegeben. Die Fluoreszenzmessung wurde ebenso als Tripletbestimmung in 96-well Platten durchgeführt.

## **4 Statistische Auswertung**

Alle statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad PRISM™ Software (GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Die Normalisierung der Daten erfolgte, indem die Ergebnisse der Proben, die mit Stimuli behandelt worden waren, 100% gesetzt wurden. Um Werte verschieden behandelter Proben zu vergleichen wurde die one-way ANOVA mit dem Dunnett post Test verwendet.

## IV Resultate



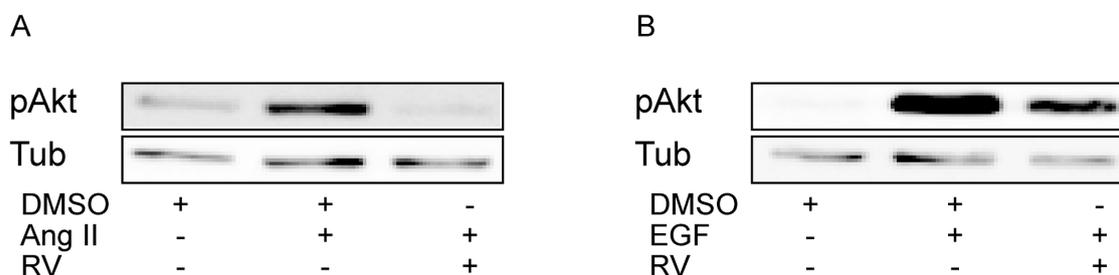
## IV Resultate

### 1 RV vermindert die Ang II- und EGF-vermittelte Akt-Phosphorylierung

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass RV nach 30-minütiger Präinkubation die Ang II- und EGF-induzierte Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase Akt deutlich reduzieren kann [44, 180]. Die Hemmung der Ang II- und EGF-induzierten Phosphorylierung konnte auch bei kürzeren Inkubationszeiten von RV, sogar noch bei Zugabe nach der Stimulation, demonstriert werden [2].

Das Ziel dieser Arbeit war es, die RV-vermittelte Hemmung der Akt-Phosphorylierung besser zu verstehen. Deshalb wurde dieser Effekt mit unseren Zellen und experimentellen Methoden nochmals verifiziert und in Abbildung 8 präsentiert.

Die Zellen wurden entweder für zehn Minuten mit 100 nM Ang II (A) oder für fünf Minuten mit 100 ng/ml EGF (B) stimuliert. Ang II führte zu einem zwei- bis vierfachen Anstieg der Akt-Phosphorylierung, der durch eine Vorbehandlung von 30 Minuten mit RV aufgehoben werden konnte. Teilweise war der phosphorylierte Anteil von Akt nach Stimulation und RV-Behandlung niedriger als bei Inkubation mit der Vehikelkontrolle DMSO. EGF-Stimulation bewirkte einen zehnfachen Anstieg, der zu 80% durch Inkubation mit RV verhindert werden konnte.



**Abbildung 8: RV hemmt die Ang II- und EGF-induzierte Phosphorylierung von Akt**

Die gehungerten Zellen wurden mit 50  $\mu$ M RV für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend (A) für 10 Minuten mit 100 nM Ang II oder (B) für 5 Minuten mit 100 ng/ml EGF. Die Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert. Es wurden Antikörper gegen pAkt und Tubulin als Ladekontrolle verwendet. 0,1 % DMSO diente als Vehikelkontrolle. Jeweils ein repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis ist abgebildet.

### 2 Antioxidative Eigenschaften von RV und seinen Derivaten

RV ist ein bekanntes Antioxidans [135, 222], eine Vielzahl der positiven pharmakologischen Eigenschaften dieses Moleküls werden seiner antioxidativen Aktivität zugeschrieben. Für die antioxidative Kapazität sind hauptsächlich die Hydroxylgruppen verantwortlich [191]. Deswegen wurden

unterschiedlich methylierte Derivate von RV hinsichtlich ihrer Wirkungsweise untersucht, um abzuschätzen, ob und inwieweit die antioxidativen Eigenschaften für die biologische Wirksamkeit Voraussetzung sind. Laut Literatur sollten die methylierten Derivate in ihrer antioxidativen Aktivität dem RV deutlich unterlegen sein, bzw. TMRV gar keine mehr zeigen [191].

Zur Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften der RV-Derivate wurden folgende Assays ausgewählt: Die intrazelluläre ROS-Konzentration wurde mit Hilfe von DCF und FACS ermittelt. Mit dem Amplex Red™ Assay wurde die extrazelluläre ROS Produktion gemessen.

## 2.1 Intrazelluläre ROS-Konzentration

Um die Menge an ROS innerhalb der Zelle zu messen, wurden diese mit dem leicht membrangängigen H<sub>2</sub>DCF-DA versetzt. In der Zelle kommt es durch intrazelluläre Esterasen zur Abspaltung der Acetatreste. Das so entstandene H<sub>2</sub>DCF kann die Zellmembran nicht mehr durchdringen. H<sub>2</sub>DCF kann durch ROS, insbesondere durch Wasserstoffperoxid leicht zum Fluoreszenzfarbstoff DCF oxidiert werden, der mittels FACS vermessen werden kann.

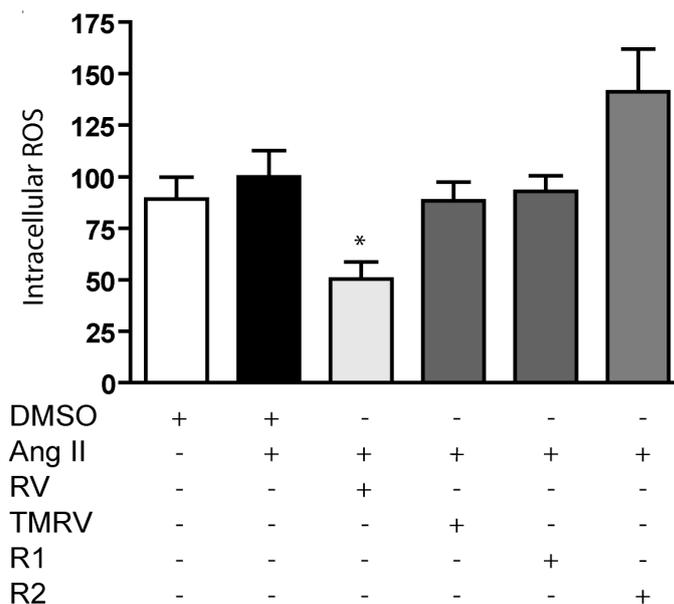


Abbildung 9: Effekte von RV und RV-Derivaten auf die intrazelluläre ROS-Konzentration

VSMC, die 24 Stunden vor Start des Experiments mit Hungermedium versetzt worden waren, wurden für 15 Minuten mit 20  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA in HBSS Puffer inkubiert. 15 Minuten zuvor (insgesamt für 30 Minuten) wurde bereits RV, TMRV, R1, R2 (50  $\mu$ M) oder 0,1 % DMSO zugesetzt. Anschließend wurde mit 100 nM Ang II für 15 Minuten stimuliert. Die Bildung von DCF aus H<sub>2</sub>DCF-DA, die mittels Durchflusszytometrie detektiert wurde, lässt auf die ROS-Produktion in der Zelle rückschließen. Die Graphen zeigen das durchschnittliche Fluoreszenzsignal aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ang II-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt (\*,  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA gegen Ang II-Behandlung).

Als Stimulus wurde Ang II (100 nM, zehn Minuten) verwendet. DCF (20  $\mu$ M) wurde 15 Minuten vor dem Stimulieren zugesetzt, RV sowie die RV-Derivate 30 Minuten vor der Ang II-Zugabe. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, weisen die Zellen an sich schon eine relativ hohe Konzentration an ROS auf, die nach Ang II-Stimulation leicht gesteigert wurde. RV war nicht nur in der Lage den Ang II-vermittelten Anstieg zu hemmen, sondern konnte das Fluoreszenzsignal um etwa die Hälfte im Vergleich zum Basallevel senken. Bei TMRV und auch bei R1 zeigte sich keine Erniedrigung des ROS-Levels, jedoch wurde bei R2 in diesem *Setting* ein Anstieg festgestellt.

## 2.2 Extrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration

Nachdem gezeigt wurde, dass die Aktivierung, auch die Transaktivierung, von EGFR zur Bildung von extrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in glatten Muskelzellen führt [93], bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Zellmembran sehr leicht durchdringen kann [99], wurde mittels Amplex Red™ Assays die Wasserstoffperoxidkonzentration ausserhalb der Zelle fluorometrisch bestimmt. Dieser Assay beruht auf der Oxidation von Amplex Red zum roten Farbstoff Resorufin, der durch Wasserstoffperoxid in der Gegenwart von *Horseradish-Peroxidase* stattfinden kann. Vermessen wurde in diesem Fall nur der Überstand der Zellen.

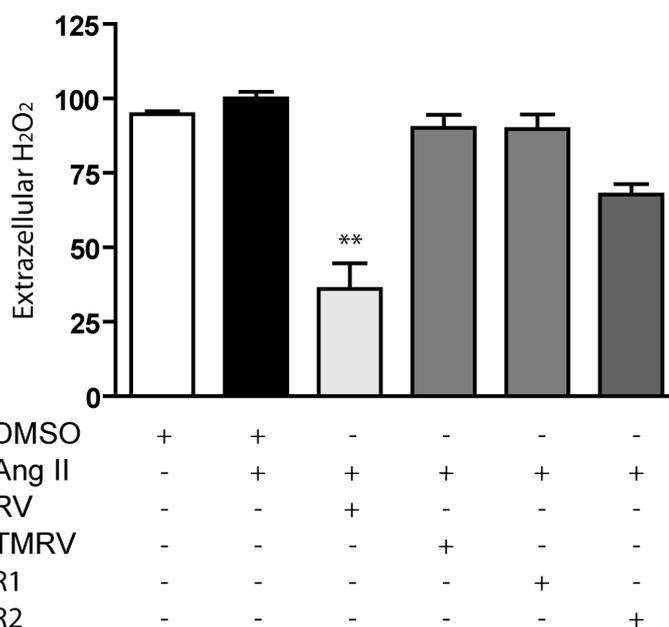


Abbildung 10: **Effekte von RV und RV-Derivaten auf die extrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration**

24 Stunden vor Start des Experiments wurden die VSMC mit Hungermedium versetzt. Die Zellen wurden 30 Minuten mit RV, TMRV, R1, R2 (jeweils 50  $\mu$ M) oder mit DMSO als Vehikelkontrolle in Amplex Red Puffer präinkubiert, bevor 10 Minuten mit 100 nM Ang II stimuliert wurde. Die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde mittels Fluorometer bestimmt. Die Graphen zeigen das durchschnittliche Fluoreszenzsignal aus vier unabhängigen Experimenten. Die Ang II-Stimulation wird als 100 % gewertet (\*\*,  $p < 0,01$ ; one way ANOVA gegen Ang II-Behandlung).

In VSMC lässt sich auch ohne Stimulation ein relativ hoher Basallevel an extrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachweisen. Trotz der bewiesenen Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zuge der Ligandenbindung an den EGFR [93], konnte in unserem *Setting* nach EGF-Stimulation kein Anstieg der extrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch die zehnmünütige Stimulation mit Ang II (100 nM) führte zu keinem signifikanten Anstieg. RV konnte bei einer Konzentration von 50 µM sowie bei einer Inkubationsdauer von 30 Minuten die extrazelluläre Wasserstoffperoxidkonzentration um mehr als die Hälfte im Vergleich dazu senken. TMRV und R1 zeigten keinen Einfluss, bei Behandlung mit R2 ist eine leichte nicht signifikante Reduktion zu erkennen (Abbildung 10).

*Amplex Red™ Assay ohne Zellen*

Der Assay wurde auch ohne Zellen durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass RV (50 µM) auch ohne Anwesenheit von Zellen extern zugeführtes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 µM) abbauen kann.

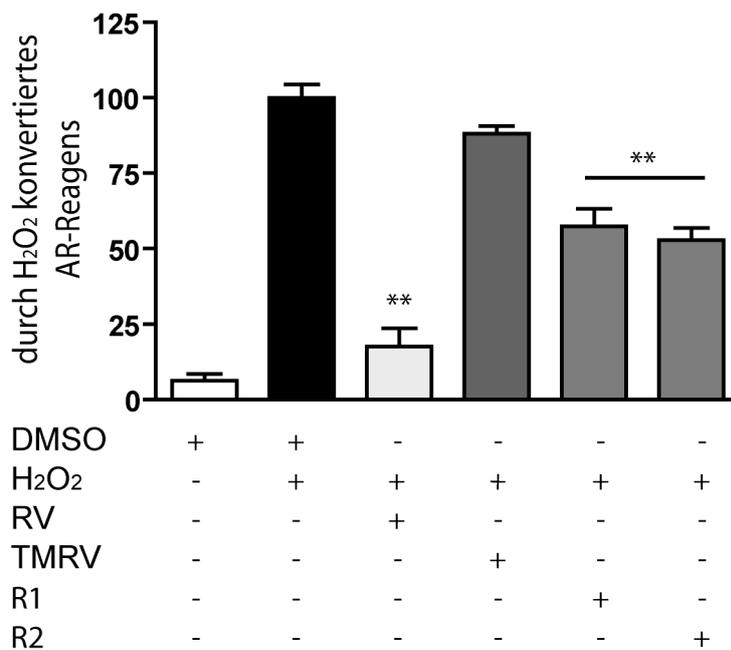


Abbildung 11: **Mögliche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abbauende Effekte von RV und RV-Derivate**

Dieses Experiment wurde ohne Zellen durchgeführt. Amplex Red Puffer wurde RV, TMRV, R1, R2 (50 µM) oder DMSO als Vehikelkontrolle zugesetzt. Nach 30 Minuten wurde für weitere 10 Minuten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 1 µM zugegeben. Im Anschluss wurde die relative Menge von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Fluorometer vermessen. Bei den unbehandelten Proben handelt es sich um Amplex Red Puffer mit DMSO als Vehikelkontrolle. Die Graphen zeigen das durchschnittliche Fluoreszenzsignal aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Zellen wurden als 100 % gewertet. (\*\*, p < 0,01; one way ANOVA gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung).

Auch in diesem Fall wurde nach Behandlung mit RV das geringste Fluoreszenzsignal detektiert. Das führt zu der Annahme, dass RV entweder mit einer Komponente des AR-Assays interferiert oder selbst in der Lage ist  $H_2O_2$  abzubauen. TMRV hat keinen Einfluss auf die  $H_2O_2$ -Konzentration, wohingegen R1 und R2 zu einer vergleichbaren Verminderung (ca. 40%) des Signals führen. Diese ist jedoch deutlich schwächer als die RV-vermittelte Reduktion, die 80% im Vergleich zu den mit  $H_2O_2$ - und DMSO-behandelten Zellen ausmacht (Abbildung 11).

### 3 Ergebnisse durch Western Blot Analyse

Zur Untersuchung der Signaltransduktionskaskaden in den VSMC und der Modulation durch RV und RV-Derivate wurden die Phosphorylierungen von verschiedenen Proteinen genauer betrachtet. Da die Signalweiterleitung sehr schnell erfolgt, wurden sehr kurze Stimulations- und Inkubationszeiten gewählt. Phosphorylierungen an Signalmolekülen führen zu Veränderungen in deren Aktivitätsstatus. So bedeutet die Phosphorylierung von Akt [223], p38, Erk1/2 [224] und Shp2 [71] deren Aktivierung.

Im Zuge dieser Arbeit wurden drei verschiedene Stimuli gewählt, die mit der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen, besonders hinsichtlich einer Vergrößerung der VSMC-Masse, in Verbindung gebracht werden. Ang II stellt einen hypertrophen Stimulus dar [16]. EGF ist als Wachstumsfaktor ein klassischer proliferativer Stimulus, der zu einer Aktivierung des Zellzyklus und somit zu vermehrter Teilung der Zellen führt [73]. Neben diesen beiden Stimuli, die im Endeffekt zu einem Zuwachs des Gewebes führen, wurde  $H_2O_2$  als Repräsentant für ROS verwendet. Sowohl Ang II- als auch einige EGF-vermittelte Signale werden als redox-sensitiv erachtet. So wurde gezeigt, dass die Überexpression von Katalase in VSMC zu einer Minderung der Ang II-induzierten Hypertrophie führt [61].

#### 3.1 Ang II-induzierte Effekte

Ang II ist ein potenter Vasokonstriktor, der großen Einfluss auf die Aktivität von glatten Gefäß-muskelzellen ausübt. Im Zuge dieses Projektes wurde für Ang II eine Stimulationszeit von zehn Minuten bei der *Western Blot* Analyse gewählt. In diesem Zeitraum kommt es noch zu keiner vermehrten Proteinsynthese, jedoch kommt es in diesen zehn Minuten, durch die Interaktion von Ang II mit dem  $AT_1R$ , zur Aktivierung von Signalkaskaden, die schlussendlich zu Hypertrophie führen. Diese Aktivierung lässt sich durch veränderte Phosphorylierung verschiedener Proteine nachweisen.

### 3.1.1 Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Akt

Wie schon zuvor erwähnt konnte unsere Arbeitsgruppe in früheren Publikationen belegen, dass RV die Ang II-induzierte Phosphorylierung und somit die Aktivierung des Proteins Akt unterdrücken, beziehungsweise abschwächen kann.

Akt, teilweise auch als Proteinkinase B bezeichnet, ist eine Serin/Threoninkinase, die ubiquitär exprimiert wird. Die Aktivierung erfolgt über PI3K durch Cytokine [225], Wachstumsfaktoren [92], Insulin [226] und Ang II [180]. Für die vollständige Kinaseaktivität dieses Proteins ist die Phosphorylierung von Threonin<sup>308</sup>, sowie von Serin<sup>473</sup> nötig [14, 223, 227]. Es wurde ein Antikörper verwendet, der sich gegen die Phosphorylierung von Serin<sup>473</sup> richtet.

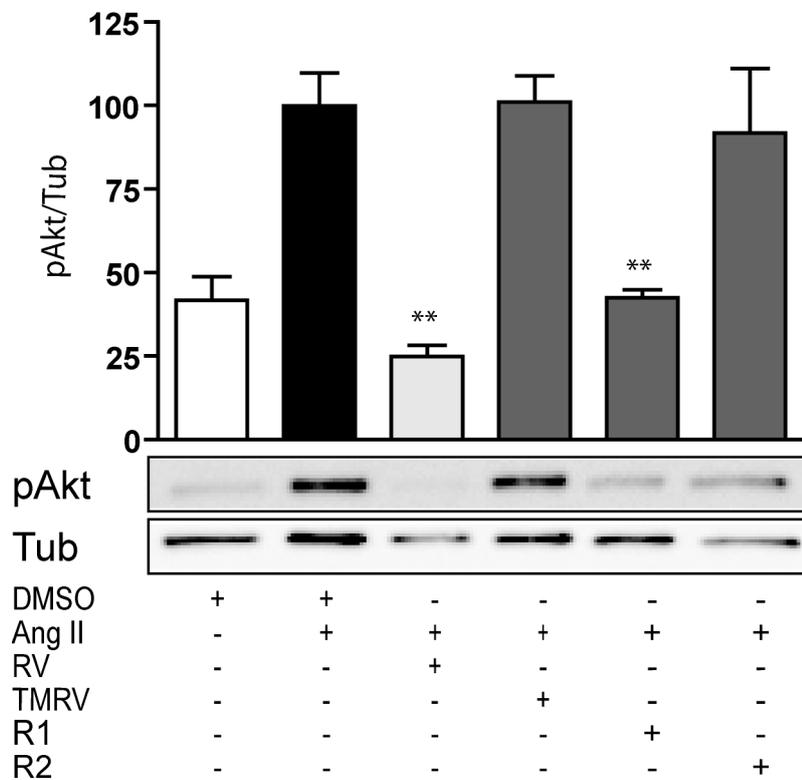


Abbildung 12: Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Akt  
 Die für 24 Stunden mit serumfreien Medium behandelten VSMC wurden 30 Minuten mit RV, TMRV, R1, R2 (50  $\mu$ M) oder 0,1 % DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 100 nM Ang II stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert (Antikörper gegen pAkt, Tubulin als Ladekontrolle), ein repräsentativer Blot ist abgebildet. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. Ang II-Stimulation wird als 100 % angenommen (\*\*,  $p < 0,01$ ; one-way ANOVA versus Ang II-Behandlung)

Abbildung 12 zeigt, dass RV in der Lage ist, die Ang II-induzierte Akt-Phosphorylierung zu hemmen, das Ausmaß der Phosphorylierung wird sogar noch unter jenes der Vehikelkontrolle reduziert.

Die RV-Derivate, die, wie zuvor beschrieben, teilweise als redox-inaktiv gewertet werden können, beziehungsweise deutlich geringere antioxidative Eigenschaften als RV aufweisen, zeigen recht unterschiedliche Effekte auf die Phosphorylierung von Akt. Das an allen drei Hydroxylgruppen methylierte TMRV kann den Ang II-vermittelten Anstieg nicht beeinflussen. Das an der 4'-Position methylierte R1, das, wie schon erwähnt, in den Assays bezüglich der antioxidativen Eigenschaften kaum Aktivität zeigte, konnte den Ang II-vermittelten Effekt hemmen, die verbleibende Phosphorylierung von Akt entspricht der unstimulierten Lösungsmittelkontrolle. Die Inkubation mit R2 zeigte keine Veränderung auf die Ang II-induzierte Akt-Phosphorylierung.

### **3.1.2 Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von p38**

Das zu den MAPK-Proteinen zählende p38 gilt als redox-sensitives Protein, das als Folge von zellulären Stress und unter Einfluss inflammatorischer Cytokine aktiviert wird [228]. Neben dieser redox-abhängigen Aktivierung führen auch wachstumsfördernde Signalwege zur Phosphorylierung von p38, sowie in weiterer Folge zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die für vermehrtes Wachstum verantwortlich gemacht werden. Es wurde gezeigt, dass die Ang II-induzierte Phosphorylierung von p38 durch intrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion vermittelt wird und zwar nicht alleine für die Ang II-induzierte Hypertrophie verantwortlich ist, jedoch entscheidend dazu beiträgt [61].

Wie in Abbildung 13 dargestellt, führte die zehnminütige Stimulation mit Ang II zu einem dreifachen Anstieg der Phosphorylierung von p38. Obwohl einige Antioxidantien in der Lage sind, eine vermehrte Phosphorylierung von p38 durch Ang II zu unterdrücken [61], zeigte das Antioxidans RV hier keinen Effekt. Auch die weitgehend redox-inaktiven RV-Derivate TMRV, R1 und R2 hatten keinen Einfluss auf die Ang II-vermittelte Phosphorylierung dieses Proteins.

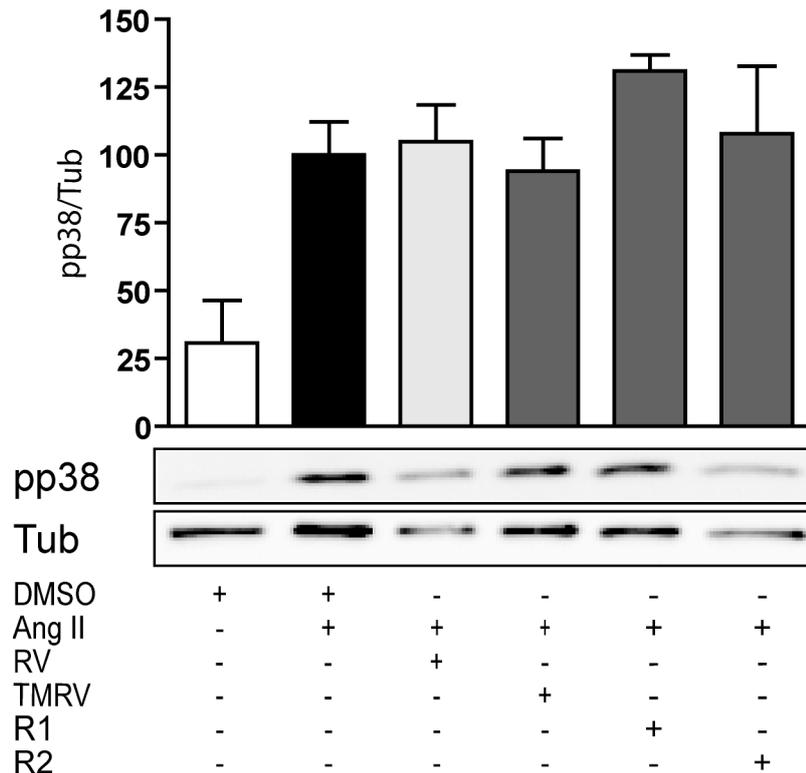


Abbildung 13: **Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von p38**  
 24 Stunden vor Start des Experiments wurden die VSMC mit Hungermedium versetzt. Anschließend wurde für 30 Minuten mit RV, TMRV, R1, R2 (50 µM) oder 0,1 % DMSO (Vehikelkontrolle) inkubiert. Die Stimulation erfolgte für 10 Minuten mit 100 nM Ang II. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert (Antikörper gegen pp38, Tubulin als Ladekontrolle), ein repräsentativer Blot ist abgebildet. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. Ang II-Stimulation wird als 100 % angenommen. Die statistische Analyse mittels one-way ANOVA ergab keine statistisch signifikante Abweichung der RV-, TMRV-, R1- oder R2-Inkubation gegenüber der Ang II-Stimulation.

### 3.1.3 Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Erk

Erk 1/2, auch als p42/p44 MAPK bezeichnet, zählt wie p38 zu den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Sie wird durch Wachstumsfaktoren und durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Agonisten aktiviert und spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und Differenzierung. Die Phosphorylierung von Erk führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie c-fos und ELK-1 [229]. Laut Literatur ist die Ang II-vermittelte Phosphorylierung in VSMC nicht abhängig von ROS [230], in anderen Zellsystemen mit anderen Stimuli wurde jedoch Gegenteiliges gesehen [61].

Die Phosphorylierung von Erk scheint für die Hypertrophie, die Ang II in glatten Muskelzellen verursacht, nötig zu sein [231], jedoch nicht allein. Es bedarf der Aktivierung weiterer Proteine wie p38 [61] und Akt [180].

Die 30-minütige Inkubation mit RV, TMRV, R1 oder R2 lässt keinen Effekt auf die durch Ang II gesteigerte Phosphorylierung von Erk erkennen (Abbildung 14). Gegenüber den nur mit DMSO behandelten Zellen wiesen die für zehn Minuten mit Ang II stimulierten Zellen eine fünffach stärkere Phosphorylierung von Erk auf.

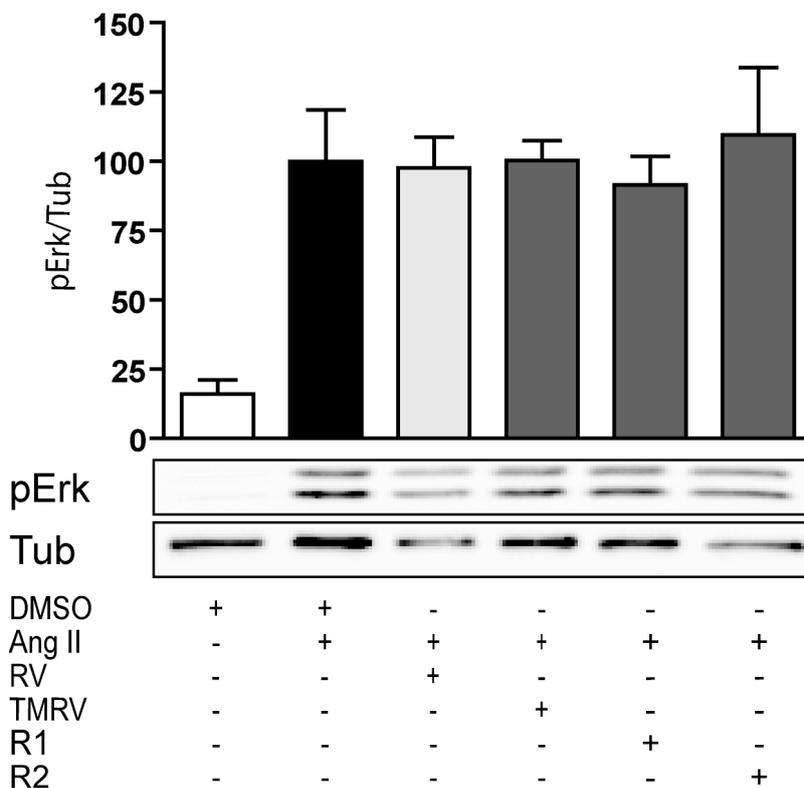


Abbildung 14: **Effekte von RV und RV-Derivaten auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Erk** VSMC, die 24 Stunden vor Start des Experiments mit Hungermedium versetzt worden waren, wurden für 30 Minuten mit RV, TMRV, R1, R2 (50  $\mu$ M) oder 0,1 %DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 100 nM Ang II stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert (Antikörper gegen pErk1/2, Tubulin als Ladekontrolle), ein repräsentativer Blot ist abgebildet. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. Ang II-Stimulation wird als 100 % angenommen. Die statistische Analyse mittels one-way ANOVA ergab keine statistisch signifikante Abweichung der RV-, TMRV-, R1- oder R2-Inkubation gegenüber der Ang II-Stimulation.

### 3.1.4 Effekte von RV und TMRV auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Shp2

Die Proteintyrosinphosphatase Shp2 ist maßgeblich an der Deaktivierung des PI3K/Akt-Signalweges beteiligt, indem es die p85-Bindungsstelle von Gab1 dephosphoryliert [43, 44].

Ang II kann die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von Shp2 induzieren [232]. Wie bei anderen PTP führt eine Oxidation des Thiolrestes zur Inaktivierung [120]. Es wurde gezeigt, dass RV Shp2 stärker aktiviert als alleinige Ang II-Behandlung [44].

Die Behandlung von VSMC mit 100 nM Ang II für zehn Minuten wirkte sich auf die Phosphorylierung von Shp2 durch eine Steigerung um etwa 40 % gegenüber den mit DMSO behandelten Zellen aus. Im Gegensatz zu den hemmenden Effekten von RV auf die Ang II-induzierte Akt-Phosphorylierung, wirkte RV auf die Ang II-vermittelte Aktivierung von Shp2 stimulierend. Die durch Ang II vermehrte Phosphorylierung der Phosphatase wird durch die Vorbehandlung mit 50  $\mu$ M RV für 30 Minuten noch um weitere 50 % gesteigert. Im Gegensatz dazu zeigt das redox-inaktive TMRV keine Effekte auf die Ang II-stimulierte Phosphorylierung von Shp2. Diese Ergebnisse werden in Abbildung 15 dargestellt.

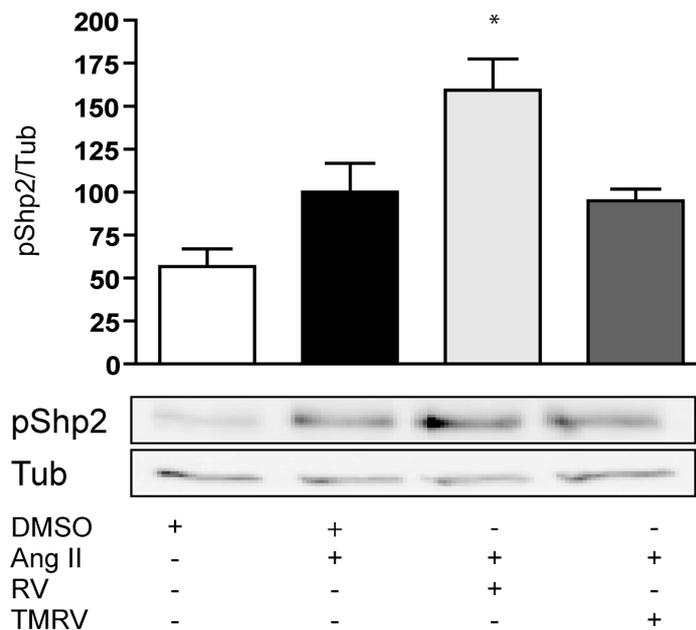


Abbildung 15: **Effekte von RV und TMRV auf die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Shp-2**

Die für 24 Stunden mit Hungermedium behandelten VSMC wurden 30 Minuten mit RV, TMRV (50  $\mu$ M) oder 0,1 % DMSO (Vehikelkontrolle) inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 100 nM Ang II stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert (Antikörper gegen pShp2 Y542), ein repräsentativer Blot ist abgebildet. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. Ang II-Stimulation wird als 100 % angenommen (\*,  $p < 0,05$ ; one-way ANOVA versus Ang II-Behandlung).

### 3.2 EGF-induzierte Effekte

Viele der Ang II-induzierten Effekte werden durch die Transaktivierung des EGFR vermittelt [36], deswegen ist es auch nicht verwunderlich, dass EGF die gleichen Signalmoleküle, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß aktiviert [44]. EGF ist ein Wachstumsfaktor, der über den Tyrosinkinase-Rezeptor EGFR Zellen zur Proliferation anregt.

Die VSMC wurden mit 100 ng/ml EGF für fünf Minuten stimuliert, in diesem Zeitraum kann der potente Wachstumsfaktor über die Interaktion mit dem EGFR verschiedene Signalwege anschalten, deren Aktivität durch die Phosphorylierung verschiedener Signalproteine gekennzeichnet ist.

#### 3.2.1 Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Akt

Nach fünfminütiger Stimulation mit EGF konnte ein deutlich stärkeres Signal gegenüber der Ang II-Stimulation detektiert werden. Das bedeutet, der Anstieg der Phosphorylierung gegenüber den nur mit DMSO behandelten Zellen ist etwa zehnfach, wie in Abbildung 16 zu sehen ist.

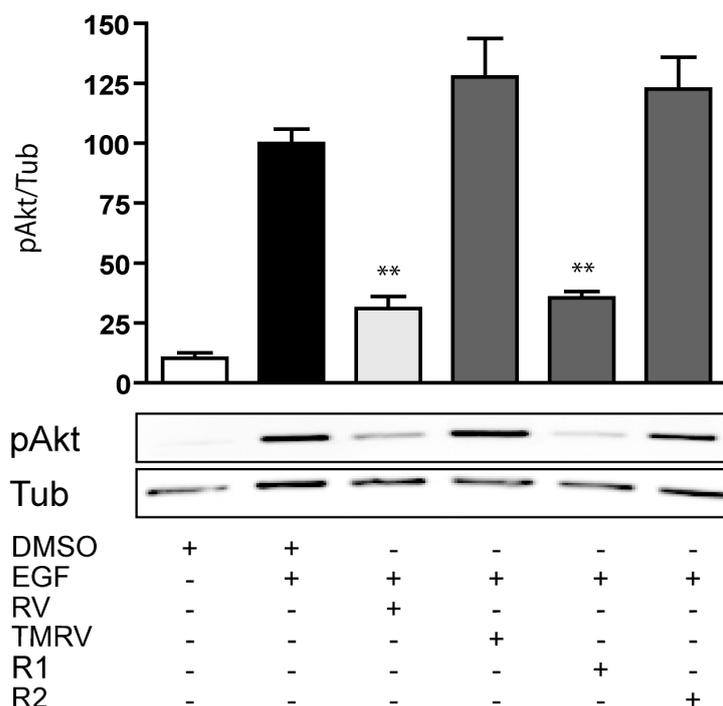


Abbildung 16: **Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Akt** VSMC, die 24 Stunden vor Start des Experiments mit Hungermedium versetzt worden waren, wurden 30 Minuten mit RV, TMRV, R1, R2 (50  $\mu$ M) oder DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert (Antikörper gegen pAkt, Tubulin als Ladekontrolle), ein repräsentativer Blot ist abgebildet. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. EGF-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt (\*\*,  $p < 0,01$ ; one-way ANOVA versus EGF-Behandlung)

Dieses Signal kann durch RV stark vermindert werden. Die Effekte der redox-inaktiven RV Derivate sind verschieden. Während TMRV sowie R2 keinen Effekt auf den EGF-Anstieg haben, erfolgt nach Behandlung mit R1 eine Verminderung der Phosphorylierung, die der von RV entspricht.

### 3.2.2 Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von p38

Die redox-sensitive MAPK p38 wird nach fünfminütiger EGF Stimulation viermal so stark phosphoryliert, als in mit der Vehikelkontrolle behandelten Zellen (Abbildung 17). Die 30-minütige Inkubation mit RV, TMRV, R1 oder R2 zeigt darauf keinen Einfluss. RV als potentes Antioxidans kann die Phosphorylierung dieses Proteins nicht hemmen, dessen Aktivierung als redox-sensitiv bewiesen wurde [233].

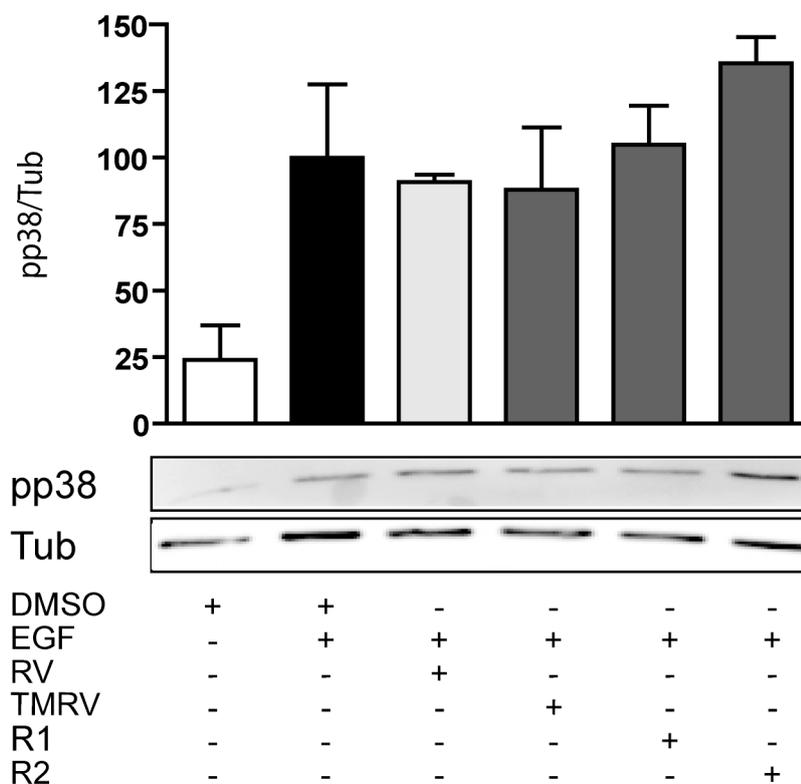


Abbildung 17: **Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von p38**  
 24 Stunden vor Start des Experiments wurden die VSMC mit Hungermedium versetzt. Im Anschluss wurde 30 Minuten mit RV, TMRV, R1, R2 (50  $\mu$ M) oder DMSO (Vehikelkontrolle) inkubiert. Danach wurde für 5 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert (Antikörper gegen pp38, Tubulin als Ladekontrolle), ein repräsentativer Blot ist abgebildet. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. EGF-Stimulation wird als 100 % angenommen. Die statistische Analyse mittels one-way ANOVA ergab keine statistisch signifikante Abweichung der RV-, TMRV-, R1- oder R2-Inkubation gegenüber der EGF-Stimulation.

### 3.2.3 Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Erk

Die MAPK Erk 1/2, auch als p42/44 bezeichnet, wird durch EGF und andere Wachstumsfaktoren über den Ras/Raf/MEK-Weg aktiviert [61]. Die fünfminütige Stimulation glatter Muskelzellen mit 100 ng/ml EGF führt zu einem fünffachen Anstieg der Phosphorylierung gegenüber DMSO-behandelten VSMC, wie in Abbildung 18 gezeigt. Dieser Effekt kann durch die 30-minütige Inkubation mit dem Antioxidans RV nicht beeinflusst werden. TMRV, R1 und R2 haben ebenso keinen Einfluss auf die vermehrte Phosphorylierung von Erk durch EGF.

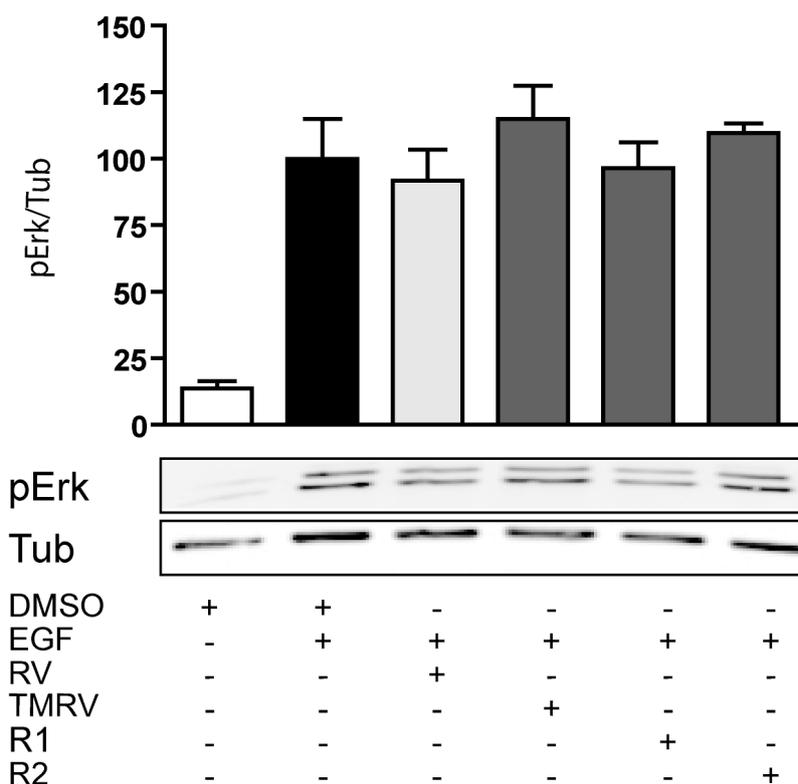


Abbildung 18: **Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Erk**  
 Die für 24 Stunden gehungerten VSMC wurden 30 Minuten mit RV, TMRV, R1, R2 (50 µM) oder 0,1 % DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Mittels Antikörper gegen pErk 1/2 wurden die Proteine durch Western Blot Analyse detektiert, Tubulin diente als Ladekontrolle. Ein repräsentativer Blot ist abgebildet. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. EGF-Stimulation wird als 100 % angenommen. Die statistische Analyse mittels one-way ANOVA ergab keine statistisch signifikante Abweichung der RV-, TMRV-, R1- oder R2-Inkubation gegenüber der EGF-Stimulation.

### 3.2.4 Effekte von RV und RV-Derivaten auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Shp2

Wie in Abbildung 19 zu sehen, führt EGF nach fünfminütiger Stimulation zu einer schwachen Induktion der Phosphorylierung von Shp2. Die 30-minütige Behandlung mit RV zeigt im Gegensatz zur Ang II-induzierten Phosphorylierung keine Steigerung der Phosphorylierung. Auch TMRV hat darauf keinen Einfluss.

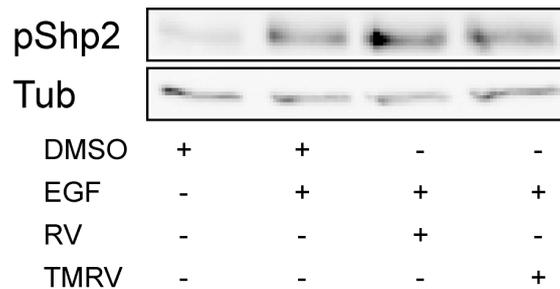


Abbildung 19: **Effekte von RV und TMRV auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von Shp2**

Die VSMC wurden für 24 Stunden mit Hungermedium behandelt. Die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  RV oder TMRV erfolgte für 30 Minuten, danach wurde mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert (Antikörper gegen pShp2, Tubulin als Ladekontrolle). Ein repräsentativer Blot aus 3 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen ist abgebildet.

### 3.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Effekte

Die Aktivierung der untersuchten Proteine wird in allen Fällen in irgendeiner Weise mit ROS in Verbindung gebracht. Stellvertretend für ROS wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Stimulus verwendet. Im Gegensatz zu den anderen ROS-Verbindungen handelt es sich bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um ein stabiles membrangängiges Molekül. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Aktivierung von Signalwegen in VSMC scheint Ca<sup>2+</sup>-abhängig zu sein [234, 235]

Für die Signalweiterleitung sind nur sehr geringe Mengen an ROS nötig. In inaktivierten Zellen wird die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im nanomolaren Bereich angenommen [109]. Entsprechend der Literatur zeigt extern zugeführtes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im  $\mu\text{M}$  Bereich die stärksten Effekte auf die Signalweiterleitung, meist im Rahmen von 200  $\mu\text{M}$  [61, 118, 236] über 500  $\mu\text{M}$  [234] bis 600  $\mu\text{M}$  [237]. Diese Daten stimmen mit der Phosphorylierung der untersuchten Proteine in unserem Zusammenhang überein, wobei bei einer Stimulationszeit von zehn Minuten bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  das robusteste und stärkste Signal detektiert werden konnte.

### 3.3.1 Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von Akt

Es wurde gezeigt, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup>-abhängig PLCγ aktiviert und somit PLC-abhängige Mechanismen induziert [234], einer davon ist der PI3K/Akt-Signalweg.

Die Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte mit 250 nM, 500 nM und 500 μM für zehn Minuten, davor wurden die VSMC für 30 Minuten mit RV oder TMRV vorbehandelt. Wie Abbildung 20 darstellt, wurde nur mit 500 μM eine deutliche Aktivierung (fünffach gegenüber den DMSO-behandelten Zellen) erzielt, RV kann diese Steigerung der Phosphorylierung unterdrücken, jedoch nicht das redox-inaktive TMRV. RV reduziert auch die Phosphorylierung von Akt der Zellen, die mit 250 nM und 500 nM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden, obwohl sie keine gesteigerte Aktivität gegenüber den Zellen zeigen, die mit der Vehikelkontrolle inkubiert wurden.

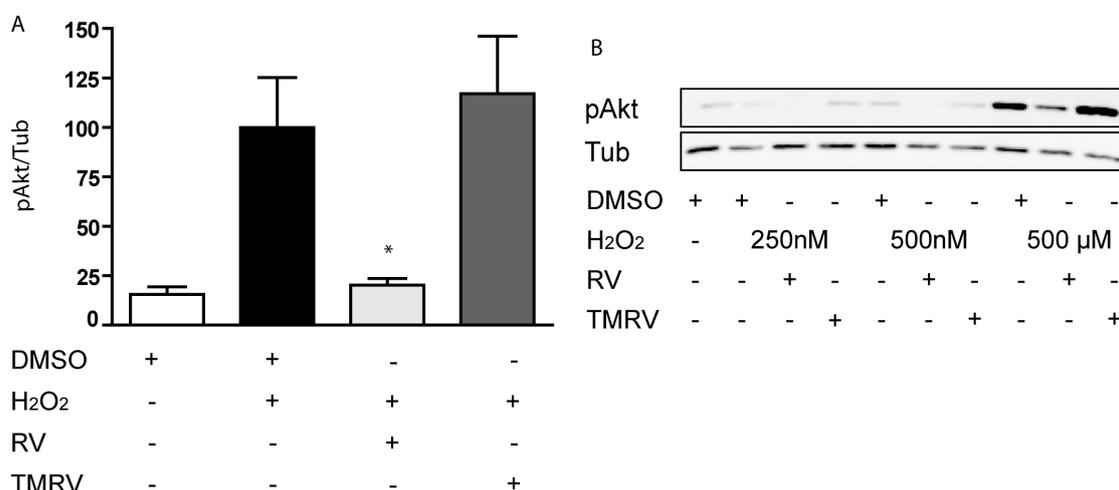


Abbildung 20: Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von Akt

Die für 24 Stunden mit annähernd serumfreien Medium inkubierten VSMC wurden 30 Minuten mit RV, TMRV (50 μM) oder DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für zehn Minuten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 250 nM, 500 nM und 500 μM stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert. (A) Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten bei einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 500 μM. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation wird als 100 % angenommen (\*, p < 0,05; one-way ANOVA versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung). (B) Ein repräsentativer Blot ist dargestellt, der die Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte (250 nM, 500 nM, 500 μM) Akt Phosphorylierung zeigt.

### 3.3.2 Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von p38

Obwohl p38 als redoxsensitives Protein gilt, und in verschiedenen Zellen die Aktivierung als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängig demonstriert wurde [233], zeigt die Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine starken Effekte auf die Aktivität von p38, es kommt zu einer zwei- bis dreifachen Steigerung der Phosphorylierung. Dies stimmt jedoch

mit den Ergebnissen von Huot et al. [233] überein, die in HUVEC nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation zwei Anstiege der Phosphorylierung von p38 detektierten, einen nach fünf Minuten, der nach zehn Minuten schon stark zurückgegangen ist, und der zweite nach 45 Minuten.

Das antioxidative RV (50 µM) zeigte bei 30-minütiger Inkubation keinen Einfluss auf die gesteigerte Phosphorylierung nach zehnmütiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation, ebenso wie die 30-minütige Vorbehandlung mit 50 µM TMRV (Abbildung 21).

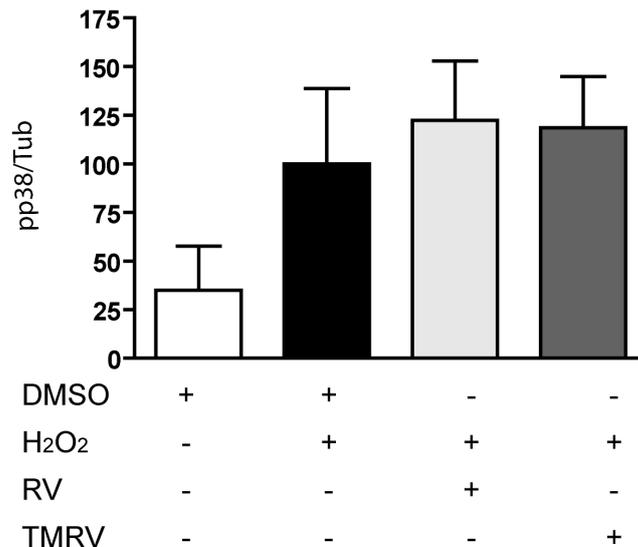


Abbildung 21: **Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von p38**

Die für 24 Stunden mit annähernd serumfreien Medium inkubierten VSMC wurden 30 Minuten mit RV, TMRV (50 µM) oder DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation wird als 100 % angenommen. Mittels one way ANOVA konnte führte weder RV- noch TMRV-Behandlung zu einer signifikanten Abweichung gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation.

### 3.3.3 Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von Erk

Die Redoxabhängigkeit der Aktivierung von Erk 1/2 ist umstritten. Teilweise wurde nur eine sehr minimale und nicht signifikante H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Steigerung der Phosphorylierung festgestellt [61, 230, 238], andere Quellen konnten eine deutliche Aktivierung von Erk nach zehnmütiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung zeigen [118, 239].

Wie in Abbildung 22 dargestellt, ergab die zehnmütige Stimulation mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in unserem experimentellen Setting eine Verdopplung der Phosphorylierung gegenüber den mit Vehikelkontrolle inkubierten Zellen. Im Gegensatz zu TMRV konnte eine 30-minütige Vorbehandlung mit 50 µM RV diesen Anstieg unterdrücken, wie auch schon an humanen koronaren glatten Muskelzellen gezeigt

werden konnte [118]. Die Inkubation mit 250 nM und 500 nM ergab keine signifikante Steigerung der Erk-Phosphorylierung, RV vermochte auch bei diesen Konzentrationen das Ausmaß des phosphorylierten Anteils zu reduzieren.

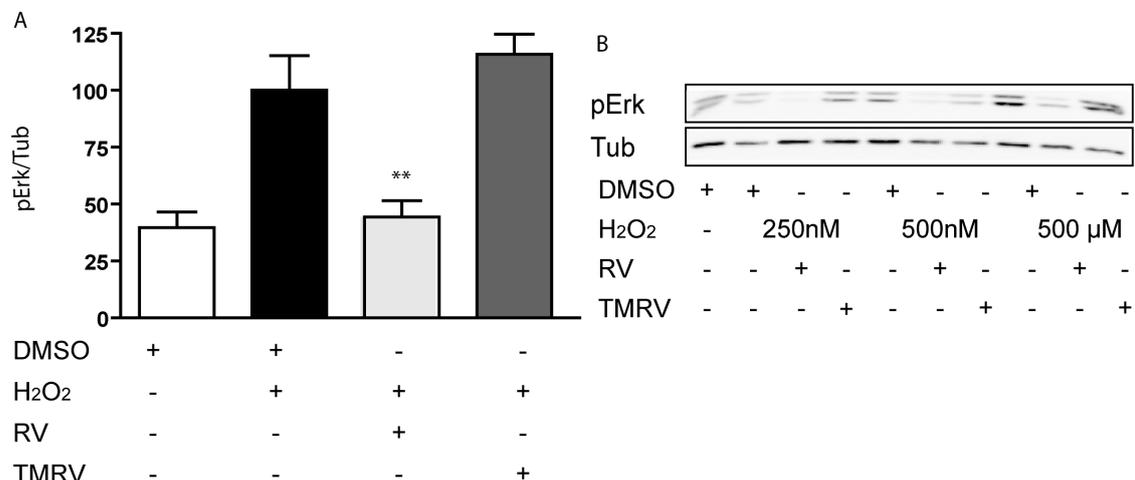


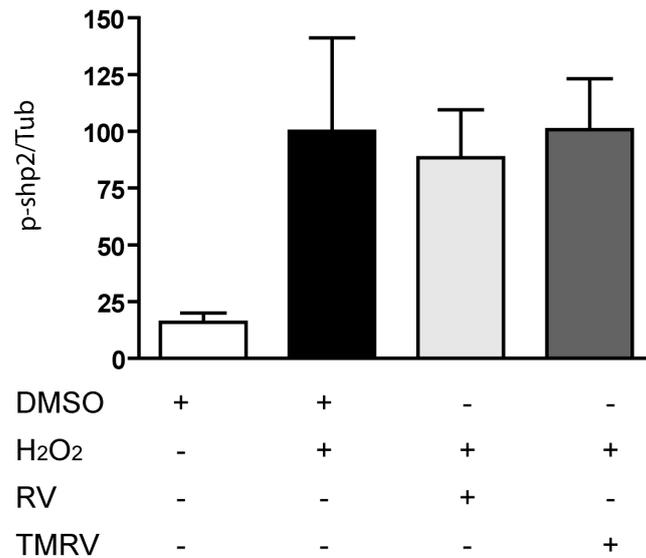
Abbildung 22: **Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von Erk**

Die für 24 Stunden mit Hungermedium inkubierten VSMC wurden 30 Minuten mit RV, TMRV (50 µM) oder DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für zehn Minuten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 250 nM, 500 nM und 500 µM stimuliert. Proteine wurden mittels Antikörper gegen pErk 1/2 durch Western Blot Analyse detektiert, Tubulin diente als Ladekontrolle. (A) Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten bei einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 500 µM. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation wird als 100 % angenommen (\*\*, p < 0,01; one-way ANOVA versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung). (B) Ein repräsentativer Blot wird dargestellt, der die Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation verschiedener Konzentrationen (250 nM, 500 nM, 500 µM) zeigt.

### 3.3.4 Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von Shp2

Es gibt Hinweise auf die ROS-Abhängigkeit der Aktivierung der Tyrosinphosphatase Shp2 [71]. Es konnte gezeigt werden, dass eine zehninütige Stimulation mit 600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine vermehrte Phosphorylierung von Shp2 induziert [237].

In VSMC führte eine Behandlung mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für zehn Minuten zur fünffach gesteigerten Phosphorylierung gegenüber der Vehikelkontrolle (Abbildung 23). Die Inkubation mit 50 µM RV für 30 Minuten hatte, ebenso wie die mit TMRV keinen Einfluss auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung der Phosphatase.



**Abbildung 23: Effekte von RV und TMRV auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von Shp-2**  
 Die für 24 Stunden mit annähernd serumfreien Medium inkubierten VSMC wurden 30 Minuten mit RV, TMRV (50 µM) oder DMSO (Vehikelkontrolle) vorbehandelt. Anschließend wurde für zehn Minuten mit 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert. Proteine wurden durch Western Blot Analyse detektiert. Die Graphen zeigen das durchschnittliche densitometrische Signal von vier unabhängigen Experimenten. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation wurde auf 100 % gesetzt. Die statistische Analyse mittels one-way ANOVA ergab keine signifikante Abweichung der RV- oder TMRV-Behandlung gegenüber der alleinigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation.

## V Diskussion



## V Diskussion

Es ist bekannt, dass RV in VSMC selektiv die Ang II- und EGF-induzierte Phosphorylierung von Akt hemmt [180]. Der molekulare Mechanismus, der für die Unterbrechung der Signalweiterleitung verantwortlich ist, konnte jedoch noch nicht identifiziert werden. Wie andere pflanzliche Polyphenole weist RV deutliche antioxidative Eigenschaften auf. RV gilt als potenter Radikalfänger, der in vielen Systemen antioxidativ wirkt [135, 160, 161]. Das Polyphenol kann mit Metallionen Chelate bilden, wirkt auf gewisse Arten von ROS als Radikalfänger und kann die Aktivität verschiedener Antioxidantien erhöhen [135, 166]. Da viele Wachstums promotoren und somit auch Ang II und EGF auf reaktive Sauerstoffspezies als sekundäre Botenstoffe angewiesen sind, um ihr Signal ins Zellinnere weiterzuleiten [65], wollten wir im Rahmen dieser Arbeit klären, inwieweit die antioxidativen Eigenschaften von RV zur Hemmung der Akt-Aktivität beitragen. Methylierte RV-Derivate dienten dabei als redox-inaktive Kontrollen. Wir konnten zeigen, dass RV die ROS-Level in VSMC reduziert, wozu die methylierten RV-Derivate (fast) nicht in der Lage waren. TMRV und R2 hatten keinen inhibierenden Effekt auf die Phosphorylierung von Akt. Im Gegensatz dazu konnte R1, dessen *p*-Hydroxylgruppe in Position 4' methyliert ist, die für die antioxidativen Eigenschaften hauptverantwortlich gemacht wird [214], die Ang II- und EGF-vermittelte Akt-Phosphorylierung genauso wie RV hemmen. Dies schließt einen rein antioxidativen Wirkmechanismus von RV hinsichtlich der hemmenden Effekte auf Ang II- und EGF-induzierte Signalwege aus. Die 3- und 5-Hydroxylgruppen des Resveratrols scheinen also für seine (ROS-unabhängige) Funktionalität in stimulierten VSMC von Bedeutung zu sein.

### 1 Antioxidative Eigenschaften von RV und RV-Derivaten

RV ist aus einem Stilbengrundgerüst aufgebaut, das an Position 3,4' und 5 hydroxyliert ist. Die Anzahl und Position der Hydroxylgruppen ist für die antioxidative Aktivität entscheidend [191]. Es wurde gezeigt, dass die para-Hydroxylgruppe in Position 4' für die antioxidativen Eigenschaften von größerer Bedeutung ist, als die beiden meta-Hydroxylgruppen [160, 214]. Im Rahmen dieses Projekts wurden drei redox-inaktive RV-Derivate untersucht, deren Hydroxylgruppen unterschiedlich methyliert sind. TMRV ist ein RV-Derivat, bei dem alle drei Hydroxylgruppen durch Methoxygruppen ersetzt sind. Bei R1 ist lediglich die 4'-Hydroxylgruppe methyliert, die man für die antioxidativen Eigenschaften von RV hauptverantwortlich macht [214]. R2 hat zusätzlich zu der 4'-Methoxygruppe noch eine zweite an Position 3. Wir konnten auch in unserem Zellsystem zeigen, dass der Literatur entsprechend [191] diese modifizierten Derivate im Gegensatz zu RV nicht mehr (TMRV) oder kaum (R1 und R2) antioxidativ wirkten. RV verminderte die Menge von extra- und intrazellulärer ROS um etwa die Hälfte im Vergleich zum Basallevel (Abbildungen 9 und 10). Sowohl bei der intrazellulären, als auch bei der extrazellulären ROS-Messung, konnte durch Ang II nur eine minimale, nicht signifikante Induktion festgestellt werden

(Abbildungen 9 und 10). Dies steht im Widerspruch zu veröffentlichten Daten, die nach Ang II-Stimulation eine deutliche Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies, hauptsächlich durch gesteigerte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität, beobachteten [63, 95]. Eine potentielle Erklärung könnte sein, dass unsere Methoden zur ROS-Bestimmung (Amplex Red™- und DCF-Bestimmung mittels Durchflußzytometrie) immer nur den durchschnittlichen ROS-Gehalt einer Zelle messen. Methoden mit größerer räumlicher Auflösung (wie zum Beispiel mittels konfokaler Mikroskopie) könnten möglicherweise den lokalen Anstieg an ROS nach Ang II-Stimulation an der Membran deutlicher zeigen.

Im zellfreien *Setting* konnte RV das Fluoreszenzsignal von extern zugeführtem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Amplex Red™ Assay deutlich reduzieren (Abbildung 11). Auch R1 und R2, die im Gegensatz zu TMRV Hydroxylgruppen besitzen, zeigten deutlichere Effekte auf das detektierte Fluoreszenzsignal, die entweder auf eine Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (chemische Detoxifikation durch RV und die entsprechenden RV-Derivate) oder auf Interferenz der OH-Gruppen mit dem Amplex Red™ Assay (z.B. über Hemmung der Peroxidase im Assay) schließen lassen. R1 und R2 wirkten zwar auf chemischer Ebene antioxidativ, im biologischen System jedoch kaum. Dies könnte als Hinweis gewertet werden, dass RV möglicherweise über einen spezifischen Mechanismus die zelluläre ROS-Konzentration senken kann.

Zu beachten ist hierbei, dass RV, wie die meisten Antioxidantien, auch pro-oxidativ wirken kann [135]. Der Redoxhaushalt unterliegt aus gutem Grund einer genauen Regulierung. Die schädlichen Effekte von ROS müssen unter Kontrolle gehalten werden, während die Abwesenheit von ROS genauso negative Folgen hat [100, 101]. Antioxidantien, die als Radikalfänger wirken sind Substanzen, die während der Reaktion mit dem Radikal selbst zum Radikal werden. Zwar sind diese Radikale, die aus Antioxidantien entstanden sind, weniger reaktiv als andere Radikale und das ist auch die Erklärung für deren antioxidative Eigenschaften, dennoch können sie genauso Schaden anrichten [94, 132]. Ein Molekül, das in der Lage ist die wachstumsfördernden Effekte von Ang II, EGF und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu unterdrücken, ohne anti- und somit auch pro-oxidative Aktivität könnte unter Umständen von Vorteil sein.

## **2 Einfluss von RV und RV-Derivaten auf intrazelluläre Signalwege**

### **2.1 Akt**

Die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Akt verläuft über ROS-abhängige Signalwege [1, 67]. Durch siRNA-vermittelte *Downregulierung* der katalytischen NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit Nox1 konnte gezeigt werden, dass diese für die Ang II-induzierte Aktivierung von Akt notwendig ist. Die Hemmung von Nox1 äußerte sich in einer Hemmung des pAkt-Signals [2]. Die Abhängigkeit der Signalweiterleitung von ROS erklärt die Wirksamkeit von Antioxidantien auf die Inhibierung der Ang II-induzierten Akt-

Phosphorylierung. So konnte die Ang II-induzierte Aktivierung von Akt durch NAC gleich stark gehemmt werden, wie durch RV. NAC ist ein Vorläuferstoff von Cystein, das zur Bildung von Glutathion benötigt wird und zur Steigerung der zellulären antioxidativen Abwehr beiträgt [144]. Die Behandlung mit DPI (Diphenyliodonium), einem unspezifischen Flavoproteininhistor, der somit auch in der Lage ist die NAD(P)H-Oxidasen zu inaktivieren, hemmte die Aktivierung nicht so stark wie RV [2].

RV hemmt die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Akt deutlich, sogar unter das Level der Kontrollzellen (Abbildung 8A). Die nicht-antioxidativen TMRV und R2 hatten keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Akt. Im Gegensatz dazu konnte R1 die Ang II-vermittelte Aktivierung von Akt in ähnlichem Ausmaß wie RV inhibieren (Abbildung 12).

RV kann auch die EGF-induzierte Phosphorylierung von Akt hemmen (Abbildung 8B). Die nicht-antioxidativen TMRV und R2 hatten wie nach Ang II-Behandlung keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Akt. R1 konnte die EGF-vermittelte Aktivierung von Akt inhibieren (Abbildung 16).

Die Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte ebenfalls zu einer Aktivierung von Akt, die durch RV, nicht aber durch TMRV unterdrückt werden konnte (Abbildung 20)

Die Ergebnisse der *Western Blot* Analyse zeigen, dass für die Hemmung der Ang II- und EGF-induzierten Phosphorylierung von Akt durch RV Hydroxylgruppen nötig sind. Der Effekt ist jedoch nicht von der, für die antioxidative Aktivität so essentiell beschriebene 4'-Hydroxylgruppe [214], abhängig. R1, dessen 4'-Position mit einer Methoxygruppe substituiert ist, konnte die vermehrte Akt-Phosphorylierung nach EGF- und Ang II-Stimulation in ähnlichem Ausmaß wie RV unterdrücken. Obwohl besonders die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Akt als redox-sensitiv beschrieben wird und RV bewiesenermaßen das ROS-Level der Zelle senkt, scheint die RV-vermittelte Hemmung dieses Signalproteins mit der Reduktion der ROS-Konzentration in keinem kausalen Zusammenhang zu stehen.

## 2.2 p38

Die Aktivität von p38 sowohl nach Ang II- als auch nach EGF-Behandlung bleibt durch R1, R2 und TMRV, wie auch durch RV, weitgehend unbeeinflusst (Abbildungen 13 und 17).

Die Ang II-vermittelte Aktivierung von p38 ist von Nox1 abhängig. Dessen Unterdrückung führt zu einer Hemmung der p38-Phosphorylierung [2]. p38 ist generell als sehr redox-sensitiv bekannt. Dies konnte auch durch die gesteigerte Phosphorylierung von p38 nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gabe beobachtet werden (Abbildung 21). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die durch Ang II gesteigerte Phosphorylierung von p38 durch die Antioxidantien NAC, DPI [2, 240], Ascorbinsäure und Trolox C, einem wasserlöslichen Vitamin E-Analogon [51], gehemmt wird. Dass RV, das ebenfalls antioxidativ wirkt, im Gegensatz zu all diesen

auf sehr unterschiedliche Art wirkenden Antioxidantien, die Phosphorylierung von p38, unabhängig vom Stimulus (Ang II, EGF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nicht hemmen kann, lässt auf einen spezifischen, nicht ROS-vermittelten Wirkmechanismus von RV schließen.

### 2.3 Erk 1/2

Die Ang II-induzierte Aktivierung von Erk wird größtenteils als redox-unabhängig beschrieben. So ist die Phosphorylierung von Erk nach Ang II-Behandlung Nox1-unabhängig [2]. Ebenso wird die Ang II-induzierte Phosphorylierung von Erk durch Trolox C, Ascorbinsäure oder DPI nicht beeinflusst. [51, 240]. Die Ergebnisse mit NAC sind widersprüchlich, bei einer Konzentration von 10 mM hemmte NAC die Ang II-induzierte Phosphorylierung in Fibroblasten [241] und VSMC [2] im gleichen *Setting* anderer Projekte jedoch nicht [51, 240]. RV veränderte wie auch die anderen RV-Derivate die durch Ang II und EGF gesteigerte Erk-Phosphorylierung nicht (Abbildungen 14 und 18).

Die EGF-induzierte Phosphorylierung von Signalproteinen erscheint weitgehend ROS-insensitiv. Antioxidantien und die Hemmung von Nox 1 hatten keinen Einfluss auf EGF-stimuliertes *Signaling* und die Phosphorylierung von Erk [2].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte allerdings eine Aktivierung von Erk in VSMC vermitteln, die durch RV um ca. die Hälfte gehemmt wurde (Abbildung 22), und so auch schon für humanen Kardiomyozyten beschrieben wurde [118]. TMRV hatte keinen inhibierenden Effekt auf die Phosphorylierung von Erk nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation.

Auch wenn H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Phosphorylierung von Erk vermitteln kann und obwohl laut DeYulia et. al. [93] die Ligandenbindung von EGF an seinen Rezeptor mit extrazellulärer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion einhergeht, spielen ROS bei der Aktivierung von Erk nach EGF- und auch nach Ang II-Stimulation keine große Rolle. Die fehlende Hemmung von Erk durch RV nach Ang II- und EGF-Stimulation deutet darauf hin, dass RV selektiv mit Proteinen, die am Akt-*Signaling* beteiligt sind, interferiert. Der beobachtete Hemmeffekt von RV auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Erk-Phosphorylierung lässt sich möglicherweise mit der beobachteten Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch RV im Amplex Red™ Assay in Zusammenhang bringen, jedoch müsste sich RV in diesem Fall auch inhibierend auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung von p38 und Shp2 auswirken.

### 2.4 Shp2

Ang II stimuliert die Phosphorylierung von Shp2, die zu deren Aktivierung beiträgt ist [232]. Die Oxidation des Thiolrestes im aktiven Zentrum führt zur Inaktivierung [120]. RV bewirkt eine Verstärkung der Ang II-induzierten Phosphorylierung von Shp2 (Abbildung 15). TMRV hatte keinen Einfluss darauf.

Die gesteigerte Phosphorylierung und Aktivierung von Shp2 durch RV könnte Teil der Erklärung für die beobachtete selektive Akt-Hemmung nach Ang II-Stimulation sein [44]. Allerdings wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder EGF-stimulierte Shp2-Phosphorylierung von RV nicht beeinflusst. Die gesteigerte Phosphorylierung von Shp2 kann somit den RV-Effekt auf das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und EGF-induziertes pAkt-Signal nicht erklären. Jedoch sollte man hier beachten, dass der Einfluß von RV auf die Shp2-Phosphorylierung nur nach fünfminütiger EGF- und nach zehnminütiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation untersucht wurde, und mögliche früher oder später eintretende Veränderungen nicht erfasst wurden.

Leider fehlte im Rahmen dieses Projektes die Zeit, um die Auswirkungen von R1 und R2 auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation sowie auf die Ang II- und EGF-induzierte Phosphorylierung von Shp2 zu untersuchen.

### 3 Abschließende Bemerkungen

Im Laufe der Arbeit konnten wir also unter anderem zeigen beziehungsweise bestätigen, dass

- RV im Gegensatz zu den methylierten RV-Derivaten die ROS-Level in VSMC senken kann
- RV selektiv die Ang II- und EGF-induzierte Akt-Phosphorylierung in VSMC hemmen kann
- die Hemmung von Akt im Ang II- und EGF-*Signaling* nicht über die anti-oxidativen Eigenschaften von RV vermittelt wird.
- vielmehr die 3- und 5-Hydroxylgruppen von RV (und nicht die antioxidative 4'-OH Gruppe) benötigt werden, um die Ang II- und EGF-vermittelte Phosphorylierung von Akt, wahrscheinlich über spezifische Bindungen an Zielproteine, zu hemmen.

Viele Studien belegen, dass es sich bei RV um ein pharmakologisch sehr aktives Molekül handelt, das eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Effekten in verschiedensten Organismen beeinflussen kann [161, 163, 242]. Diese vielen verschiedenen Wirkungen lassen einen einzigen gemeinsamen Wirkmechanismus sehr unwahrscheinlich erscheinen. Daraus ergibt sich die Annahme, dass es sich bei RV um ein Molekül handelt, das mit vielen Zielstrukturen wechselwirkt [49].

RV interagiert bewiesenermaßen mit IKK [182, 183], COX [185], Sirtuinen [200], PKC [243], RR [190] und Estrogenrezeptoren [208, 209]. Diese Moleküle unterscheiden sich zwar sehr deutlich in ihrer Struktur und Aufgabe, dennoch bestehen sie alle aus dem gleichen Grundbaustein - Aminosäuren. Wenn man die chemische Struktur von RV betrachtet, fällt auf, dass sie Ähnlichkeit mit der proteinogenen Aminosäure Tyrosin aufweist. Genauso wie Tyrosin besitzt RV eine Hydroxylgruppe in para-Position an einem Phenylring. Genau diese *p*-Phenolgruppe von Tyrosin spielt in der zellulären

Signalweiterleitung eine große Rolle, da sie als Empfänger für Phosphatreste fungiert, die durch Proteinkinasen, in diesem Fall Tyrosinkinasen, übertragen werden.

Eine mögliche Erklärung für die Effekte von RV könnte die strukturelle Verwandtschaft mit Tyrosin sein, die unter Umständen eine Interaktion mit Molekülen erlaubt, deren Zielstrukturen tyrosinhaltige Proteine sind. Aus den Ergebnissen mit den unterschiedlich methylierten RV-Derivaten lässt sich ableiten, dass die Hemmung der Ang II- und EGF-induzierten Signalwege nicht auf die strukturelle Verwandtschaft von RV mit Tyrosin zurückzuführen ist. Auch R1, dessen Tyrosin-analoge Hydroxylgruppe methyliert ist, erwies sich als wirksam. Dies macht eine Interaktion über seine Tyrosin-artige Struktur in diesem Fall unmöglich.

Der Vergleich von RV mit anderen Antioxidantien, sowie mit den nicht oder kaum redox-aktiven RV-Derivaten zeigt, dass die Effekte von RV auf Ang II- und EGF-vermittelte Signalwege nicht in dessen antioxidativer Aktivität begründet liegen. Vielmehr scheint hier eine spezifische Interaktion mit einem oder mehreren Signalmolekülen für dessen Wirksamkeit verantwortlich zu sein. Mit welchem Molekül RV hier interagiert bleibt unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Wirkungen der RV-Derivate ergeben, dass die untersuchten Effekte von RV nicht von dessen antioxidativen Eigenschaften ausgehen, sondern auf spezifischere Interaktionen zurückzuführen sind, für die die beiden meta-Hydroxylgruppen notwendig sind.

Mit diesen Erkenntnissen scheint die Annahme, RV würde seine biologischen Wirkungen alleine seiner antioxidativen Aktivität verdanken, widerlegt. Dies entspricht auch Untersuchungen an anderen pflanzlichen Polyphenolen, die ergaben, dass deren Wirkung auf spezifische Interaktionen mit diversen Enzymen, Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden zurückgeht [150] So sind auch die Effekte von RV auf Ang II- und EGF-vermittelte Signalwege auf spezifische Wechselwirkungen, die noch nicht bekannt sind, angewiesen und nicht in dessen antioxidativen Aktivität begründet.

## VI Literaturverzeichnis



## VI Literaturverzeichnis

1. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
2. Schreiner, C., *Mechanistic studies on resveratrol and its influence on angiotensin II- and epidermal growth factor-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells*. 2009, Univeristät Wien.
3. Spyridopoulos, I. and V. Andres, *Control of vascular smooth muscle and endothelial cell proliferation and its implication in cardiovascular disease*. Front Biosci, 1998. **3**: p. d269-87.
4. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(8): p. 1263-73.
5. Jain, K.S., et al., *The biology and chemistry of hyperlipidemia*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(14): p. 4674-99.
6. Zouridakis, E., et al., *Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris*. Circulation, 2004. **110**(13): p. 1747-53.
7. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
8. Rodriguez, G., N. Mago, and F. Rosa, *[Role of inflammation in atherogenesis]*. Invest Clin, 2009. **50**(1): p. 109-29.
9. Martinez-Gonzalez, J., V. Llorente-Cortes, and L. Badimon, *[Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions]*. Rev Esp Cardiol, 2001. **54**(2): p. 218-31.
10. Brophy, C.M., et al., *cGMP-dependent protein kinase expression restores contractile function in cultured vascular smooth muscle cells*. J Vasc Res, 2002. **39**(2): p. 95-103.
11. Wissler, R.W., D. Vesselinovitch, and A. Komatsu, *The contribution of studies of atherosclerotic lesions in young people to future research*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **598**: p. 418-34.
12. Gordon, D., et al., *Cell proliferation in human coronary arteries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4600-4.
13. Shanahan, C.M. and P.L. Weissberg, *Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(3): p. 333-8.
14. Haider, U.G., *Resveratrol Attenuates Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy and Hyperplasia: Elucidation of Signalling Pathways*. 2003, Ludwig-Maximilians-Universität München.
15. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. J Biol Chem, 1990. **265**(14): p. 7709-12.
16. Geisterfer, A.A., M.J. Peach, and G.K. Owens, *Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells*. Circ Res, 1988. **62**(4): p. 749-56.
17. Owens, G.K., *Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1987. **9**(2): p. 178-87.
18. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 11-34.
19. Marchesi, C., P. Paradis, and E.L. Schiffrin, *Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(7): p. 367-74.
20. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 639-72.
21. Mukoyama, M., et al., *Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 24539-42.

22. Shanmugam, S., P. Corvol, and J.M. Gasc, *Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat*. *Hypertension*, 1996. **28**(1): p. 91-7.
23. Carey, R.M., Z.Q. Wang, and H.M. Siragy, *Novel actions of angiotensin II via its renal type-2 (AT<sub>2</sub>) receptor*. *Curr Hypertens Rep*, 1999. **1**(2): p. 151-7.
24. Berk, B.C., *Angiotensin type 2 receptor (AT<sub>2</sub>R): a challenging twin*. *Sci STKE*, 2003. **2003**(181): p. PE16.
25. D'Amore, A., M.J. Black, and W.G. Thomas, *The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy*. *Hypertension*, 2005. **46**(6): p. 1347-54.
26. Gasc, J.M., et al., *Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study*. *Hypertension*, 1994. **24**(5): p. 531-7.
27. Allen, A.M., J. Zhuo, and F.A. Mendelsohn, *Localization and function of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors*. *Am J Hypertens*, 2000. **13**(1 Pt 2): p. 31S-38S.
28. Ohyama, K., et al., *Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA*. *Regul Pept*, 1995. **57**(2): p. 141-7.
29. Griendling, K.K., et al., *Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(30): p. 14555-62.
30. Ushio-Fukai, M., et al., *Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(31): p. 19772-7.
31. Ushio-Fukai, M., et al., *Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells*. *Mol Pharmacol*, 1999. **55**(1): p. 142-9.
32. Schieffer, B., et al., *Importance of tyrosine phosphorylation in angiotensin II type 1 receptor signaling*. *Hypertension*, 1996. **27**(3 Pt 2): p. 476-80.
33. Vallega, G.A., et al., *Vascular smooth muscle Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger kinetics and its activation by angiotensin II*. *Am J Physiol*, 1988. **254**(6 Pt 1): p. C751-8.
34. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 494-501.
35. Grant, S.L., et al., *Specific regulation of RGS2 messenger RNA by angiotensin II in cultured vascular smooth muscle cells*. *Mol Pharmacol*, 2000. **57**(3): p. 460-7.
36. Ushio-Fukai, M., et al., *Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(4): p. 489-95.
37. Gschwind, A., et al., *Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission*. *Oncogene*, 2001. **20**(13): p. 1594-600.
38. Blobel, C.P., *ADAMs: key components in EGFR signalling and development*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(1): p. 32-43.
39. Ohtsu, H., et al., *ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(9): p. e133-7.
40. Tice, D.A., et al., *Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1415-20.
41. Bader, A.G., et al., *Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(12): p. 921-9.
42. Yuan, T.L., et al., *Class 1A PI3K regulates vessel integrity during development and tumorigenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(28): p. 9739-44.
43. Zhang, S.Q., et al., *Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(12): p. 4062-72.
44. Haider, U.G., et al., *Resveratrol inhibits angiotensin II- and epidermal growth factor-mediated Akt activation: role of Gab1 and Shp2*. *Mol Pharmacol*, 2005. **68**(1): p. 41-8.

45. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 769-76.
46. Burgering, B.M. and G.J. Kops, *Cell cycle and death control: long live Forkheads*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(7): p. 352-60.
47. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
48. Marone, R., et al., *Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(1): p. 159-85.
49. Saiko, P., et al., *Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?* Mutat Res, 2008. **658**(1-2): p. 68-94.
50. Taniyama, Y., et al., *Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(2): p. C494-9.
51. Kyaw, M., et al., *Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells*. Hypertens Res, 2001. **24**(3): p. 251-61.
52. Eguchi, S., et al., *Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7957-62.
53. Liao, D.F., et al., *Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6146-50.
54. Sugden, P.H. and A. Clerk, *Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors*. Cell Signal, 1997. **9**(5): p. 337-51.
55. Bokemeyer, D., M. Lindemann, and H.J. Kramer, *Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 1998. **32**(4): p. 661-7.
56. Eguchi, S., et al., *Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive tyrosine kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14169-75.
57. Rocic, P., H. Jo, and P.A. Lucchesi, *A role for PYK2 in ANG II-dependent regulation of the PHAS-1-eIF4E complex by multiple signaling cascades in vascular smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(6): p. C1437-44.
58. Allen, R.T., et al., *Sustained Akt/PKB activation and transient attenuation of c-jun N-terminal kinase in the inhibition of apoptosis by IGF-1 in vascular smooth muscle cells*. Apoptosis, 2005. **10**(3): p. 525-35.
59. Izumiya, Y., et al., *Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling*. Circ Res, 2003. **93**(9): p. 874-83.
60. Ebrahimian, T., et al., *Cardiac hypertrophy is associated with altered thioredoxin and ASK-1 signaling in a mouse model of menopause*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(4): p. H1481-8.
61. Ushio-Fukai, M., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 15022-9.
62. Wang XM, P.C. (1997) *p70 S6 kinase is activated by sodium arsenite in adult rat cardiomyocytes: Roles for phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase*
63. Seshiah, P.N., et al., *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 406-13.
64. Taniyama, Y., et al., *Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8019-29.
65. Finkel, T., *Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 337-40.
66. D'Autreaux, B. and M.B. Toledano, *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 813-24.

67. Ushio-Fukai, M., et al., *Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22699-704.
68. Ushio-Fukai, M., et al., *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23317-21.
69. Touyz, R.M., et al., *p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(3): p. 512-8.
70. Jones, D.P., et al., *Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control*. FASEB J, 2004. **18**(11): p. 1246-8.
71. Tabet, F., et al., *Redox-sensitive signaling by angiotensin II involves oxidative inactivation and blunted phosphorylation of protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells from SHR*. Circ Res, 2008. **103**(2): p. 149-58.
72. Tarnawski, A.S. and M.K. Jones, *The role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in mucosal protection, adaptation to injury, and ulcer healing: involvement of EGF-R signal transduction pathways*. J Clin Gastroenterol, 1998. **27 Suppl 1**: p. S12-20.
73. Dreux, A.C., et al., *The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis*. Atherosclerosis, 2006. **186**(1): p. 38-53.
74. Yamanaka, Y., et al., *EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(2): p. 373-7.
75. Mitsumata, M., et al., *Response of atherosclerotic intimal smooth muscle cells to epidermal growth factor in vitro*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(8): p. 1364-71.
76. Cohen, S., *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 1555-62.
77. Higashiyama, S., et al., *Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands*. Cancer Sci, 2008. **99**(2): p. 214-20.
78. Singh, A.B. and R.C. Harris, *Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands*. Cell Signal, 2005. **17**(10): p. 1183-93.
79. Carpenter, G., L. King, Jr., and S. Cohen, *Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro*. Nature, 1978. **276**(5686): p. 409-10.
80. Linggi, B. and G. Carpenter, *ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(12): p. 649-56.
81. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
82. Gullick, W.J., *Update on HER-2 as a target for cancer therapy: alternative strategies for targeting the epidermal growth factor system in cancer*. Breast Cancer Res, 2001. **3**(6): p. 390-4.
83. Schlessinger, J., *Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor*. Cell, 2002. **110**(6): p. 669-72.
84. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1647-55.
85. Olayioye, M.A., *Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members*. Breast Cancer Res, 2001. **3**(6): p. 385-9.
86. Antonacopoulou, A.G., et al., *EGFR, HER-2 and COX-2 levels in colorectal cancer*. Histopathology, 2008. **53**(6): p. 698-706.
87. Milanezi, F., S. Carvalho, and F.C. Schmitt, *EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy*. Expert Rev Mol Diagn, 2008. **8**(4): p. 417-34.
88. Yamamoto, N., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of HER2-targeted rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, RO4368451) in Japanese patients with solid tumors*. Jpn J Clin Oncol, 2009. **39**(4): p. 260-6.

89. Lee-Hoeflich, S.T., et al., *A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy*. *Cancer Res*, 2008. **68**(14): p. 5878-87.
90. Schneider, M.R. and E. Wolf, *The epidermal growth factor receptor ligands at a glance*. *J Cell Physiol*, 2009. **218**(3): p. 460-6.
91. Sahin, U., et al., *Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands*. *J Cell Biol*, 2004. **164**(5): p. 769-79.
92. Jorissen, R.N., et al., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 31-53.
93. DeYulia, G.J., Jr. and J.M. Carcamo, *EGF receptor-ligand interaction generates extracellular hydrogen peroxide that inhibits EGFR-associated protein tyrosine phosphatases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **334**(1): p. 38-42.
94. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. 1989, Oxford; New York: Clarendon Press; Oxford University Press. xvi, 543 p.
95. Clempus, R.E. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(2): p. 216-25.
96. Di Lisa, F., et al., *Mitochondria and vascular pathology*. *Pharmacol Rep*, 2009. **61**(1): p. 123-30.
97. Morel, F., J. Doussiere, and P.V. Vignais, *The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects*. *Eur J Biochem*, 1991. **201**(3): p. 523-46.
98. Ozaki, M., et al., *Rac1 regulates stress-induced, redox-dependent heat shock factor activation*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(45): p. 35377-83.
99. Day, B.J., *Catalase and glutathione peroxidase mimics*. *Biochem Pharmacol*, 2009. **77**(3): p. 285-96.
100. Forman, H.J., J.M. Fukuto, and M. Torres, *Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(2): p. C246-56.
101. Kamata, H. and H. Hirata, *Redox regulation of cellular signalling*. *Cell Signal*, 1999. **11**(1): p. 1-14.
102. Shibata, N. and M. Kobayashi, *[The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases]*. *Brain Nerve*, 2008. **60**(2): p. 157-70.
103. Leung, P.S. and Y.C. Chan, *Role of oxidative stress in pancreatic inflammation*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(1): p. 135-65.
104. Dhalla, N.S., R.M. Temsah, and T. Netticadan, *Role of oxidative stress in cardiovascular diseases*. *J Hypertens*, 2000. **18**(6): p. 655-73.
105. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. *Chem Biol Interact*, 2006. **160**(1): p. 1-40.
106. Klaunig, J.E. and L.M. Kamendulis, *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004. **44**: p. 239-67.
107. Harman, D., *Aging and oxidative stress*. *J Int Fed Clin Chem*, 1998. **10**(1): p. 24-7.
108. Droge, W., *Oxidative stress and aging*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **543**: p. 191-200.
109. Forman, H.J., *Use and abuse of exogenous H2O2 in studies of signal transduction*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(7): p. 926-32.
110. Liu, H., et al., *Redox-dependent transcriptional regulation*. *Circ Res*, 2005. **97**(10): p. 967-74.
111. Frank, G.D., et al., *N-acetylcysteine inhibits angiotensin ii-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase and epidermal growth factor receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **280**(4): p. 1116-9.
112. Chen, X.L., et al., *Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1998. **83**(9): p. 952-9.
113. Liu, J., et al., *Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced oxidative stress via Csk-mediated inhibition of Src activity*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(4): p. H1714-21.
114. Roskoski, R., Jr., *Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **331**(1): p. 1-14.
115. Pinzar, E., et al., *Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(22): p. 5100-4.

116. Frank, G.D., et al., *Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II*. *Endocrinology*, 2000. **141**(9): p. 3120-6.
117. Touyz, R.M., et al., *Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003. **81**(2): p. 159-67.
118. El-Mowafy, A.M., M. Alkhalaf, and H.A. El-Kashef, *Resveratrol reverses hydrogen peroxide-induced proliferative effects in human coronary smooth muscle cells: a novel signaling mechanism*. *Arch Med Res*, 2008. **39**(2): p. 155-61.
119. Ross, S.H., et al., *Differential redox regulation within the PTP superfamily*. *Cell Signal*, 2007. **19**(7): p. 1521-30.
120. Stoker, A.W., *Protein tyrosine phosphatases and signalling*. *J Endocrinol*, 2005. **185**(1): p. 19-33.
121. Doan, T., et al., *Selective down-regulation of angiotensin II receptor type 1A signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells*. *Cell Signal*, 2004. **16**(3): p. 301-11.
122. Viedt, C., et al., *Role of p22phox in angiotensin II and platelet-derived growth factor AA induced activator protein 1 activation in vascular smooth muscle cells*. *J Mol Med*, 2004. **82**(1): p. 31-8.
123. Ortego, M., et al., *Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells*. *Atherosclerosis*, 1999. **147**(2): p. 253-61.
124. Rocic, P., P. Seshiah, and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species sensitivity of angiotensin II-dependent translation initiation in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 36973-9.
125. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. *Physiol Rev*, 1979. **59**(3): p. 527-605.
126. Antunes, F. and E. Cadenas, *Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes*. *FEBS Lett*, 2000. **475**(2): p. 121-6.
127. Hyslop, P.A., et al., *Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(4): p. 1665-75.
128. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease*. *Annu Rev Nutr*, 1996. **16**: p. 33-50.
129. Loschen, G., et al., *Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide*. *FEBS Lett*, 1974. **42**(1): p. 68-72.
130. Suttorp, N., W. Toepfer, and L. Roka, *Antioxidant defense mechanisms of endothelial cells: glutathione redox cycle versus catalase*. *Am J Physiol*, 1986. **251**(5 Pt 1): p. C671-80.
131. Kang, S.W., et al., *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(11): p. 6297-302.
132. Halliwell, B., *Antioxidant characterization. Methodology and mechanism*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **49**(10): p. 1341-8.
133. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(6): p. 1841-56.
134. Ciocoiu, M., M. Badescu, and I. Padurarau, *Protecting antioxidative effects of vitamins E and C in experimental physical stress*. *J Physiol Biochem*, 2007. **63**(3): p. 187-94.
135. de la Lastra, C.A. and I. Villegas, *Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 5): p. 1156-60.
136. Halliwell, B., et al., *The characterization of antioxidants*. *Food Chem Toxicol*, 1995. **33**(7): p. 601-17.
137. Gerschman, R., et al., *Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common*. *Science*, 1954. **119**(3097): p. 623-6.
138. Fridovich, I., *Superoxide dismutases*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1986. **58**: p. 61-97.

139. Chae, H.Z., et al., *Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin*. *Diabetes Res Clin Pract*, 1999. **45**(2-3): p. 101-12.
140. Rhee, S.G., H.Z. Chae, and K. Kim, *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling*. *Free Radic Biol Med*, 2005. **38**(12): p. 1543-52.
141. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 1-85.
142. Aruoma, O.I. and B. Halliwell, *Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?* *Biochem J*, 1987. **241**(1): p. 273-8.
143. Fang, Y.Z., S. Yang, and G. Wu, *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. *Nutrition*, 2002. **18**(10): p. 872-9.
144. Sies, H., *Glutathione and its role in cellular functions*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(9-10): p. 916-21.
145. Topinka, J., et al., *The influence of alpha-tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes*. *Mutat Res*, 1989. **225**(3): p. 131-6.
146. Carr, A.C., B.Z. Zhu, and B. Frei, *Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E)*. *Circ Res*, 2000. **87**(5): p. 349-54.
147. Bardia, A., et al., *Efficacy of antioxidant supplementation in reducing primary cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis*. *Mayo Clin Proc*, 2008. **83**(1): p. 23-34.
148. Halliwell, B., *Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?* *Cardiovasc Res*, 2007. **73**(2): p. 341-7.
149. Mira, L., et al., *Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity*. *Free Radic Res*, 2002. **36**(11): p. 1199-208.
150. D'Archivio, M., et al., *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. *Ann Ist Super Sanita*, 2007. **43**(4): p. 348-61.
151. Daniel, O., et al., *Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides*. *Environ Health Perspect*, 1999. **107 Suppl 1**: p. 109-14.
152. Deisseroth, A. and A.L. Dounce, *Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role*. *Physiol Rev*, 1970. **50**(3): p. 319-75.
153. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(6): p. 493-506.
154. Nonomura, S., H. Kanagawa, and A. Makimoto, *[Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (Polygonum Cuspidatum Sieb. Et Zucc.)]*. *Yakugaku Zasshi*, 1963. **83**: p. 988-90.
155. Langcake, P.P., R.P., *"The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury; Physiological Plant Pathology*, 1976. **9**: p. 77-86.
156. Creasy, L.L.C., M., *Phytoalexin production potential of grape berries*; *Journal of the American Society for Horticultural Science*; 1988. **113**: p. 230-234.
157. Gusman, J., H. Malonne, and G. Atassi, *A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(8): p. 1111-7.
158. Burns, J., et al., *Plant foods and herbal sources of resveratrol*. *J Agric Food Chem*, 2002. **50**(11): p. 3337-40.
159. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. *Lancet*, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
160. Stojanovic, S., H. Sprinz, and O. Brede, *Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation*. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **391**(1): p. 79-89.
161. Delmas, D., B. Jannin, and N. Latruffe, *Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing*. *Mol Nutr Food Res*, 2005. **49**(5): p. 377-95.

162. Li, Y., Z. Cao, and H. Zhu, *Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress*. *Pharmacol Res*, 2006. **53**(1): p. 6-15.
163. Jang, M. and J.M. Pezzuto, *Cancer chemopreventive activity of resveratrol*. *Drugs Exp Clin Res*, 1999. **25**(2-3): p. 65-77.
164. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. *Science*, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
165. Frankel, E.N., A.L. Waterhouse, and J.E. Kinsella, *Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol*. *Lancet*, 1993. **341**(8852): p. 1103-4.
166. Belguendouz, L., L. Fremont, and A. Linard, *Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **53**(9): p. 1347-55.
167. Fremont, L., L. Belguendouz, and S. Delpal, *Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids*. *Life Sci*, 1999. **64**(26): p. 2511-21.
168. Brito, P., L.M. Almeida, and T.C. Dinis, *The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protection against LDL oxidation*. *Free Radic Res*, 2002. **36**(6): p. 621-31.
169. Tsai, S.H., S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin, *Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol*. *Br J Pharmacol*, 1999. **126**(3): p. 673-80.
170. Lin, M.T., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation*. *Mol Pharmacol*, 2003. **64**(5): p. 1029-36.
171. El-Mowafy, A.M. and R.E. White, *Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects*. *FEBS Lett*, 1999. **451**(1): p. 63-7.
172. She, Q.B., et al., *Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase*. *Cancer Res*, 2001. **61**(4): p. 1604-10.
173. Frojdo, S., et al., *Resveratrol is a class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor*. *Biochem J*, 2007. **406**(3): p. 511-8.
174. Sexton, E., et al., *Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells*. *Mol Cancer*, 2006. **5**: p. 45.
175. Aziz, M.H., et al., *Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(5): p. 1335-41.
176. Bhardwaj, A., et al., *Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells*. *Blood*, 2007. **109**(6): p. 2293-302.
177. Bai, Y., et al., *Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo*. *Cancer Sci*, 2009.
178. Jiang, H., et al., *Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells*. *J Exp Ther Oncol*, 2009. **8**(1): p. 25-33.
179. Li, Y., et al., *Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006. **135**(3): p. 181-92.
180. Haider, U.G., et al., *Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells*. *Mol Pharmacol*, 2002. **62**(4): p. 772-7.
181. Draczynska-Lusiak, B., Y.M. Chen, and A.Y. Sun, *Oxidized lipoproteins activate NF-kappaB binding activity and apoptosis in PC12 cells*. *Neuroreport*, 1998. **9**(3): p. 527-32.

182. Holmes-McNary, M. and A.S. Baldwin, Jr., *Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I $\kappa$ B kinase*. *Cancer Res*, 2000. **60**(13): p. 3477-83.
183. Manna, S.K., A. Mukhopadhyay, and B.B. Aggarwal, *Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation*. *J Immunol*, 2000. **164**(12): p. 6509-19.
184. Donnelly, L.E., et al., *Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(4): p. L774-83.
185. Subbaramaiah, K., et al., *Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(34): p. 21875-82.
186. Kundu, J.K. and Y.J. Surh, *Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- $\kappa$ B and AP-1 as potential targets*. *Mutat Res*, 2004. **555**(1-2): p. 65-80.
187. Yu, R., et al., *Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways*. *Mol Pharmacol*, 2001. **60**(1): p. 217-24.
188. Chan, M.M., et al., *Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **60**(10): p. 1539-48.
189. Horvath, Z., et al., *Synergistic action of resveratrol, an ingredient of wine, with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(3): p. 329-35.
190. Fontecave, M., et al., *Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase*. *FEBS Lett*, 1998. **421**(3): p. 277-9.
191. Stivala, L.A., et al., *Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(25): p. 22586-94.
192. Locatelli, G.A., et al., *Inhibition of mammalian DNA polymerases by resveratrol: mechanism and structural determinants*. *Biochem J*, 2005. **389**(Pt 2): p. 259-68.
193. Altieri, D.C., *Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm*. *J Cell Biochem*, 2004. **92**(4): p. 656-63.
194. Zhao, W., et al., *Resveratrol down-regulates survivin and induces apoptosis in human multidrug-resistant SPC-A-1/CDDP cells*. *Oncol Rep*. **23**(1): p. 279-86.
195. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol*. *Cancer Res*, 2004. **64**(1): p. 337-46.
196. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review*. *Cancer Detect Prev*, 2006. **30**(3): p. 217-23.
197. Pace-Asciak, C.R., et al., *The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease*. *Clin Chim Acta*, 1995. **235**(2): p. 207-19.
198. Pinto, M.C., J.A. Garcia-Barrado, and P. Macias, *Resveratrol is a potent inhibitor of the dioxygenase activity of lipoxygenase*. *J Agric Food Chem*, 1999. **47**(12): p. 4842-6.
199. Kimura, Y., H. Okuda, and S. Arichi, *Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **834**(2): p. 275-8.
200. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan*. *Nature*, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
201. Saunders, L.R. and E. Verdin, *Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging*. *Oncogene*, 2007. **26**(37): p. 5489-504.
202. Autiero, I., S. Costantini, and G. Colonna, *Human sirt-1: molecular modeling and structure-function relationships of an unordered protein*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7350.
203. Vaziri, H., et al., *hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase*. *Cell*, 2001. **107**(2): p. 149-59.
204. Yang, Y., et al., *Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation*. *EMBO J*, 2005. **24**(5): p. 1021-32.

205. Rodgers, J.T., et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 113-8.
206. Bass, T.M., et al., *Effects of resveratrol on lifespan in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(10): p. 546-52.
207. Bemis, J.E., et al., *Discovery of oxazolo[4,5-b]pyridines and related heterocyclic analogs as novel SIRT1 activators*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(8): p. 2350-3.
208. Basly, J.P. and M.C. Lavier, *Dietary phytoestrogens: potential selective estrogen enzyme modulators?* Planta Med, 2005. **71**(4): p. 287-94.
209. Oseni, T., et al., *Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens*. Planta Med, 2008. **74**(13): p. 1656-65.
210. Wu, J.M., et al., *Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review)*. Int J Mol Med, 2001. **8**(1): p. 3-17.
211. Saiko, P., et al., *Novel resveratrol analogs induce apoptosis and cause cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells: inhibition of ribonucleotide reductase activity*. Oncol Rep, 2008. **19**(6): p. 1621-6.
212. Pan, M.H., et al., *Pterostilbene inhibited tumor invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1234-42.
213. Ovesna, Z. and K. Horvathova-Kozics, *Structure-activity relationship of trans-resveratrol and its analogues*. Neoplasma, 2005. **52**(6): p. 450-5.
214. Queiroz, A.N., et al., *A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol*. Eur J Med Chem, 2009. **44**(4): p. 1644-9.
215. Yang, Y.T., et al., *Resveratrol analog-3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cells by suppressing the MAPK pathway and decreasing matrix metalloproteinase-2 expression*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53**(3): p. 407-16.
216. Alex, D., et al., *Resveratrol derivative, trans-3,5,4'-trimethoxystilbene, exerts antiangiogenic and vascular-disrupting effects in zebrafish through the downregulation of VEGFR2 and cell-cycle modulation*. J Cell Biochem. **109**(2): p. 339-46.
217. Schneider, Y., et al., *Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization*. Int J Cancer, 2003. **107**(2): p. 189-96.
218. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
219. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
220. Jakubowski, W. and G. Bartosz, *2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?* Cell Biol Int, 2000. **24**(10): p. 757-60.
221. Zhou, M., et al., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. Anal Biochem, 1997. **253**(2): p. 162-8.
222. Rahman, I., S.K. Biswas, and P.A. Kirkham, *Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1439-52.
223. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(11): p. 657-64.
224. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
225. Murao, K., et al., *TNF- $\alpha$  stimulation of MCP-1 expression is mediated by the Akt/PKB signal transduction pathway in vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 791-6.
226. Hermann, C., et al., *Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(2): p. 402-9.
227. Toker, A. and A.C. Newton, *Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8271-4.
228. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation*. J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24313-6.

- 
229. Cobb, M.H. and E.J. Goldsmith, *How MAP kinases are regulated*. J Biol Chem, 1995. **270**(25): p. 14843-6.
230. Baas, A.S. and B.C. Berk, *Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1995. **77**(1): p. 29-36.
231. Servant, M.J., E. Giasson, and S. Meloche, *Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16047-52.
232. Bregeon, J., et al., *Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(5): p. C1062-70.
233. Huot, J., et al., *Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells*. Circ Res, 1997. **80**(3): p. 383-92.
234. Gonzalez-Pacheco, F.R., et al., *Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(3): p. 392-8.
235. Roveri, A., et al., *Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells*. Arch Biochem Biophys, 1992. **297**(2): p. 265-70.
236. Martin-Garrido, A., et al., *Hydrogen peroxide down-regulates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor content through proteasome activation*. Free Radic Biol Med, 2009. **47**(10): p. 1362-70.
237. Holgado-Madruga, M. and A.J. Wong, *Gab1 is an integrator of cell death versus cell survival signals in oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(13): p. 4471-84.
238. Abe, J., et al., *Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16586-90.
239. Guyton, K.Z., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4138-42.
240. Viedt, C., et al., *Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 940-8.
241. Wang, D., X. Yu, and P. Brecher, *Nitric oxide and N-acetylcysteine inhibit the activation of mitogen-activated protein kinases by angiotensin II in rat cardiac fibroblasts*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 33027-34.
242. Soleas, G.J., E.P. Diamandis, and D.M. Goldberg, *Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?* Clin Biochem, 1997. **30**(2): p. 91-113.
243. Slater, S.J., et al., *Inhibition of protein kinase C by resveratrol*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1637**(1): p. 59-69.



## VII Appendix



## VII Appendix

### 1 Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung in Originalsprache	Deutsche Bezeichnung
$\mu\text{M}$		mikromolar
ACE	Angiotensin Converting Enzyme	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase	eine Disintegrin- und Metalloproteinase
Akt		Proteinkinase B
Ang II		Angiotensin II
AP 1		Aktivator Protein 1
AR		Amplex Red™
AT <sub>1</sub> R		Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT <sub>2</sub> R		Angiotensin II Rezeptor Typ 2
ATP		Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>		Calciumion
COX		Cyclooxygenase
CS	Calf serum	Kälberserum
DAG		Diacylglycerol
DCF		2,7-Dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DPI		Diphenyleneiodonium
ECM	Extracellular matrix	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal growth factor	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Rezeptor des EGF

<b>ErbB</b>		EGFR-Familie
<b>Erk</b>	Extracellular signal regulated kinase	Kinase, die durch extrazelluläre Signale reguliert wird
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting	Durchflusszytometrie
<b>Fe<sup>2+/3+</sup></b>		Eisenionen
<b>FOXO</b>	Forkhead box protein O	
<b>GPx</b>		Glutathionperoxidase
<b>GSK</b>		Glycogensynthasekinase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>		Wasserstoffperoxid
<b>HB-EGF</b>	Heparin-binding-epidermal growth factor	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor
<b>H<sub>2</sub>DCF</b>		2,7-Dihydrochlorofluorescein
<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>		2,7-Dihydrochlorofluorescein-diacetat
<b>HER</b>	Human epidermal growth factor receptor	Humaner EGF-Rezeptor
<b>HOCl</b>		Hypochlorige Säure
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase	
<b>HSP</b>	Heat shock protein	Hitzeschockprotein
<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis protein	Apoptose-Inhibitor
<b>IKK</b>		IkappaB Kinase
<b>iNOS</b>		Induzierbare NO-Synthase
<b>IP<sub>3</sub></b>		Inositoltriphosphat
<b>JNK</b>		c-Jun N-terminale Kinase
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein	Lipoprotein geringer Dichte
<b>LOOH</b>		Lipidperoxid
<b>MAPK</b>		Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MAPKAPK</b>		Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase

<b>MEK</b>		MAPK/Erk-Kinase
<b>mM</b>		millimolar
<b>MMP</b>		Matrix-Metalloproteinase
<b>MO</b>		Molekül-Orbital
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin	Angriffspunkt von Rapamycin in Säugetieren
<b>NAC</b>		N-Acetylcystein
<b>NaCl</b>		Natriumchlorid
<b>NADH</b>		Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
<b>NADPH</b>		Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
<b>NF kB</b>		Nukleärer Faktor kappaB
<b>nM</b>		Nanomolar
<b>NO</b>		Stickstoffmonoxid
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>		Superoxidanion
<b>O<sub>2</sub></b>		Sauerstoff
<b>OH<sup>•</sup></b>		Hydroxylradikal
<b>ONOO<sup>•</sup></b>		Peroxyinitrit
<b>oxLDL</b>		Oxidiertes LDL
<b>p38</b>		p38MAPK
<b>p70<sup>SEK</sup></b>		p70 S6Kinase
<b>PA</b>	Phosphatidic Acid	Phosphatidylsäure
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor	
<b>PDGFR</b>	Platelet derived growth factor receptor	Rezeptor des PDGF
<b>PDK</b>	3-Phosphoinositide dependent protein kinase	3-Phosphoinositide-abhängige Proteinkinase
<b>PI3K</b>		Phosphatidyl-inositol-3-Kinase

<b>PIP<sub>3</sub></b>		Phosphatidyltriphosphat
<b>PKC</b>		Proteinkinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>		Phospholipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>		Phospholipase C
<b>Prx</b>		Peroxiredoxin
<b>PTP</b>		Proteintyrosinphosphatase
<b>R1</b>		3,5-Dihydroxy 4'-methoxystilben
<b>R2</b>		3-Hydroxy-4',5-dimethoxystilben
<b>RAAS</b>		Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>ROO<sup>•</sup></b>		Peroxyradikal
<b>ROOH</b>		Hydroperoxid
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen species	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RV</b>		Resveratrol
<b>S</b>		Schwefelatom
<b>Ser</b>		Serin
<b>-SH</b>		Thiolgruppe
<b>SOD</b>		Superoxiddismutase
<b>TGF</b>	Transforming growth factor	Transformierender Wachstumsfaktor
<b>Thr</b>		Threonin
<b>VSMC</b>	Vascular smooth muscle cells	Glatte Gefäßmuskelzelle

Tabelle 3: **Verwendete Abkürzungen**

---

## 2 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

Name: Julia Geßlbauer  
Geburtsdatum/-ort: 10.03.1986, Bruck/Mur  
Staatsangehörigkeit: Österreich

### Ausbildung

---

Seit 10/2004 Pharmaziestudium Universität Wien  
10/2009 Tutorin bei den Übungen *Allgemeine Mikrobiologie und Hygiene*  
1996-2004 Bundesgymnasium Kapfenberg  
1992-1996 Volksschule Stanz



---

### 3 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Verena Dirsch für die Möglichkeit bedanken, meine Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen.

Prof. Erker und seinen Mitarbeitern gilt mein Dank für die Synthese der Resveratrol-Derivate.

Ich bedanke mich bei Conny und Mario, die mir die nötigen Grundtechniken beigebracht haben. Danke Conny, dass du mir ein so interessantes Teilprojekt deiner Dissertation überlassen hast und meine Fragen, Ideen und Ergebnisse immer ernst genommen hast.

Mein Dank gebührt auch Atanas, der mir mit seinem Rat immer zur Seite gestanden ist und dessen Enthusiasmus mich sehr motiviert hat. Ich möchte auch Elke fürs Korrekturlesen und die hilfreichen Tipps beim Schreiben danken.

Es hat mir sehr viel Spaß gemacht ein Teil der Arbeitsgruppe von Prof. Dirsch zu sein. Einerseits weil Tenzi und Daniel dafür gesorgt haben, dass der Laboralltag so reibungslos verläuft und zum anderen wegen dem freundlichen Umgang aller Kollegen. Im Speziellen möchte ich hier noch Helge für die vielen Tees danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester. Ich bin so dankbar für euch und eure bedingungslose Unterstützung.

Auch meinen Freunden, die mir mit fachlichem bzw. emotionalem Rat zur Seite gestanden sind, möchte ich danken.