

**Einfluss von Resveratrol auf die Molekularen  
Prozesse im Skelettmuskelgewebe der Maus**

MASTERARBEIT

im Studiengang Zelluläre und Molekulare Biologie

der Universität Potsdam

zur Erlangung des akademischen Grades eines *Master of Science*

vorgelegt von

Stefanie Becker

Potsdam, November 2012



Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem in der Forschungsgruppe für Nutrigenomik und Genregulation unter der Leitung von Herrn Dr. Sascha Sauer angefertigt.

**Gutachter: Dr. Sascha Sauer**

Forschungsgruppe für Nutrigenomik und Genregulation

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

Berlin-Dahlem, Deutschland

**Prof. Dr. Ralph Gräf**

Arbeitsgruppe Zellbiologie

Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam

Potsdam-Golm, Deutschland

# ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit, dass ich die beiliegende Masterarbeit mit dem Titel „*Einfluss von Resveratrol auf die Molekularen Prozesse im Skelettmuskelgewebe der Maus*“ selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen der Arbeit, die ich aus diesen Quellen und Hilfsmitteln dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen habe, sind kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis aufgeführt. Weiterhin versichere ich, dass weder ich noch andere diese Arbeit weder in der vorliegenden noch in einer mehr oder weniger abgewandelten Form als Leistungsnachweis bereits verwendet haben oder noch verwenden werden.

.....

Datum

.....

Unterschrift

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Masterarbeit begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ein besonderer Dank geht an **Herrn Dr. Sascha Sauer**, der mir die Möglichkeit gab diese Arbeit als Teil seiner Arbeitsgruppe zu erarbeiten und der sie als Gutachter bis zum Ende begleitete. **Herrn Prof. Dr. Ralph Gräf** danke ich für die Übernahme des Gutachtens meiner Masterarbeit seitens der Universität Potsdam. Vielen Dank an Frau **Dr. Chung-Ting Han** für die Methodenkonzeption und die Betreuung während der Experimentierphase. Des Weiteren gilt mein ganz herzlicher Dank **Susanne Holzhauser**, die mir u.a. eine besondere Hilfe im Fertigstellungsprozess meiner Arbeit war. Auch an **Cornelius Fischer** ein großes Dankeschön für die vielen fachlichen wie auch menschlichen Diskussionen und konstruktiven Ratschläge. Ich danke der **gesamten AG**, dabei allen voran **Anja Freiwald**, **Dr. Christopher Weidner** und **Radmila Feldmann**, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und die mir mit kleinen Tipps und Tricks das Arbeiten erleichterten. **Meiner Familie** danke ich für den Rückhalt während meines gesamten Studiums und für die Begleitung und Unterstützung auf meinem Lebensweg. Insbesondere möchte ich meinem Freund **Martin Rimke** für all seine Liebe und Geduld danken!

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 VORKOMMEN UND ENTDECKUNG VON RESVERATROL .....	1
1.2 PHYSIOLOGISCHE WIRKUNG VON RESVERATROL.....	2
1.2.1 Gesundheitsfördernde Effekte.....	2
1.2.2 Resveratrol wirkt lebensverlängernd .....	3
1.2.3 Resveratrol als Kalorienrestriktionsmimetikum .....	4
1.3 RESVERATROL UND DAS METABOLISCHE SYNDROM.....	4
1.3.1 Der Begriff des Metabolischen Syndroms .....	4
1.3.2 Pathophysiologie .....	5
1.3.3 Bedeutung des Skelettmuskelgewebes bei der Ausbildung des Krankheitsbildes .....	7
1.3.4 Behandlung des Metabolischen Syndroms .....	7
1.4 RESVERATROL ALS MÖGLICHES THERAPEUTIKUM .....	8
1.4.1 Molekulare Grundlagen der Stoffwechsellumstellung unter Kalorienrestriktion.....	10
1.4.1.1 Regulation von Sirt1, Pgc1 $\alpha$ und Pdk4.....	10
1.4.1.2 NAD <sup>+</sup> -abhängige Sirt1-Aktivität.....	12
1.4.1.3 Wechselbeziehung zwischen Sirt1 und AMPK.....	13
1.4.2 Resveratrol reguliert Energiestoffwechselprozesse .....	14
1.5 ANTIOXIDATIVE WIRKUNG VON RESVERATROL .....	15
1.6 RESVERATROL, SIRT1 UND CHROMATINUMBAU .....	15
1.6.1 Sirt1 als Histondeacetylase .....	15
1.6.2 Epigenetische Veränderungen und die Ausbildung von Chromatinstrukturen.....	16
1.6.3 Sirt1 und die Ausbildung von Fakultativem Heterochromatin .....	17
1.7 ZIEL DIESER ARBEIT .....	18
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1 MATERIAL .....	20
2.2 METHODEN .....	28
2.2.1 Versuchstiere .....	28

2.2.2	<i>Zellkulturarbeiten</i> .....	28
2.2.3	<i>Genexpressionsanalyse</i> .....	31
2.2.4	<i>Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)</i> .....	35
2.2.5	<i>Quantifizierung von Proteinen und posttranslationalen Proteinmodifikationen</i> .....	37
2.2.6	<i>Analyse von Metaboliten</i> .....	40
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>44</b>
3.1	GEWICHTSENTWICKLUNG DER VERSUCHSTIERE .....	44
3.2	STOFFWECHSELREGULATION.....	45
3.2.1	<i>sirt1, pgc1a und pdk4</i> .....	45
3.2.2	<i>Pdk4</i> .....	46
3.2.3	<i>Phosphorylierung von PdhE1a</i> .....	47
3.2.4	<i>Pyruvat und Lactat</i> .....	49
3.2.5	<i>NAD</i> .....	52
3.2.6	<i>ADP und ATP</i> .....	54
3.3	ANTIOXIDATIVE WIRKUNG VON RESVERATROL .....	56
3.3.1	<i>Ucp3</i> .....	56
3.3.2	<i>sod1, nrf2 und foxO3a</i> .....	58
3.3.3	<i>JNK-Phosphorylierung</i> .....	59
3.4	CHIP-QPCR VON H1K26AC .....	61
3.4.1	<i>Gewebeaufbereitung</i> .....	61
3.4.2	<i>H1K26Ac am Sirt1-Locus</i> .....	64
3.4.3	<i>H1K26Ac am Pparg- und Lxra-Locus</i> .....	64
3.4.4	<i>ppary und lxra</i> .....	65
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>67</b>
4.1	DISKUSSION DER ZELLKULTUREXPERIMENTE.....	67
4.1.1	<i>Pdk4 und PdhE1a</i> .....	67
4.1.2	<i>Pyruvat und Lactat</i> .....	67
4.1.3	<i>NAD</i> .....	68
4.1.4	<i>ATP und ADP</i> .....	69
4.1.5	<i>Ucp3 und JNK</i> .....	70
4.2	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ZELL- UND TIERMODELL.....	71
4.2.1	<i>Einfluss der Zellkulturbedingungen</i> .....	71

4.2.2	<i>Komplexe Gewebe</i> .....	72
4.2.3	<i>Metabolisierung und Bioverfügbarkeit von Resveratrol</i> .....	73
4.3	<b>DISKUSSION DER <i>IN VIVO</i>-ERGEBNISSE</b> .....	74
4.3.1	<i>Gewichtsentwicklung der Tiere</i> .....	74
4.3.2	<i>Stoffwechselregulation</i> .....	74
4.3.3	<i>Antioxidative Mechanismen</i> .....	77
4.3.4	<i>H1K26Ac-ChIP</i> .....	78
4.4	<b>FAZIT</b> .....	79
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>96</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

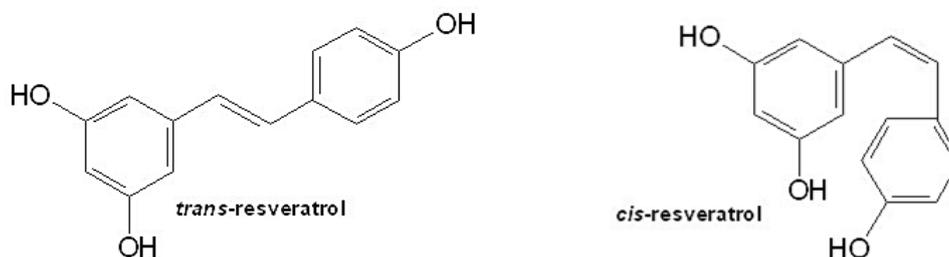
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIP-qPCR	Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender quantitativer Echtzeit-PCR
ChIP-Seq	Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung
C <sub>t</sub> -Wert	<i>Cycle Threshold</i> -Wert
D oder DMSO	Dimethylsulfoxid
Err- $\alpha$	<i>estrogen-related receptor alpha</i>
Ezh2	Histon-Lysin-N-Methyltransferase Ezh2
F	Fetteiche Diät
F+Rsv	Fetteiche Diät mit Resveratrolzusatz
FA	<i>fatty acids</i> , Fettsäuren
FoxO3a	<i>forkhead box protein O3a</i>
H1	Histon 1
H1K26	Lysin 26 von Histon 1 ohne posttranslationale Modifikation
H1K26Ac	Acylierung am Lysin 26 von Histon 1
Hdac	Histondeacetylase
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HP1	Heterochromatin Protein 1
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Kontrolldiät
K+Rsv	Kontrolldiät mit Resveratrolzusatz
Ldh	Lactatdehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Lkb1	<i>liver kinase B1</i>
Lxra	<i>liver X receptor <math>\alpha</math></i>
M	<i>mean</i> , Mittelwert
NAD	Allgemeine Bezeichnung für sowohl die oxidierte als auch die reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotids

NAD <sup>+</sup>	Oxidierter Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotids
NADH	Reduzierter Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotids
NADt	gesamtes in der Zelle vorliegendes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (sowohl oxidierte als auch reduzierte Form)
Nampt	<i>nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>
Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
Pdc	<i>pyruvate dehydrogenase complex</i> , Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PdhE1 $\alpha$	Pyruvatdehydrogenase E1 alpha
Pdk4	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4
Pgc1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha</i>
p-JNK	phosphorylierte c-Jun N-terminale Kinase
Ppar $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
p-PdhE1 $\alpha$	Phosphorylierte Pyruvatdehydrogenase E1 alpha
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des arithmetischen Mittels
Sir2	<i>silent mating information regulation 2</i>
Sirt1	<i>silent information regulator type 1</i>
Sod1	Superoxiddismutase 1
Suv39h1	Histon-Lysin N-Methyltransferase Suv39h1
TG	Triglyzeride
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Ucp3	<i>uncoupling protein 3</i> , entkoppelndes Protein 3
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 VORKOMMEN UND ENTDECKUNG VON RESVERATROL

Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilben) (Abbildung 1) fungiert natürlicherweise in einer ganzen Reihe von Pflanzen als Phytoalexin, dessen Aufgabe es ist, den Organismus vor schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen. Die Synthese des Stressmetaboliten wird bei Gewebeerstörung, Parasiten- und Pilzinfektionen, UV-Bestrahlung und Ozonbelastung induziert und er reichert sich vor allem in den Blättern und den Fruchtschalen der Pflanzen an. Chemisch gesehen ist Resveratrol eine Polyphenolverbindung und als solche werden ihm antioxidative Eigenschaften zugeschrieben.



**Abbildung 1. Chemische Struktur der *trans*- und *cis*-Konfiguration des Resveratrols.** Beide Isomere kommen natürlicherweise vor, wobei *trans*-Resveratrol die häufigere und biologisch aktivere Form darstellt.

Der Mensch nimmt Resveratrol in geringen Konzentrationen über pflanzliche Lebensmittel wie Weintrauben, Maulbeeren, Blaubeeren, Pflaumen und Erdnüsse zu sich. Vor allem Weintrauben und der daraus gewonnene Rotwein gelten als Hauptaufnahmequelle. Abhängig von den Kulturbedingungen der Weinreben kann Rotwein bis zu 14 mg Resveratrol pro Liter aufweisen [1].

In der traditionellen japanischen und chinesischen sowie in der hinduistischen Ayurvedamedizin spielen resveratrolhaltige Pflanzenextrakte schon seit Urzeiten eine wichtige Rolle. So wird zum Beispiel der Japanische Staudenknöterich *Polygonum cuspidatum*, in dem die bisher höchste Menge an Resveratrol gemessen wurde, zur Behandlung von Pilzinfektionen, Hautentzündungen, Leber- und Herzerkrankungen eingesetzt [2, 3]. Erstmals beschrieben wurde Resveratrol 1940 von Takaoka, der den Naturstoff aus den Wurzeln des giftigen, aber medizinisch wertvollen Weißen Gerners *Veratrum album* isolierte. Auf dieser Entdeckung begründet sich auch die Namensgebung des Naturstoffes. Resveratrol ist ein Resorcinol Derivat, dessen Vorkommen in einer Veratrum Art zum ersten Mal nachgewiesen wurde.

Weltweite Aufmerksamkeit erlangte Resveratrol jedoch erst Anfang der 90er Jahre, als Rotweinkonsum in Verbindung mit dem Französischen Paradoxon gebracht wurde [4-6]. Das Französische Paradoxon bezeichnet das epidemiologische Phänomen, dass in der französischen Bevölkerung trotz der Bevorzugung einer eher cholesterinreichen Kost weniger häufig Herzerkrankungen auftreten als in anderen westlichen Populationen. Verantwortlich dafür wurde der

erhöhte Rotweinkonsum der Franzosen gemacht und es war schnell ein Weininhaltsstoff gefunden, der dies begründen sollte - das Resveratrol. Tatsächlich relativierten nachfolgende Untersuchungen diese Annahme und legten die Vermutung nahe, dass der enthaltene Alkohol die positiven Wirkungen bedingt [7, 8]. Nichtsdestotrotz erzielten weitere Studien in den darauffolgenden Jahren vielfältige positive Effekte bei oraler Gabe im Ratten- und Mausmodell bezüglich des Vermögens von Resveratrol altersbedingten Erkrankungen zu entgegnen und durchaus auch protektiv auf Herz und Kreislauf zu wirken.

## 1.2      PHYSIOLOGISCHE WIRKUNG VON RESVERATROL

### 1.2.1   *Gesundheitsfördernde Effekte*

Eine ganze Reihe von Arbeiten konnte in den vergangenen Jahren zeigen, dass Resveratrol, trotz der Zweifel am Zusammenhang mit dem Französischen Paradoxon, eine protektive Wirkung gegenüber Arteriosklerose [9-12] und ihrer Folgeerkrankungen wie Schlaganfall und Herzinfarkt besitzt [13-16]. Weiterhin wurde eine Wirksamkeit gegen zu hohen Blutdruck [17] und Herzrhythmusstörungen [18] sowie eine verstärkte Vasodilatation der Gefäße [19, 20] nachgewiesen. Die im Herz-Kreislauf-System von Resveratrol ausgelösten Effekte werden u.a. der Stimulation der Stickstoffmonoxidproduktion [21, 22] und den antioxidativen [23, 24] und chelatbildenden [25] Eigenschaften des Stoffes zugeschrieben. Eine neuroprotektive Wirkung von Resveratrol zeigte sich nicht nur nach einem Schlaganfall [16], sondern auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington [26, 27], Alzheimer [28] und Parkinson [29-31].

Besonders viele wissenschaftliche Arbeiten befassen sich mit der Wirkung von Resveratrol auf die Entstehung und Behandlung von diversen Krebserkrankungen. 1997 gelang es Jang et al. als erste, die chemopräventiven Eigenschaften des Stoffes nachzuweisen. Sie zeigten einen inhibitorischen Effekt von Resveratrol auf alle drei Stufen der Karzinogenese und konnten seine Wirksamkeit zum einen gegenüber der Ausbildung von Tumorstufen und zum anderen gegen das Wachstum von Tumoren in einem Hautkrebsmodell belegen [32]. Auf diese vielversprechende Studie folgten unzählige weitere, die eine Unterdrückung der Karzinogenese und eine Verzögerung des Tumorwachstums in der Haut [32], den Verdauungs- [33, 34] und Atmungsorganen [34, 35], der Brust [36], der Prostata [37] und im Gehirn [34, 38] dokumentieren. Eine Vielzahl der Untersuchungen machten als Ursache für die krebsvorbeugende Wirkung einen Arrest des Zellzyklus' [39] und als Folge die Inhibition der Proliferation [40], das Einleiten der Apoptose [38] und das Aufhalten der Angiogenese [41, 42] aus.

Neben der Vielzahl der bereits genannten gesundheitsrelevanten Effekte, besitzt Resveratrol auch das Potential autoimmunbedingte Entzündungserkrankungen in verschiedenen Tiermodellen zu lindern. Eine antivirale Wirkung konnte in *in vivo* Studien nachgewiesen werden, in denen Resveratrol die Replikation von Herpes-simplex-Viren hemmte und damit den Ausbruch der Krankheit eindämmte

[43]. Die Gabe von Resveratrol erwies sich auch bei der Infektion mit Influenza A Viren als erfolgreich [44]. Mehrere *in vitro* Experimente belegten zudem eine antibakterielle [45, 46] und antifungizide [47] Wirkung von Resveratrol.

### 1.2.2 *Resveratrol wirkt lebensverlängernd*

Für das Auftreten der meisten der oben aufgeführten Erkrankungen stellt das Alter einen entscheidenden Risikofaktor dar. Um eine Zunahme der Lebensqualität und -dauer zu ermöglichen, müssen altersbedingte Degenerationsprozesse des Körpers aufgehalten bzw. verzögert werden.

Tatsächlich wurde bereits 1935 eine Methode entdeckt [48], die effektiv und reproduzierbar zu einer Verbesserung des Gesundheitszustands und zu einer Verlängerung der Lebensspanne bei verschiedensten Tierarten führt [48-53]. Bei dieser wird die Nahrungsmenge dauerhaft um 30 bis 50% gegenüber einer *ad-libitum*-Nahrungszufuhr unter Vermeidung einer Mangelernährung reduziert. Bei Ratten konnte mit dieser Maßnahme eine Lebensverlängerung um bis zu 50% erzielt werden [48]. Der zugrundeliegende Mechanismus, der diese Effekte auslöst ist jedoch noch weitestgehend unverstanden, wahrscheinlich spielt bei der Wirkungsvermittlung aber das Enzym Sirtuin-1 (*Silent Information Regulator Type 1*, Sirt1) eine wichtige Rolle [54]. Da die Kalorienrestriktion in der Praxis eher schwer anzuwenden ist und durchaus ernsthafte Nebenwirkungen haben kann, herrscht großes Interesse daran, Wirkstoffe zu finden, die die positiven Effekte einer Nahrungsmittelbeschränkung imitieren können.

Howitz *et al.* haben, basierend auf der Idee, dass Sirt1 eine Art Schlüsselfunktion einnimmt, nach Aktivatoren für dieses Enzym gesucht und dabei Resveratrol entdeckt [55]. Nachfolgend konnten mehrere Studien in der Tat eine Sir2 (Sirt1-Homolog)-abhängige lebensverlängernde Wirkung von Resveratrol in Hefe, Würmern und Fliegen nachweisen, ohne dass es einer Nahrungseinschränkung bedurfte [56-58]. Diese bemerkenswerten Ergebnisse wurden im Nachhinein jedoch relativiert, als festgestellt wurde, dass die verwendete Screeningmethode Artefakte produziert [59, 60]. Resveratrol ist *in vitro* nicht in der Lage Sirt1 zu aktivieren und auch Arbeiten von Kaeberlein *et al.* [60] und Bass *et al.* [61], in denen die Wirkung in den drei Modellorganismen reproduziert werden sollte, blieben erfolglos.

Andere Arbeitsgruppen belegten währenddessen die Beobachtung der verlängerten Lebensspanne bei Resveratrolgabe [58, 62, 63] und später zeigte sich der Effekt auch bei Experimenten mit kurzlebigen Fischen der Art *N. furzeri*. Resveratrol war in der Lage die Lebenserwartung der Fische um 56% zu steigern, dabei verbesserte sich auch deren Motorik und neurodegenerative Prozesse wurden verzögert [64]. Diese positiven Ergebnisse gaben Anlass zu weiteren Studien an Mäusen. Eine Verlängerung des Lebens wurde in gesunden Mäusen nicht bestätigt [65], aber offensichtlich profitieren fettleibige Tiere von der Behandlung mit Resveratrol [66]. Ihre Lebensdauer wurde in dem Maß erhöht, dass sie der von normalgewichtigen, unbehandelten Versuchstieren entsprach.

### 1.2.3 *Resveratrol als Kalorienrestriktionsmimetikum*

Obwohl im Mausmodell bei normalgewichtigen Tieren keine Verlängerung der Lebensspanne zu beobachten war, lässt sich unter Behandlung mit Resveratrol bei älteren Exemplaren dieser Spezies eine deutliche Verminderung von Alterserscheinungen feststellen [65]. Diese „Verjüngung“ ähnelt dem Erscheinungsbild von Tieren, deren Nahrungsmittelzufuhr beschränkt wurde und interessanterweise spiegeln sich diese überlappenden Effekte von Resveratrol und Kalorienrestriktion auch deutlich auf transkriptioneller Ebene wider. Resveratrol induziert in einer ganzen Reihe von Geweben gleiche Expressionsmuster wie sie von einer Nahrungsbeschränkung oder intermittierendem Fasten bekannt sind [65, 67, 68].

Neben der inhibierenden Wirkung von Resveratrol und Kalorienrestriktion auf Genexpressionsprofile, die beispielsweise im Zusammenhang mit der Alterung des Herzens oder der Muskulatur stehen, werden Signalwege der mitochondrialen Genexpression, der Anti-Apoptose und der Entzündungshemmung unter beiden Behandlungsmethoden gleichermaßen positiv reguliert [67]. Diese für den Organismus vorteilhaften Effekte sind auch auf physiologischer Ebene wiederzufinden. In einer Vielzahl von Organismen wirken sowohl eine Nahrungsmittelreduktion als auch der Naturstoff Resveratrol altersbedingten Leiden wie Typ II Diabetes [69, 70], Herz-Kreislauf- [71, 72], Krebs- [34, 73] und Neurodegenerativen Erkrankungen [28, 74, 75] entgegen. Offenbar ist Resveratrol in der Lage über die gleichen Signalwege wie die Nahrungsbeschränkung den negativen Konsequenzen des Alterns zu begegnen und das macht diesen Naturstoff als Kalorienrestriktionsmimetikum sehr attraktiv.

## 1.3 RESVERATROL UND DAS METABOLISCHE SYNDROM

Vor dem Hintergrund, dass Resveratrol eine ganze Reihe der gesundheitsfördernden Effekte einer Kalorienrestriktion imitiert und damit vor allem besondere Erfolge bei der Behandlung von übergewichtigen Mäusen erzielt, soll in dieser Arbeit ein wesentliches Augenmerk auf die Wirkung von Resveratrol im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom gelegt werden.

### 1.3.1 *Der Begriff des Metabolischen Syndroms*

Beim Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms liegen verschiedene Stoffwechselstörungen vor, die durch ihr gemeinsames Auftreten, das Risiko an Herz-Kreislaufkrankungen und Typ-2-Diabetes zu erkranken, stark erhöhen [76-80]. Am Metabolischen Syndrom leidet laut Definition nach dem *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP-III) jeder, der mindestens drei der fünf folgenden metabolischen Fehlfunktionen aufweist: intraabdominelle Adipositas, eine erhöhte Konzentration an Serumtriglyzeriden, vermindertes HDL-Cholesterin, Bluthochdruck und bzw. oder einen erhöhten Nüchternblutzucker [81]. Diese kardiometabolischen

Risikofaktoren sind vor allem einer hyperkalorischen Ernährungsweise und einem Mangel an körperlicher Bewegung geschuldet und treten daher sehr häufig in den westlichen Industrienationen auf.

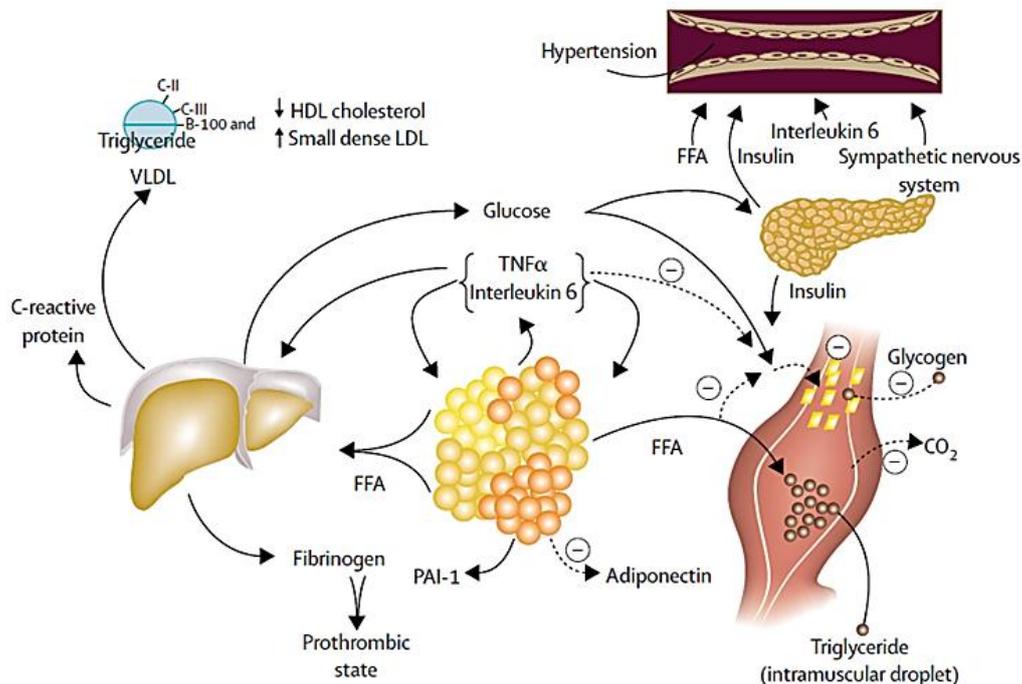
### 1.3.2 Pathophysiologie

Epidemiologische Studien ergaben, dass die genannten Funktionsstörungen sehr viel häufiger zusammen vorkommen, als es dem Zufall nach zu erwarten wäre. Diese Beobachtung resultiert daraus, dass die Dysfunktionen sich teilweise gegenseitig bedingen und demnach das Auftreten eines Risikofaktors die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen weiterer Faktoren erhöht [82]. Ursächlich für das Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms ist vor allem eine durch Fettleibigkeit ausgelöste Insulinresistenz [83, 84], die zum Typ-2-Diabetes voranschreiten kann [79, 80]. Bei Adipositas kommt es nicht nur zu einer erhöhten Anreicherung von subkutanem Fettgewebe, welches als Energiespeicher dient, sondern auch zu einer verstärkten Bildung von Viszeraalfett, welches als endokrines Organ aktiv ist und durch die Sekretion von Fettsäuren und Adipokinen zum Wirkungsverlust des Blutzucker regulierenden Hormons Insulin führen kann [83-86].

Eine erhöhte Masse an Adipozyten in der freien Bauchhöhle bedeutet auch eine vermehrte Freisetzung von nichtveresterten Fettsäuren, die an Organen wie Leber und Muskulatur die Wirkung von Insulin inhibieren (Abbildung 2) [83, 84]. In der Leber unterliegen dadurch Glykogenolyse und Gluconeogenese nicht mehr dem hemmenden Einfluss des Hormons und es findet verstärkt eine Abgabe von Glucose aus der Leber ins periphere Blut statt. Die Bauchspeicheldrüse produziert aufgrund des erhöhten Blutzuckerspiegels vermehrt Insulin, um die Aufnahme von Glucose durch Muskel- und Fettzellen und deren Speicherung als Glykogen zu stimulieren und den Glykogenabbau und die Neusynthese von Glucose einzudämmen [87]. Die von den Adipozyten freigesetzten Fettsäuren verhindern jedoch die insulinvermittelte Aufnahme von Glucose ins Muskelgewebe [88]. Infolgedessen unterbleibt die Synthese von Glykogen und der Prozess der oxidativen Phosphorylierung wird zurückgefahren [89]. Gleichzeitig kommt es in den Myozyten zu einer Akkumulation von Triglyzeriden und Lipiden [90]. Bei einer längerfristig erhöhten Produktion von Insulin durch die Bauchspeicheldrüse führt dies schließlich zum Wirkungsverlust des Hormons, was wiederum die Lipolyse im Fettgewebe und damit die Sekretion von freien Fettsäuren begünstigt [84].

Weiterhin stellt sich eine atherogene Dyslipidämie ein, die durch eine stark erhöhte Produktion von Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (*very low density lipoprotein*, VLDL) verursacht wird [91]. Der Anstieg an freien Fettsäuren sowie die verminderte Insulinwirkung veranlassen die Leber zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung von triglyzeridreichen VLDL-Partikeln [92], die unter der Interaktion mit Lipoproteinen hoher Dichte (*high density lipoprotein*, HDL) zu Lipoproteinen niedriger Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) verstoffwechselt werden. Dabei werden Triglyzeride gegen Cholesterolester ausgetauscht, was zu einem verringerten Cholesterinanteil des HDLs und damit zu einem verstärkten Abbau des Moleküls führt [93]. Die HDL-Konzentration im Blut sinkt [94].

Auch die Zusammensetzung des LDLs verändert sich mit der Folge, dass kleine dichte Partikel entstehen, die die Entstehung von Arteriosklerose begünstigen.



**Abbildung 2. Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms.** Mit zunehmender Masse an viszeralem Fettgewebe werden verstärkt nichtveresterte Fettsäuren (FFA) freigesetzt, die dann zu einer erhöhten Glucoseproduktion, einer vermehrten Triglyzeridsynthese und einer verstärkten Sekretion von Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (VLDL) in der Leber führen. Damit einhergehende Lipidveränderungen schließen eine Reduktion des dichten Lipoprotein (HDL)-Cholesterols und einen Anstieg der Dichte von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) ein. Weiterhin wird die Insulinsensitivität des Muskels durch FFA gesenkt, indem diese die insulinvermittelte Aufnahme von Glucose herabsetzen. Verbundene Effekte sind eine Reduktion des Aufbaus von Glykogen aus Glucose und eine verstärkte Lipidakkumulation als Triglyzeride (TG). Außerdem führen eine erhöhte Konzentration an zirkulierender Glucose und zu einem gewissen Grad auch an FFA zu einem Anstieg der Insulinsekretion der Bauchspeicheldrüse, was in einer Hyperinsulinämie resultiert. Diese kann eine erhöhte Natriumreabsorption und eine verstärkte Aktivität des Sympathischen Nervensystems (SNS) bedingen und wie auch FFA zu Bluthochdruck beitragen. Mitverantwortlich für die durch FFA ausgelöste Insulinresistenz ist der parakrine und endokrine Effekt des proinflammatorischen Zustands. Eine erhöhte Sekretion u.a. an Interleukin-6 (IL-6) und an TNF- $\alpha$  resultiert in einer zusätzlichen Verstärkung der Insulinresistenz sowie der Lipolyse von Triglyzeriden des Fettgewebes und infolgedessen in einer erhöhten Zirkulation von FFA. Sezerniert werden diese Inflammationsmarker von einer ganzen Reihe von Zellen des Fettgewebes, wie beispielsweise von Adipozyten und von aus Monozyten hervorgegangenen Makrophagen. Die vermehrte Zirkulation von IL-6 und anderen Zytokinen führt zudem zu einer Erhöhung der Glucoseproduktion und der Produktion von VLDL in der Leber sowie der Insulinresistenz des Muskels. Zytokine und FFA unterstützen die Herstellung von Fibrinogen und des *Plasminogen Activator Inhibitors-1* (PAI-1) in der Leber, was zusammen mit einer Überproduktion an PAI-1 im Fettgewebe in einem proinflammatorischen Zustand resultiert. Außerdem ist eine verminderte Synthese des anti-inflammatorischen und insulinsensitivierenden Zytokins Adiponektin mit der Ausbildung des Metabolischen Syndroms assoziiert [82].

Neben unveresterten Fettsäuren werden auch verstärkt Zytokine von den Adipozyten, so genannte Adipokine, sezerniert [85, 86]. Es steigt die Konzentration von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) im Blut, während das anti-inflammatorisch wirkende Adiponektin vermindert ausgeschüttet wird [95, 96]. Dies fördert die Insulinresistenz und begünstigt die Lipolyse in den Fettzellen sowie die Glucoseproduktion in der Leber und verhindert den Glucosetransport in den Muskel [97]. Sowohl die freien Fettsäuren als auch die freigesetzten Zytokine veranlassen die Produktion der prothrombotischen Proteine Fibrinogen und

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (*plasminogen activator inhibitor*, PAI-1) in der Leber, die zusammen mit der erhöhten PAI-1-Synthese im Fettgewebe zu Thrombophilie führen, d.h. zu einer Neigung zur Bildung von Thrombose [98, 99]. Daneben rufen die proinflammatorischen Cytokine TNF $\alpha$  und IL-6 endotheliale Dysfunktionen und chronische Inflammationen hervor und steigern damit deutlich das Risiko an Herz-Kreislaufkrankungen, wie Arteriosklerose und Bluthochdruck zu erkranken [100].

Eine Erhöhung des Blutdrucks trägt seine Ursache ebenso im Verlust des insulinvermittelten Vasodilatationseffekts und in durch freie Fettsäuren bedingten Blutgefäßverengungen [101]. Die Wirkung von Insulin auf das Sympathische Nervensystem, welches für die Blutdrucksteigerung verantwortlich ist [102], scheint jedoch nicht beeinträchtigt zu sein [103].

### *1.3.3 Bedeutung des Skelettmuskelgewebes bei der Ausbildung des Krankheitsbildes*

Skelettmuskeln machen ca. 40% des Körpergewichts bei einem durchschnittlichen Erwachsenen aus und bilden in ihrer Gesamtheit das größte aller insulinempfindlichen Organsysteme des Körpers. Sie sind für die Aufnahme von ca. 80% der Glucose aus dem Blut verantwortlich, die anschließend zur Energiegewinnung genutzt oder als Glykogen eingelagert wird. Der Skelettmuskel ist metabolisch flexibel und kann in Zeiten des Kalorienmangels von Kohlenhydraten zu Fetten als Energielieferant wechseln. Dieser Prozess ist vom Insulinspiegel im Blut abhängig.

Tritt eine Insulinresistenz ein, so wird es der Skelettmuskulatur nicht nur unmöglich Glucose aufzunehmen, zu verwerten und als Glykogen zu speichern [104], sondern auch Triglyzeride an deren Stelle zur Energieversorgung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zu nutzen. Die Triglyzeride reichern sich an und die oxidative Kapazität und damit auch die Leistungsfähigkeit des Muskels nimmt ab [105, 106]. Aufgrund seiner entscheidenden Rolle bei der Aufnahme und Verstoffwechslung von Kohlenhydraten leistet das Skelettmuskelgewebe einen essentiellen Beitrag zur Glucosehomöostase des gesamten Körpers. Tritt eine metabolische Dysfunktion des Organs auf, hat dies einen weitreichenden Einfluss auf die Entstehung des Metabolischen Syndroms und schließlich auch auf die Entwicklung von Diabetes und Herz-Kreislaufkrankungen.

### *1.3.4 Behandlung des Metabolischen Syndroms*

Auf die Diagnose „Metabolisches Syndrom“ folgt als Erstbehandlung meist eine Umstellung des Lebensstils mit dem Ziel der Gewichtsabnahme. Eine Bewegungs- und Ernährungstherapie ist im Hinblick auf die Reduktion der metabolischen Risikofaktoren sehr vielversprechend, verlangt jedoch auch ein hohes Maß an Disziplin von den Patienten ab. An dieser Hürde scheitert die Behandlung oftmals und es finden schließlich Medikamente Einsatz, die einzelne Symptome, nicht aber die Ursachen bekämpfen können. So werden beispielsweise ACE-Hemmer und Diuretika gegen Bluthochdruck eingesetzt, verschiedenste cholesterinsenkende Mittel sollen den Fettstoffwechsel wieder ins Gleichgewicht bringen und blutzuckersenkende Präparate werden verabreicht, um der

Insulinresistenz entgegenzuwirken. Da die Zahl der Betroffenen aber immer weiter ansteigt, herrscht großes Interesse daran, Substanzen zu finden, die effektiv an den Entstehungspunkten der Krankheit eingreifen. Bei dieser Suche nimmt der Skelettmuskel als Angriffspunkt aufgrund seiner Masse und seines Energieverbrauchs eine besondere Rolle ein. Eine Erhöhung des Energieumsatzes durch eine vermehrte Nutzung von Fetten als Energieträger, könnte der Fettleibigkeit und seinen Folgen wirksam entgegentreten. Verschiedene Studien belegen, dass vor allem Mediterrane Kost zu einer Verbesserung der Stoffwechselstörungen führt und daher besonders geeignet für die Behandlung des Metabolischen Syndroms ist [107, 108]. Dieses Wissen hat großes Interesse an den Inhaltsstoffen der südländischen Lebensmittel geweckt und führte schließlich auch dazu, dass Resveratrol als potentielles Therapeutikum für die Behandlung der metabolischen Dysfunktionen entdeckt wurde.

#### 1.4 RESVERATROL ALS MÖGLICHES THERAPEUTIKUM

Neben seiner protektiven Wirkung auf die Entstehung von Herz-Kreislaufferkrankungen durch den direkten Einfluss auf die Funktion des Gefäßendothels und die Ausbildung von Entzündungsreaktionen [9, 10, 109], zeigt Resveratrol in Tierversuchen auch das Potential deren Risikofaktoren, die durch das Metabolische Syndrom beschrieben sind, zu minimieren. Den schützenden Effekt von Resveratrol vor den negativen Konsequenzen einer hochkalorischen Ernährungsweise dokumentieren allen voran die Arbeiten von Baur und Lagouge [66, 110].

Sie beobachteten einen positiven Einfluss auf die Regulation des Fett- und Glucosestoffwechsels in Mäusen, denen eine fettreiche Nahrung gemeinsam mit Resveratrol verabreicht wurde im Gegensatz zu den Tieren, die die Diät ohne den Zusatz zu sich nahmen. Zugleich konnten sie eine Verbesserung des allgemeinen Gesundheitszustands der Tiere nachweisen und verzeichneten unter Resveratrolgabe eine signifikante Erhöhung der Lebenserwartung. Die Zufuhr hoher Dosen an Resveratrol (4 g/ kg) über 15 Wochen verhinderte in Experimenten von Lagouge *et al.* die Ausbildung von Fettleibigkeit. Die Mäuse nahmen signifikant weniger an Gewicht als die Kontrolltiere, die die gleiche fettreiche Diät ohne Resveratrolzusatz bekamen, zu. Das lag in einer starken Reduktion des Körperfettgehalts von 27% auf rund 19% begründet. Damit waren sie annähernd so schlank wie ihre Artgenossen, die eine Standarddiät zu sich nahmen [110]. Baur *et al.* konnten hingegen solche Effekte mit einer Resveratrolkonzentration von 400 mg/ kg über sechs bis zwölf Monate nicht erzielen [66].

Ungeachtet dessen bewirkte der Stoff in beiden Studien eine Erhöhung der Glucosetoleranz und eine Verbesserung der Insulinsensitivität, was sich in einer Verringerung der Glucose- bzw. Insulinkonzentration im Blut niederschlug. Dies steht im Zusammenhang mit einer verstärkten Aufnahme von Glucose in die Gewebe, die Resveratrol zum einen insulinabhängig zum anderen aber auch insulinunabhängig fördert [111-113]. Untersuchungen an Mäusen und Ratten, die an Diabetes litten, ergaben bei Behandlung mit Resveratrol ebenfalls eine Verbesserung der Glucosetoleranz sowie der Insulinresistenz [69, 111]. Zudem konnte in diesen Studien ein Anstieg der Synthese von

Glykogen in der Leber und eine geringere Konzentration an Triglyzeriden im Blut gemessen werden. Allerdings wurde auch hier keine Beeinflussung der Gewichtszunahme bei Resveratrolgabe festgestellt, was darauf schließen lässt, dass die antidiabetischen Effekte auch unabhängig vom Einfluss auf das Körpergewicht stattfinden.

Bei der Behandlung des Metabolischen Syndroms ist eine regelmäßige sportliche Ertüchtigung eine effektive Strategie, um die Blutwerte wieder zu normalisieren und die Risikofaktoren für die Ausbildung von Herz-Kreislaufkrankungen zu vermindern. Resveratrol bewirkt eine vergleichbare Kräftigung der Muskulatur und Verbesserung der Ausdauerleistung wie sie bei wiederholter gesteigerter körperlicher Aktivität vorkommt, jedoch ohne dieser zu bedürfen. Die untersuchten Versuchstiere wiesen einen Muskelfaserumbau auf, welcher dem nach wiederholtem physischen Training ähnelt. Dies lässt vermuten, dass Resveratrol aufgrund der beschriebenen Wirkung auf die Skelettmuskulatur in der gleichen Art und Weise auch die positiven Effekte von körperlicher Aktivität auf die Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms mimen kann. Daneben verbesserten sich zudem die Bewegungskoordination und der Gleichgewichtssinn der Mäuse, wonach außerdem ein positiver Einfluss auf das zentrale Nervensystem anzunehmen ist. Eine Korrelation mit dem Körpergewicht der Tiere war bei keinem der genannten Parameter zu beobachten [65, 66, 110].

Im besonderen Fokus des Interesses steht bei solch vielversprechenden Ergebnissen die Übertragbarkeit auf den Menschen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie, bei der adipösen Männern 30 Tage lang 150 mg Resveratrol pro Tag verabreicht wurde, bestätigt die positiven Effekte, die im Mausmodell zu beobachten waren. So ist auch beim Menschen eine Verbesserung des Stoffwechselprofils und des allgemeinen Gesundheitszustandes nach Resveratrolgabe zu verzeichnen. Die getesteten Versuchspersonen wiesen bereits nach 30 Tagen Resveratrolbehandlung eine Zunahme der Insulinsensitivität und eine Abnahme der Lipolyse des Fettgewebes auf, die mit einer Reduktion an freien Fettsäuren, Glycerin, Glucose, Triglyzeriden und Entzündungsmarkern im Blut einherging [114]. Diese metabolischen Veränderungen treten in gleicher Art und Weise auch bei einer Kalorienrestriktion oder bei Ausdauertraining auf und sind für ein vermindertes Risiko, Diabetes und Herz-Kreislaufkrankungen zu erleiden, verantwortlich [115-117]. In den Untersuchungen von Timmers *et al.* zeigten sich nach einmonatiger Resveratrolgabe im Vergleich zum Placebopräparat ebenfalls keine Veränderungen im Körpergewicht der Testpersonen [114].

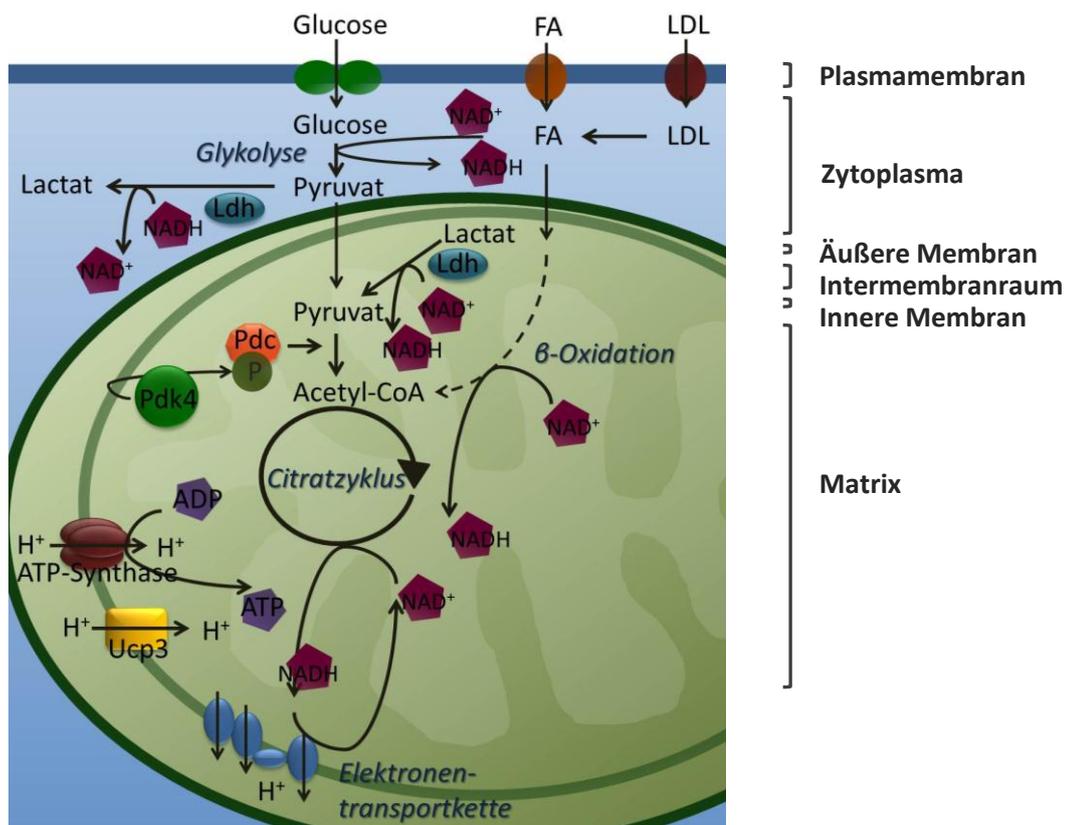
Insgesamt sind diese Ergebnisse sehr erfolgversprechend. Mit Resveratrol scheint ein potentiell Mittel gefunden worden zu sein, welches effektiv den Stoffwechselstörungen des Metabolischen Syndroms entgegenwirkt. Noch nicht vollständig verstanden sind indessen die molekularen Prozesse, die diesen durch Resveratrol hervorgerufenen positiven Veränderungen des Stoffwechsels unterliegen. Anhaltspunkte für deren Aufklärung könnten allerdings aufgrund überlappender Wirkungen durch Kalorienrestriktion ausgelöste Stoffwechselwege liefern.

### *1.4.1 Molekulare Grundlagen der Stoffwechsellumstellung unter Kalorienrestriktion*

Mit einer Einschränkung der Nahrungszufuhr sinkt der Glucosespiegel im Blut. Diese Glucoserestriktion wird unter anderem durch Skelettmuskelzellen wahrgenommen und führt zu einer durch transkriptionelle und metabolische Anpassungsmaßnahmen getriebenen Umstellung des mitochondrialen Stoffwechsels von Kohlenhydraten auf Fette als Hauptenergieträger [118, 119]. Außerdem werden glukoneogenetische Vorläufer wie Lactat und Alanin vom Muskel zur Leber transportiert, um dort für die Glucosesynthese bereitzustehen [120]. Diese Prozesse sorgen für eine Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels und stellen damit sicher, dass Glucoseabhängige Gewebe wie Blutzellen und Gehirn weiterhin mit ausreichend Energie versorgt werden [121].

#### *1.4.1.1 Regulation von Sirt1, Pgc1 $\alpha$ und Pdk4*

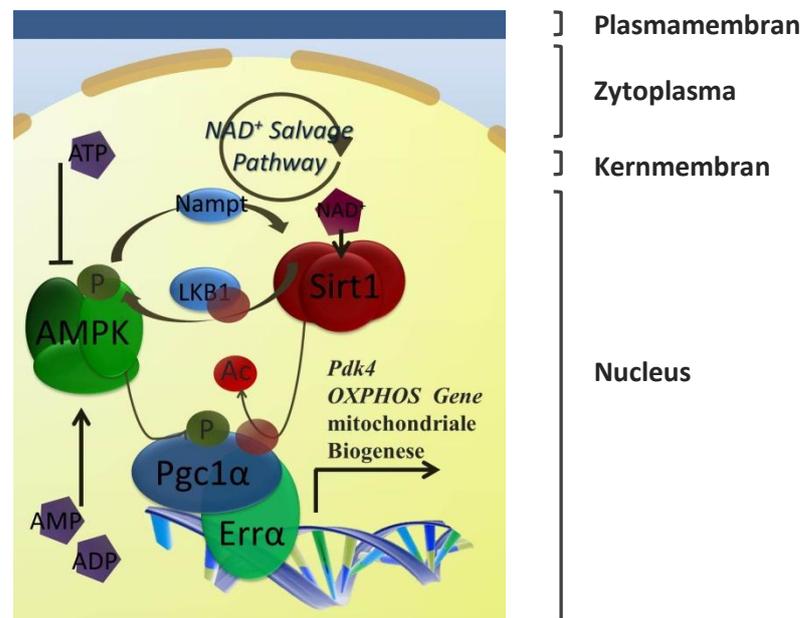
Die massive Umstellung des Stoffwechsels wird in Muskelzellen u.a. durch ein wichtiges regulatorisches metabolisches Enzym vermittelt, der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 (Pdk4). Unter Nahrungsmangel ist deren enzymatische Aktivität positiv reguliert [122] und sie phosphoryliert verstärkt ihr Zielprotein, den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (*pyruvate dehydrogenase complex*, Pdc) (Abbildung 3). Infolgedessen wird dieser inaktiviert und der Eintritt von Pyruvat in den Citratzyklus ist verhindert. Anstelle der durch Glykolyse in Pyruvat umgewandelten Glucose werden nun Fettsäuren in Form von Acetyl-CoA im Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt und zur Energiegewinnung genutzt.



**Abbildung 3. Mitochondrialer Energiestoffwechsel.** Glucose wird über Glucosetransporter in die Muskelzellen transportiert und dort in der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt. Dieses wird in den Mitochondrien unter der Kontrolle des Pdc zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches anschließend im Citratzyklus der Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  dient.  $\text{H}^+$ -Ionen des  $\text{NADH}$ s gelangen mittels Elektronentransportkette in den Intermembranraum und treiben die durch die ATP-Synthase katalysierte Produktion von ATP voran. Entkoppelnde Enzyme wie das Ucp3 können dafür sorgen, dass die ATP-Synthase von der Atmungskette getrennt wird, indem es die Protonen des Intermembranraums wieder zurück in die Mitochondrienmatrix pumpt. In Zeiten von Glucoseknappheit, wie sie bei Kalorienrestriktion auftritt, werden vermehrt Fettsäuren (FA) als Energieträger genutzt. Diese werden in der  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA verstoffwechselt und können dann in gleicher Weise wie Glucose zur ATP-Produktion genutzt werden. Diese Umstellung des Stoffwechsels wird über Pdk4 reguliert, deren Aktivität bei Glucosemangel erhöht wird und die infolgedessen Pdc vermehrt phosphoryliert, dadurch inaktiviert und so die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verhindert.

Die Induktion der Genexpression von Pdk4 erfolgt unter anderem durch den Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor-Gamma-Coaktivator-1-Alpha (Pgc1 $\alpha$ ) im Zusammenspiel mit dem Estrogen-ähnlichen-Rezeptor-Alpha (*Estrogen-related receptor alpha*, Err- $\alpha$ ) (Abbildung 4) [123]. Diese Funktion des transkriptionellen Coaktivators steht im Einklang mit seiner Schlüsselrolle bei der Fettverbrennung. Ist Pgc1 $\alpha$  aktiv, erhöht er die Expression von Genen der Oxidativen Phosphorylierung (*OXPHOS*), die am letzten Schritt der Elektronentransportkette und an der ATP-Synthase beteiligt sind, und ermöglicht damit die vollständige mitochondriale Oxidation der Fettsäuren [124, 125]. Seine Aktivität wird zum einen auf transkriptioneller und zum anderen auf posttranslationaler Ebene reguliert. In beiden Fällen ist die Proteindeacetylase Sirt1 beteiligt. Diese ist in der Lage Pgc1 $\alpha$  an mehreren Lysinresten zu deacetylieren und damit zu aktivieren [126-129] (Abbildung 4) sowie dessen Genexpression zu induzieren [110, 129]. Bei der Initiation der Transkription agieren Sirt1, MyoD und Pgc1 $\alpha$  gemeinsam in einem positiven autoregulatorischen

Loop am Pgc1 $\alpha$ -Promotor [130] und gewährleisten damit eine effiziente transkriptionelle Antwort auf Nahrungsmangel.



**Abbildung 4. Unter Kalorienrestriktion regulierte Enzyme im Nucleus.** Bei Nahrungsknappheit sinkt die aus Glucose gewonnene ATP-Menge in den Muskelzellen und NAD liegt vermehrt in seiner oxidierten Form als NAD<sup>+</sup> vor. Dies aktiviert die regulatorischen Enzyme AMPK und Sirt1, welche über Phosphorylierung bzw. Deacetylierung ihres Zielproteins Pgc1 $\alpha$  u.a. die Transkription von *Pdk4*, *OXPHOS* Genen und Genen der mitochondrialen Biogenese vorantreiben. Pdk4 sorgt dann in den Mitochondrien für die Umstellung des Stoffwechsels von Kohlenhydraten auf Fette als Energielieferanten (Abbildung 3). AMPK und Sirt1 regulieren sich außerdem gegenseitig indem sie die Aktivität von Nampt bzw. LKB1 beeinflussen. Nampt katalysiert die NAD<sup>+</sup>-Biosynthese im *NAD<sup>+</sup> Salvage Pathway* und NAD<sup>+</sup> entscheidet wiederum als Koenzym über die Aktivität von Sirt1.

Sirt1 deacetyliert neben Pgc1 $\alpha$  noch eine ganze Reihe weiterer Koregulatoren, Transkriptionsfaktoren sowie Lysinreste von Histonen und kontrolliert damit deren regulatorische Proteinaktivität und letztendlich die Expression einer Vielzahl von Genen. Entsprechend kommt Sirt1 eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels, aber auch bei anderen Prozessen wie der Kontrolle des Zellwachstums, der Seneszenz und der Apoptose, der Antwort auf zellulären Stress und bei der Hemmung von Entzündungsreaktionen in unterschiedlichen Geweben zu [131, 132]. Unter Kalorienrestriktion steigt sowohl die enzymatische Aktivität als auch das Transkript- und Protein-Level von Sirt1 [133, 134]. Seine Deacetylaseaktivität ist streng abhängig von seinem Koenzym Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) [126, 131], wodurch ein direkter Zusammenhang mit dem metabolischen Zustand der Zelle gegeben ist. Folglich kann Sirt1 bei Veränderungen der Nahrungsverfügbarkeit unmittelbar reagieren und diese in eine adaptive Genexpressionsantwort umsetzen, um die Energiehomöostase des Körpers aufrecht zu erhalten [50, 126-128, 135-137].

#### 1.4.1.2 NAD<sup>+</sup>-abhängige Sirt1-Aktivität

NAD<sup>+</sup> übernimmt mehrere essentielle Aufgaben im Stoffwechsel der Zelle, ist aber hauptsächlich am Elektronentransfer von einem Molekül zum anderen beteiligt. Solche Redoxreaktionen finden in

vielen Bereichen des Metabolismus' statt und doch ist der wohl wichtigste Vorgang, an dem  $\text{NAD}^+$  beteiligt ist, die Gewinnung von Energie aus der Nahrung. Dabei werden in Prozessen der  $\beta$ -Oxidation, der Glykolyse und des Citratzyklus' reduzierte Bestandteile wie Glucose und Fettsäuren oxidiert. Diese übertragen schließlich Energie auf  $\text{NAD}^+$ , welches zu  $\text{NADH}$  reduziert wird (Abbildung 3).  $\text{NADH}$  wird dann in der oxidativen Phosphorylierung genutzt um ATP zu generieren und wird dabei selbst wiederum zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Das  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnis ist demnach stark von der Nahrungsverfügbarkeit abhängig. Diese Verknüpfung ermöglicht die Regulation des Stoffwechsels über  $\text{NAD}^+$ -abhängige Enzyme wie Sirt1.

Neben den genannten Prozessen beeinflussen auch die Pyruvat-zu-Lactat-Umsetzungs- und die  $\text{NAD}^+$ -Biosyntheserate die Konzentration des Koenzyms. Die Reduktion von Pyruvat zu Lactat mit gleichzeitiger Oxidation von  $\text{NADH}$  zu  $\text{NAD}^+$  wird, genau wie die entsprechende Rückreaktion, durch das Enzym Lactatdehydrogenase (*lactate dehydrogenase*, Ldh) katalysiert (Abbildung 3). Die Gleichgewichtskonstante der Lactatdehydrogenasereaktion bevorzugt allerdings Lactat deutlich gegenüber Pyruvat. Das bedeutet, dass ein geringer Anstieg der Pyruvatkonzentration in der Zelle in einer starken Erhöhung des Lactatspiegels und somit auch des  $\text{NAD}^+$ -Levels resultiert [138]. Die Menge an Pyruvat wird durch dessen Auf- und Abbau in Prozessen der Glykolyse und der Pyruvatoxidation bestimmt. In Zeiten der Nahrungsknappheit ist der Pyruvat- wie auch der  $\text{NAD}^+$ -Spiegel in den Zellen erhöht [128].

Die Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  kann *de novo* aus der Aminosäure Tryptophan oder mittels *NAD<sup>+</sup> Salvage Pathway* erfolgen. Bei letzterem werden die drei natürlich vorkommenden Verbindungen Nicotinsäure (Na), Nicotinamid (Nam) und Nicotinamidribosid (NR) verwendet. Alle drei enthalten einen Nicotinamidring und können mitunter aus der Nahrung aufgenommen, aber auch in den Zellen selbst hergestellt werden. Eine Zwischenstufe bei der  $\text{NAD}^+$ -Synthese aus Nam bzw. NR stellt das Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) dar. Seine Synthese wird durch die Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (Namp1) aus Nam katalysiert. Dieses Enzym scheint in Zeiten von Nahrungsknappheit verstärkt exprimiert zu sein und so ebenfalls zu einer erhöhten  $\text{NAD}^+$ -Konzentration beizutragen [139].

#### 1.4.1.3 Wechselbeziehung zwischen Sirt1 und AMPK

Neben Sirt1 ist die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ein wesentlicher Bestandteil im metabolischen Netzwerk der Muskelzelle. Ähnlich wie das Sirtuin stimuliert AMPK unter Kalorienrestriktion die Oxidation von Fettsäuren und die Aufnahme von Glucose aus dem Blut [140], um die Energieversorgung und damit das Überleben der Zelle zu sichern. Beide Enzyme werden durch dieselben äußeren Reize aktiviert und haben eine ähnliche Wirkung auf diverse Prozesse wie Energiemetabolismus, Entzündungsreaktionen und Alterungsvorgänge [141, 142]. Verantwortlich dafür ist die enge Verknüpfung von AMPK und Sirt1, denn sie regulieren sich gegenseitig und besitzen zahlreiche gemeinsame Zielproteine [143-146] (Abbildung 4).

AMPK wird über AMP bzw. das in der Zelle vorherrschende AMP/ATP-Verhältnis reguliert. Dabei inhibiert der energiereiche Zustand des Nukleotids die Aktivität der Kinase und die energieärmeren Formen Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) verhindern die Dephosphorylierung und damit die Inaktivierung des Enzyms [147], die auf einen erniedrigten Energiezustand der Zelle reagiert. Die Aktivität Leberkinase B1 (*liver kinase B1*, LKB1) ist mitunter von seinem Acetylierungszustand abhängig, der von Sirt1 reguliert wird. Unter Nahrungsknappheit kommt es zu einer verstärkten Deacetylierung von LKB1 durch Sirt1, was daraufhin zu einem Anstieg des Phosphorylierungsgrads und folglich zur Zunahme der AMPK-Aktivität führt (Abbildung 4) [148]. AMPK hat wiederum Einfluss auf die Aktivität von Sirt1, indem es den NAD<sup>+</sup>-Spiegel bzw. das NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis anhebt [137]. Ursächlich dafür ist vermutlich eine Erhöhung der Nampt-Expression [149-152].

Neben ihrer gegenseitigen Regulation, sind Sirt1 und AMPK gemeinsam für die Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren verantwortlich. So auch für den Coaktivator Pgc1 $\alpha$ , der durch AMPK phosphoryliert wird und dessen Phosphatgruppen dann als Signal für die Deacetylierung mittels Sirtuin-1 dienen (Abbildung 4) [150, 153]. Zudem reguliert AMPK, genau wie Sirt1, Pgc1 $\alpha$  auf transkriptioneller Ebene [154-156].

Ist die Mitochondrienfunktion aufgrund einer Fehlregulation einer der Komponenten dieses metabolischen Netzwerkes beeinträchtigt, hat dies Einfluss auf den Stoffwechsel des gesamten Körpers und kann zu Übergewicht, Diabetes oder auch zu Herz-Kreislaufkrankungen führen [106, 119, 157-162]. Entsprechend haben Studien an Diabetespatienten gezeigt, dass die Krankheit mit einer verminderten Pgc1 $\alpha$ -Expression und einer Herunterregulation der mitochondrialen *OXPHOS*-Gene assoziiert ist [157, 159-161]. Das zieht eine herabgesetzte ATP-Syntheserate und eine gesteigerte Speicherung an Fettsäuren nach sich, was schließlich mit einer intramyozellulären Triglyzeridakkumulation und Insulinresistenz verbunden ist [106, 158, 159]. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die unter eingeschränktem Nahrungsangebot die Oxidation von Fettsäuren ankurbeln, ermöglicht es ein Verständnis für die Pathophysiologie dieser Stoffwechselerkrankungen zu entwickeln und damit Möglichkeiten aufzudecken wie deren Entstehung entgegengewirkt werden kann.

#### 1.4.2 *Resveratrol reguliert Energiestoffwechselprozesse*

Wie in verschiedenen tierexperimentellen Studien gezeigt wurde, beruht die Wirkung von Resveratrol zumindest teilweise auf ähnlichen Mechanismen wie die Kalorienrestriktion [65-67, 110]. Bei fettleibigen Mäusen steigt unter Resveratrolgabe die über Pgc1 $\alpha$  vermittelte Expression von *OXPHOS*-Genen, von Genen der mitochondrialen Biogenese und von *pgc1 $\alpha$*  selbst. Dabei scheinen ebenfalls AMPK und Sirt1 eine Rolle zu spielen [66, 110]. Auch *Gene Set Enrichment* Analysen haben gezeigt, dass Resveratrol fähig ist, den Effekten einer hochkalorischen Diät in ähnlicher Weise wie Kalorienrestriktion zu begegnen [66]. Untersuchungen der Wirkungsweise von Resveratrol an

gesunden Tieren ergaben zudem ebenso eine deutliche Übereinstimmung bei der Änderung der Genexpression mit Daten einer Nahrungsrestriktion [65, 67].

Mit der Verbesserung des Stoffwechselprofils in der von Timmers *et al.* durchgeführten einmonatigen Studie an stark übergewichtigen Testpersonen war ebenfalls eine Erhöhung des Proteinlevels von Pgc1 $\alpha$ , Sirt1 und AMPK assoziiert. Für AMPK konnte über den Phosphorylierungsstatus eine gesteigerte Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich ein Anstieg der respiratorischen Effizienz der Mitochondrien [114]. Somit scheint Resveratrol auch beim Menschen das Potential zu haben, über ähnliche molekulare Mechanismen wie eine Nahrungsreduktion oder körperliche Ertüchtigung, positive Effekte, die den Stoffwechselstörungen des Metabolischen Syndroms entgegenwirken, zu vermitteln.

## 1.5 ANTIOXIDATIVE WIRKUNG VON RESVERATROL

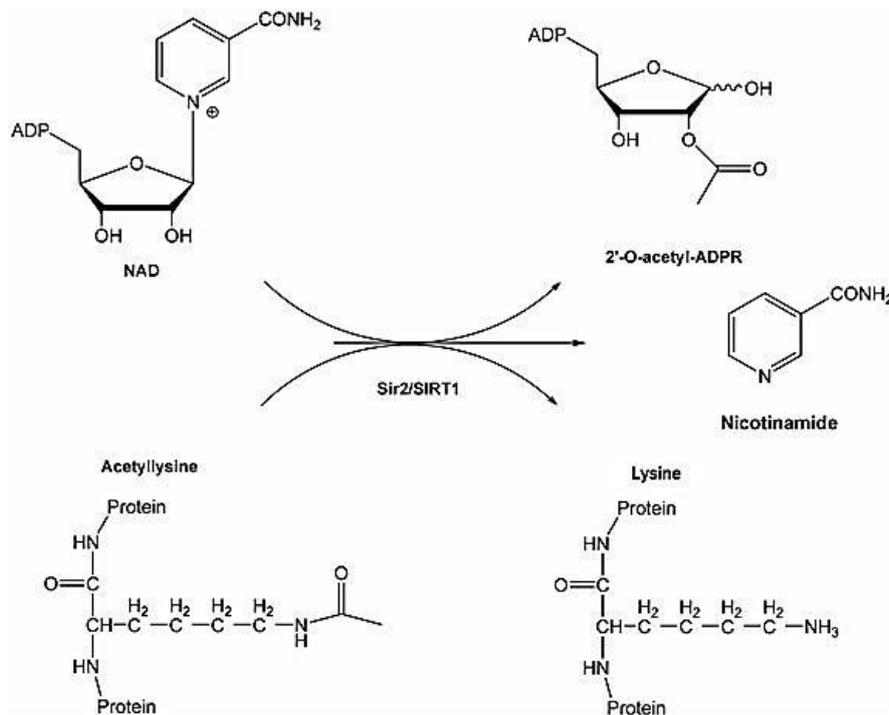
Mit einer erhöhten Rate der Fettsäureoxidation und der Atmungskette geht auch eine vermehrte Bildung von für den Organismus schädlichen Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einher, die mit verschiedensten Erkrankungen und Alterungsprozessen assoziiert sind [163]. Eine Einschränkung der Nahrungszufuhr sowie auch die Gabe von Resveratrol bewirken neben der gesteigerten Funktion der Mitochondrien deren Biogenese [66, 110, 134], eine verstärkte Expression des entkoppelnden Proteins 3 (*uncoupling protein 3*, Ucp3) [110, 164] und anderer antioxidativer Enzyme [165, 166] im Muskel. Dadurch wird eine Reduktion des Elektronenflusses pro Mitochondrieneinheit erreicht, mehr Protonen zur Verfügung gestellt (Abbildung 3) und verstärkt Reaktive Sauerstoffspezies inaktiviert. Der Zelle gelingt es somit, die Menge an freien Radikalen zu minimieren und dazu beizutragen, Krankheiten sowie Alterung entgegenzuwirken.

## 1.6 RESVERATROL, SIRT1 UND CHROMATINUMBAU

### 1.6.1 *Sirt1 als Histondeacetylase*

Die unter Resveratrolgabe und Kalorienrestriktion regulierte Deacetylase Sirt1 kontrolliert die Expression von Genen nicht nur über die Regulation von Transkriptionsfaktoren und Coaktivatoren, sondern hat auch Einfluss auf die Struktur des Chromatins und damit auf die Zugänglichkeit der Genabschnitte für an der Transkription beteiligte Proteine. Sirt1 ist entsprechend seiner Sequenz- und Domänenverwandtschaft eine Histondeacetylase (HDAC) der Klasse III und trägt als solche über die Deacetylierung von Seitenketten einzelner Aminosäuren von Histonen zur Ausbildung von fakultativem Heterochromatin bei [167]. Zu den HDACs der Klasse III gehören neben Sirt1 alle weiteren Homologe des in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vorkommenden *Silent mating information regulation 2* (Sir2)-Proteins, wie auch die humanen Sirtuine 2-7. Die Existenz von Sirtuinen ist evolutionär hoch konserviert - sie kommen von Bakterien über Hefen und Würmern bis

hin zu Säugetieren vor. Jede Spezies besitzt mindestens eines, oftmals aber auch mehrere dieser Proteine. Gemein ist ihnen die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylierungsreaktion von acetylierten Lysinresten in Proteinsubstraten wie beispielsweise Histonproteinen. Die abgespaltene Acetylgruppe wird bei dieser Reaktion auf die ADP-Ribose des  $\text{NAD}^+$  übertragen, wobei das  $\text{NAD}^+$  selbst gespalten wird und NAM, 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose und ein deacetyliertes Protein entstehen (Abbildung 5).



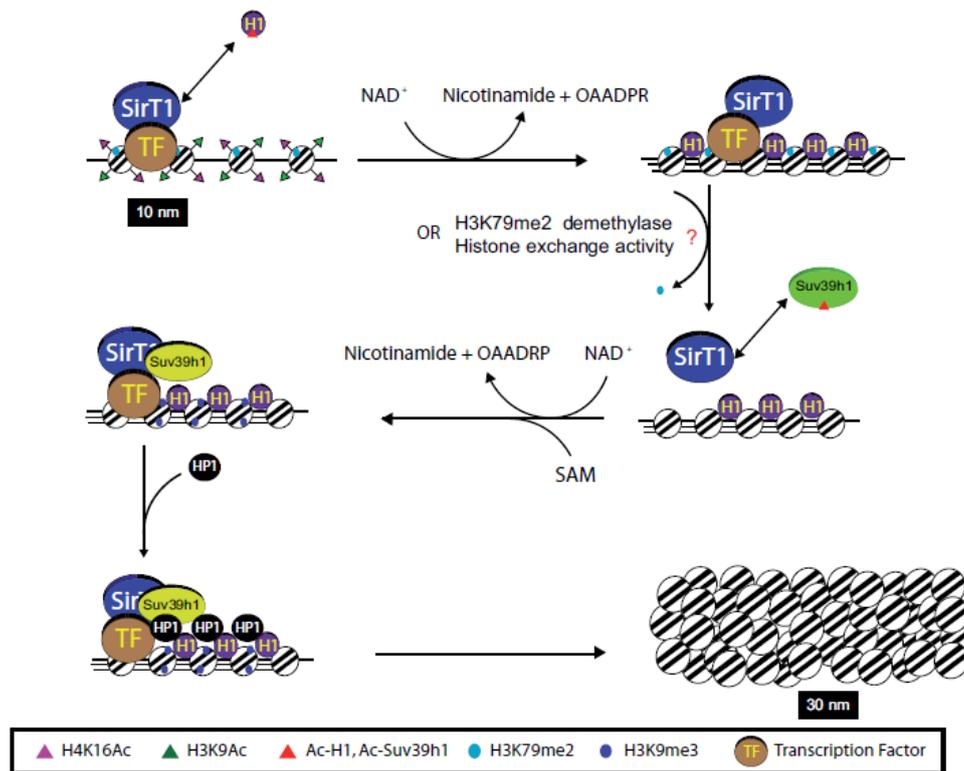
**Abbildung 5. Durch Sirt1 vermittelte Deacetylierungsreaktion von Lysinseitenketten in Zielproteinen.** Bei der durch Sirt1 katalysierten Reaktion von  $\text{NAD}^+$  und dem Acetyllysin des Proteins wird der Acetylrest auf die ADP-Ribose des  $\text{NAD}^+$  übertragen und es entstehen 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose, der deacetylierte Lysinrest des Proteins und Nicotinamid (Nam) [168].

### 1.6.2 Epigenetische Veränderungen und die Ausbildung von Chromatinstrukturen

Die Acetylierung von Lysinen ist eine von mehreren bekannten Histonmodifikationen, die einen Kontrollmechanismus der Genexpression jenseits der DNA-Sequenz darstellt. Die in Nukleosomen organisierten Histone können außerdem Mono-/ Di- oder Tri-Methylierungen an bestimmten Lysin-, Histidin- und Arginin-, Acetylierungen an Lysin- sowie Phosphorylierungen an Serinseitenketten tragen. Die Kombination dieser verschiedenen Modifikationen ergibt einen "Histon-Code", der durch weitere, an die DNA bindende Proteine erkannt wird und zu Veränderungen der Chromatinstruktur führt. Die Konformation des Chromatins steht im direkten Zusammenhang mit der Aktivität des auf diesem Abschnitt codierten Gens. Generell ist die Anheftung von Acetylgruppen an Lysinreste für die Öffnung der Nukleosomenstruktur und damit für ein verstärktes Ablesen des entsprechenden Gens durch die RNA-Polymerase verantwortlich, wohingegen Methylgruppen an Lysinseitenketten meist zu einer geschlossenen Konformation führen und eine Transkription unmöglich machen.

### 1.6.3 *Sirt1 und die Ausbildung von Fakultativem Heterochromatin*

Sirt1 unterstützt die Ausbildung von fakultativem Heterochromatin indem es Lysine der Kernhistone 3 und 4 (H3K9Ac und H4K16Ac) deacetyliert und mit dem Linkerhiston H1 interagiert. Dabei wird dieses verstärkt zu den entsprechenden Chromatinbereichen rekrutiert und am Lysin 26 (H1K26Ac) deacetyliert (Abbildung 6) [167, 169]. H1 stellt einen wichtigen Faktor bei der Ausbildung der 30 nm Chromatinfaser dar und ist in diesen Heterochromatinbereichen vor allem als H1b, eine der mindestens sechs Varianten des Histons, angereichert [170]. Die Stilllegung der Genabschnitte wird nach der Deacetylierung durch Methylierungen des nicht acetylierten Lysins H1K26 mittels Histon-Lysin-N-Methyltransferase (*Histone-lysine N-methyltransferase*, Ezh2) vorangetrieben [171]. Für diese Koordination von Acetylierung und Methylierung ist vermutlich die Koexistenz von Sirt1 und Ezh2 im *polycomb repressive complex 4* (PRC4)-Komplex verantwortlich, welche wohl auch dafür sorgt, dass Ezh2 spezifisch an H1K26 und nicht wie gewöhnlich an H3K27 agiert [172]. An das dimethylierte H1K26me2 kann sich daraufhin das für die Ausbildung von Heterochromatin wichtige Heterochromatin Protein 1 (HP1) anlagern und für eine weitere Kondensation der Chromatinstruktur sorgen [173, 174]. Die Aktivität von Sirt1 am Chromatin fördert des Weiteren die Abspaltung der mit einer aktiven Transkription im Zusammenhang stehenden Methylgruppe von H3K79me2 [167] und die Anheftung von epigenetischen Markern wie H3K9me3 und H4K20me1, die mit der Ausbildung von Heterochromatin assoziiert sind [175]. Für die chemische Modifizierung von H3K9 interagiert Sirt1 mit der Histon-Lysin N-Methyltransferase Suv39H1, rekrutiert und aktiviert diese [176]. Ganz anders als bei den hypoacetylierten, methylierten Enden der Histone H1, H3 und H4, sind die intra- und internucleosomalen Wechselwirkungen von acetylierten, demethylierten Domänen geschwächt und es bildet sich vorzugsweise eine weniger kompakte Chromatinstruktur, das Euchromatin aus [167]. Die DNA ist dadurch besser zugänglich für die RNA Polymerase II sowie für Transkriptions- und andere Faktoren, was in einer verstärkten DNA-Transkription resultiert.



**Abbildung 6. Sirt1-vermittelte Ausbildung von fakultativem Heterochromatin.** Transkriptionsfaktoren (TF) rekrutieren Sirt1 zu Euchromatinbereichen, wo diese H4K16Ac, H3K9Ac und H4K16Ac deacetyliert, wie auch H1 selbst zum Chromatin rekrutiert. Dies geht mit dem Verlust der H3K79-Dimethylierung einher, welche einen Marker für offenes Chromatin darstellt. Sirt1 rekrutiert, deacetyliert und damit aktiviert Suv39h1, das daraufhin die benachbarten Nucleosome methyliert, was wiederum HP1 binden lässt und zur Formation einer 30 nm Faser führt. OAADPR: O-Acetyl-ADP-Ribose, SAM: S-Adenosylmethionin [177].

## 1.7 ZIEL DIESER ARBEIT

Die im Rahmen des Masterstudiums der Zellulären und Molekularen Biologie angefertigte Abschlussarbeit soll einen Teil zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Wirkungsweise von Resveratrol beitragen.

Bisherige Studien am Mausmodell geben Anlass zu der Vermutung, dass der Resveratrolwirkung ähnliche molekulare Regulationsmechanismen wie der Kalorienrestriktion zugrunde liegen [65-67, 110]. Um die Richtigkeit dieser Annahme zu untersuchen, werden in dieser Arbeit die für die Umstellung des mitochondrialen Stoffwechsels entscheidenden regulatorischen Enzyme Pdk4 und Pyruvatdehydrogenase E1 $\alpha$  (PdhE1), einer Untereinheit des Pdc $\alpha$ , herangezogen. Außerdem soll die Quantifizierung der an diesem Prozess beteiligten Metabolite weitere Einblicke in den Stoffwechselzustand der Zelle unter Resveratrolbehandlung liefern.

Um den Effekt auf das Muskelgewebe von fettleibigen wie auch gesunden Tieren beurteilen zu können, wurden die Untersuchungen an beiderlei Mäusen durchgeführt. Zeit- und dosisabhängige Studien an C2C12-Zellen, einer Mausmyoblastenzelllinie, sollen zudem der Bewertung der Menge, die für das Auslösen von Effekten nötig ist bzw. der Beurteilung des zeitlichen Wirkverlaufs von Resveratrol, dienen.

Ob Resveratrol seine Wirkung *in vivo* zudem über die Beeinflussung von bestimmten antioxidativen Schutzmechanismen ausübt, soll die Analyse verschiedener an der ROS-Detoxifikation beteiligter Enzyme zeigen.

Einen Einblick in die durch Resveratrol regulierte Sirt1-Deacetylaseaktivität am Chromatin liefern Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP)-Untersuchungen des Sirt1 Zielproteins H1K26Ac.

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Geräte

---

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Bioruptor® Standard sonication device	Diagenode, Lüttich, Belgien
CASY® Model DT Cell Counter and Analyzer	Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland
Cryo-Einfriergerät "Mr. Frosty"	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fuji LAS-1000 Kamera- und Geldokumentations-system	Fuji Photo Film Co., Ltd, Tokyo, Japan
Gelelektrophoresekammer XCell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Inkubator Heraeus® Cytoperm® 2	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Mikroskop Leica DM IL HC	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Nanodrop2000 and Nanodrop3300	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
POLARstar Omega	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland
PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research, Inc., Waltham, Vereinigte Staaten
Rotator	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Stainless Steel Beads, 5mm	Qiagen, Hilden, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TissueLyser	Qiagen, Hilden, Deutschland
TissueLyser Adapter Set 2 x 24	Qiagen, Hilden, Deutschland
UV Gel Imaging System Omega	UltraLum, Claremont (Kalifornien), Vereinigte Staaten

---

---

2.1.2 *Verbrauchs- und sonstige Materialien*


---

384-Well Polystyrol Zellkultur Microplatte, weiß	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
384-Well Small Volume™ HiBase Polystyrol Microplatte	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
75 cm <sup>2</sup> or 150 cm <sup>2</sup> Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap	Corning, Schwerte, Deutschland
Amersham Hybond™ ECL™ Nitrocellulose-membran	GE Healthcare, München, Deutschland
Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Blotting paper	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Cryo.s™ Einfrierröhrchen, 2 ml	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
DiaMag protein A-coated magnetic beads	Diagenode, Lüttich, Belgien
Einmal-Skalpelle Cutfix®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcon Tubes 15 ml und 50 ml	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gel (1.0 mm, 15-well)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Standard Reaktionsgefäß 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tissue Culture Dish 150 mm	TPP, St. Louis (Missouri), Vereinigte Staaten
Tissue Culture Plate 96-well Flat Bottom	TPP, St. Louis (Missouri), Vereinigte Staaten
Zählkammer Neubauer improved, hell-linig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellschaber	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

---

---

### 2.1.3 Chemikalien

---

10% Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> , SDS)-Lösung	Ambion, Frankfurt a.M., Deutschland
2-Propanol zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland
Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, München, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (PIC) Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Analyse	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, GlutaMAX™, pyruvate	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8,0	Ambion, Frankfurt a.M., Deutschland
Ethanol zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formaldehyd Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
GelPilot DNA Loading Dye, 5x	Qiagen, Hilden, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Horse Serum (HS)	Lonza, Köln, Deutschland
2 M Kaliumchlorid (KCl)	Ambion, Frankfurt a.M., Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Milchpulver Blotting grade, pulv.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
5 M Natriumchlorid (NaCl)	Ambion, Frankfurt a.M., Deutschland
Nuclease-free Water	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

---

---

Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (PPIC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF )	Roche, Mannheim, Deutschland
Ponceau S - Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Trans</i> -Resveratrol	Cayman Chemical Company, Tallinn, Estland
1 M Tris(hydroxymethyl)aminomehtan Hydrochlorid (Tris-HCl), pH 7,0 und 8,0	Ambion, Frankfurt a.M., Deutschland
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer GmbH, Rodgau, Deutschland

---

#### 2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

---

Wachstumsmedium	90% [v/v] DMEM 10% [v/v] FBS
Differenzierungsmedium	98% [v/v] DMEM 2% [v/v] HS
Einfrriermedium	85% [v/v] DMEM 10% [v/v] FBS 5% [v/v] DMSO
10x Phosphate buffered saline (PBS)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
1x PBS-P	1x PBS 1 mM PMSF 1x PIC
1x PBS-PP	1x PBS 1 mM PMSF

---

	1x PIC
	1x PPIC
10X TRIS BUFFERED SALINE (TBS)	0,2 M Tris-HCl 1,37 M NaCl pH7,6
1x TBS-T	1x TBS 0,1% Tween® 20
1x TBE-Puffer	0,89 M Tris-HCl 0,89 M Borsäure 20 mM EDTA
1x Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.0 10 mM EDTA 1 mM PMSF 1x PIC
1x Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA-Puffer)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,1% SDS 0,5% Natriumdeoxycholat 1% Triton® X-100 1 mM PMSF 1x PIC
Salzlösung	230 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 0,02% SDS 0,1% Natriumdeoxycholat 0,2% Triton® X-100
1x Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH7.5 50 mM EDTA 50 mM NaCl
1x Kompletter Elutionspuffer	1x Elutionspuffer 1% SDS
Ladepuffer für Proteingel	3,3x NuPAGE® LDS Sample Buffer 50 mM DTT
1x Transferpuffer	186 mM Glycin

---

---

	25 mM Tris-HCl
CASY®ton	Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Puffer C, LowCell# ChIP Kit	Diagenode, Lüttich, Belgien
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

---

Alle hier aufgeführten Puffer wurden einfach eingesetzt bzw. lagen nach dem Mischen mit der Probe oder anderen Komponenten einfach vor.

### 2.1.5 Standards, Enzyme und Kits

---

1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs
Apoglow® Assay Kit	Lonza, Köln, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Lactate Assay Kit	Biovision, Heidelberg, Deutschland
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MinElut® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NAD <sup>+</sup> /NADH Quantification Kit	Biovision, Heidelberg, Deutschland
Power SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
Pyruvate Assay Kit	Biovision, Heidelberg, Deutschland
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TrypLE™ Express Stable Trypsin Replacement Enzyme (1x) w/o Phenol Red	Gibco, Karlsruhe, Deutschland

---

## 2.1.6 Antikörper

**Tabelle 1.** Antikörper für die Proteindetektion beim Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Inkubationslösung	Katalognr. und Hersteller
<b><u>Primäre Antikörper</u></b>				
anti-JNK	Maus, monoklonal	1:1000	5% [w/v] Milchpulver in TBS-T	3708 S, Cell Signaling, Frankfurt a.M., Deutschland
anti-JNK (Phospho-Thr 183, -Tyr 185)	Maus, monoklonal	1:200	5% [w/v] Milchpulver in TBS-T	sc-6254, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-PdhE1 $\alpha$	Maus, polyklonal	1:2000	2,5% [w/v] BSA in TBS-T	ab67592, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-PdhE1 $\alpha$ (Phospho-S293)	Kaninchen, polyklonal	1:2000	2,5% [w/v] BSA in TBS-T	ab92696, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-Pdk4	Kaninchen, polyklonal	1:1000	2,5% [w/v] BSA in TBS-T	ab38242, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-Ucp3	Kaninchen, polyklonal	1:1000	2,5% [w/v] BSA in TBS-T	ab10985, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti- $\beta$ -Aktin	Maus, monoklonal	1:4000	5% [w/v] Milchpulver in TBS-T	sc-47778, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
<b><u>Sekundäre Antikörper</u></b>				
Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyclonal	Gleiche Konz. wie primärer	5% [w/v] BSA in TBS-T	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	Gleiche Konz. wie primärer	5% [w/v] BSA in TBS-T	Santa Cruz, Heidelberg Deutschland

**Tabelle 2.** Antikörper für die Immunopräzipitation

Antikörper	Spezies	Hersteller	Katalognr.
anti-acetyl-Histon H1.4 (Ac-Lys26)	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	H7789
Kaninchen IgG als neg. Kontrolle	Kaninchen	Diagenode, Lüttich, Belgien	kch-504-250

### 2.1.7 Primer

**Tabelle 3.** cDNA-Primer für die Genexpressionsanalyse

Gen	Primersequenzen (5' → 3')
<i>foxo3a</i>	aaacaccagcagcagctctcc gcctgagagagagtccgaga
<i>lxra</i>	gctctgctcattgccatcag tgttgacacctctacttgga
<i>nrf2</i>	tcttgctccaaggatgct ggactacagtcccagcagga
<i>ucp3</i>	actccagcgtcgccatcaggattct taaacaggtgagactccagcaactt
<i>pdk4</i>	atattcagtgactcaaagacgggaa acactcaaaggcatcttgactact
<i>pgc1</i>	aagtgtggaactctctggaactg gggttatcttggttgctttatg
<i>ppary</i>	gatggaagaccactcgcatt aaccattgggtcagctcttg
<i>sirt1</i>	tgcaacagcatcttgccctg aggacatcgaggaactacctgatt
<i>sod1</i>	gagacctgggcaatgtgact gccaatgatggaatgctctc
<i>β-aktin</i>	tgtccacctccagcagatgt agctcagtaacagtccgcctaga

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden sieben bis neun Monate alte männliche C57BL/6-Mäuse aus betriebseigener Zucht des MPIs für Molekulare Genetik in Berlin verwendet. Die Tierstudien wurden vom Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales überprüft und genehmigt und entsprechend der international geltenden Vorschriften durchgeführt. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen bei 22 °C, 50% Luftfeuchtigkeit und einem Zwölf-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Das Gewicht der Mäuse wie auch die Futtermenge wurden wöchentlich gewogen. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Mäuse wurden in vier Gruppen eingeteilt, die entweder eine Kontrolldiät (D12450B LS, 10 mm Pellets, 13 kJ% Fett (Pflanzenöl), wenig Zucker, bestrahlt mit 25 kGy, Testsubstanzdiät, ssniff®), die Kontrolldiät mit 100 mg/ kg Resveratrol versetzt, eine fettreiche Diät (D12492, 10 mm Pellets, 60 kJ% Fett (Schweinefett), bestrahlt mit 25 kGy, Testsubstanzdiät, ssniff®, später: EF/PS D12330 mod, 10 mm Pellets, 58 kJ% Fett, ohne Zucker, bestrahlt mit 25 kGy, Testsubstanzdiät, Surwit) oder die fettreiche Diät mit 100 später 120 mg/ kg Resveratrol bekamen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde der Skelettmuskel der Hintergliedmaßen der Mäuse verwendet.

### 2.2.2 Zellkulturarbeiten

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten zellbasierten Experimente wurden C2C12-Zellen der Firma ATCC (Wesel, Deutschland) verwendet. Diese Myoblastenzelllinie entstammt ursprünglich dem Schenkelmuskel von Mäusen des C3H-Stamms. Sie wurde von David Yaffe und Ora Saxel 1977 durch seriell Passagieren von Myoblastenzellen nach einer Quetschverletzung des Muskels gewonnen [178]. Bei den hier verwendeten Zellen handelt es sich um einen von Helen Blau *et al.*[179] produzierten Subklon dieser Zelllinie. C2C12-Zellen wachsen adhärent und sind zur Differenzierung in der Lage.

#### 2.2.2.1 Kultivierung und Subkultivierung von C2C12-Zellen

Die Myoblastenzellen wurden in DMEM, welchem 10% fötales Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) zugesetzt war, bei 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einer 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre angezogen. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> oder 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen oder -schalen.

Entscheidend war, darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu dicht wachsen, um eine unkontrollierte Differenzierung zu vermeiden. Bei einer Konfluenz von etwa 60%, die diese alle zwei Tage erreichten, wurden sie im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dafür wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen und 1 - 2 ml TrypLE™ Express Lösung auf die Zellen gegeben. Die Kultur wurde für 2 - 3 min bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen vom Boden gelöst

hatten und frei in der Lösung schwammen. Sie wurden in Wachstumsmedium aufgenommen und ein entsprechendes Volumen in neue Zellkulturflaschen überführt.

#### 2.2.2.2 Einfrieren, Lagern und Auftauen von Zellen

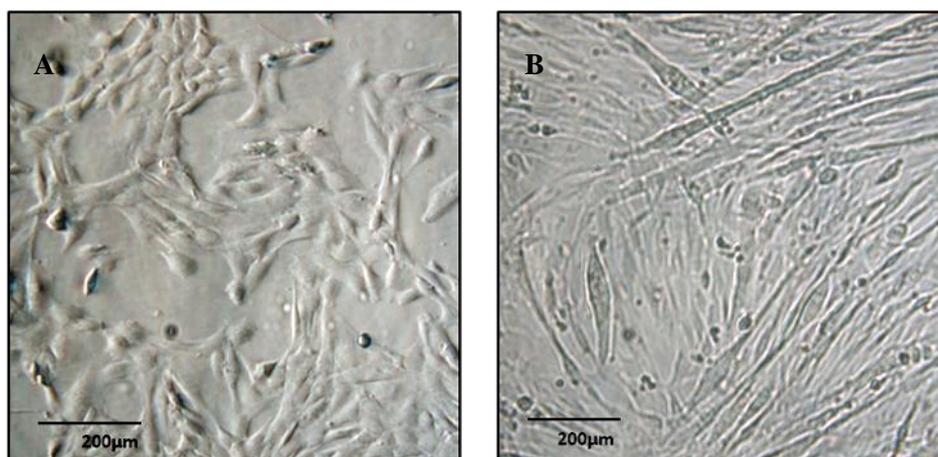
Für das Einfrieren einer definierten Anzahl an Zellen erfolgte eine Zellzahlbestimmung der trypsinierten Zellen gemäß 2.2.2.6. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 25 x g) und das Pellet in Einfriermedium aufgenommen, so dass eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen je ml erreicht wurde. Das dem Medium zugesetzte DMSO schützt die Zellen vor der Zerstörung durch Eiskristalle, deren Bildung beim Einfrieren verhindert wird.

Aliquots von je 1 ml wurden in Kryogefäße verteilt, im Kryo-Einfriergerät über Nacht langsam auf  $-80^\circ\text{C}$  herabgekühlt und am nächsten Tag zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde das Kryogefäß mit den Zellen im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  geschwenkt bis kein Eis mehr zu sehen war. Tropfenweise konnte nun die Zellsuspension in das vorinkubierte Wachstumsmedium gegeben werden. Je  $150\text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät.

#### 2.2.2.3 Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben

Für die Induktion der Differenzierung wurde bei einer Zelldichte von etwa 60% das Zellkulturmedium von 10% FBS auf 2% Pferdeserum (*horse serum*, HS) umgestellt. Die veränderten Kulturbedingungen gingen mit einer Veränderung der Morphologie der Zellen einher und führten schließlich zur Ausbildung von Myotuben. Die Zellen wurden 48 Stunden differenziert bevor sie für eine festgelegte Dauer behandelt und anschließend geerntet wurden. Abbildung 7 zeigt die Zellen vor (A) und nach der Differenzierung (B).



**Abbildung 7.** C2C12-Zellen als **A** undifferenzierte Myoblasten und als **B** ausdifferenzierte Muskelzellen (Myotuben).

#### 2.2.2.4 Behandlung der Zellen mit Resveratrol

Um die molekularen Effekte, die Resveratrol in Muskelzellen auslöst, studieren zu können, wurden differenzierte C2C12-Zellen zum einen mit unterschiedlichen Dosen und zum anderen über

unterschiedlich lange Zeiträume mit *trans*-Resveratrol behandelt. Nach der Differenzierung der Myoblasten für 48 Stunden wurde das Differenzierungsmedium durch frisches Differenzierungsmedium, welches eine entsprechende Menge an Resveratrol enthielt, ausgetauscht. Die Behandlung erfolgte bei dosisabhängigen Studien 16 Stunden mit 0 bis 100  $\mu\text{M}$  des Naturstoffs. Zeitabhängige Untersuchungen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol 0 bis 24 Stunden durchgeführt.

*Trans*-Resveratrol ist ein weißer Feststoff, der nur eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweist, weshalb die Stammlösung des Stoffes in 100% DMSO hergestellt wurde. Um Unterschiede in der DMSO-Konzentration, die bei der Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Resveratrol zum Medium entstehen, auszugleichen, wurden alle Lösungen auf 0,1% DMSO eingestellt.

### 2.2.2.5 Ernten der Muskelzellen

Die Zellen wurden nach der Behandlung entweder enzymatisch von der Oberfläche abgelöst oder durch Abschaben vom Flaschenboden gewonnen.

Bei der Methode der enzymatischen Ablösung wurde zuerst das Medium abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (+ 0,5x PPI) gewaschen. Nach Zugabe von 1,0 – 2,0 ml eines Trypsin ähnlichen Enzyms und Inkubation für 2 – 3 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  lösten sich die Zellen vom Boden und konnten mittels eiskaltem PBS (+ 1x PPI) von der Kulturschalenoberfläche gespült werden. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Medium mit Pferdeserum verdünnt und bis zur Zellzählung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert (25 x g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand verworfen und das Zellpellet ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Für das Abschaben der Zellen vom Untergrund wurde zuerst das Medium entfernt und verworfen und der Zellrasen mit PBS (+ 0,5x PPI) gewaschen. Daraufhin konnten die Zellen mittels Schaber und eiskaltem PBS (+ 1x PPI) von der Oberfläche der Kulturschalen gekratzt und in ein 15 ml - Gefäß überführt werden. Sie wurden herunterzentrifugiert (25 x g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), der Überstand verworfen und das Zellpellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.2.2.6 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer

Für Experimente mit einer definierten Anfangszellzahl wurde eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer durchgeführt. Eine Anfärbung der Myoblasten mit Trypanblau diente der Unterscheidung von toten und lebenden Zellen. Bei toten Zellen ist die Zellmembran nicht mehr intakt, wodurch der Farbstoff ins Zellinnere eindringen kann und diese unter dem Mikroskop, im Gegensatz zu lebenden Zellen, blau erscheinen.

Für die Färbung wurden zu 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension 50  $\mu\text{l}$  Trypanblau gegeben und 10  $\mu\text{l}$  der Suspension anschließend in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop konnte dann die Zellanzahl durch zählen der nicht gefärbten Zellen in den vier großen Eckquadraten der Kammer bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Verdünnung und des Volumens im Hämatozytometer

wurde die Konzentration der Zellsuspension berechnet. Durch Pelletierung der Zellen und Aufnahme in einem entsprechenden Volumen an Medium konnte danach die gewünschte Konzentration an Zellen je Milliliter eingestellt und damit eine definierte Zellanzahl in einem definierten Volumen ausgesät werden.

#### 2.2.2.7 Zellzahlbestimmung mittels CASY® Zellzähler

Das Prinzip des CASY® Zellzählers beruht auf einer Widerstandsmessung mit anschließender Pulsflächenanalyse. Dabei wird die Eigenschaft der zu zählenden Zellen genutzt, als elektrische Isolatoren zu wirken. Die sich in einer Elektrolytlösung befindlichen Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt, an deren Eintrittsöffnung ein elektrischer Strom angelegt ist. Passieren die Zellen diese, so kommt es zu einer Widerstandsänderung, die als Maß für das verdrängte Volumen der Elektrolytlösung durch die Zelle dient. Das Messsignal wird mittels Pulsflächenanalyse in den Durchmesser der Zelle umgerechnet. Als Ergebnis erhält man dann die Anzahl der Zellen pro Milliliter sowie deren Größenverteilung in der gemessenen Probe. Da sich die Integrität der Zellmembranen und damit die detektierten Größen von vitalen und toten Zellen unterscheiden, ermöglicht das CASY® Zellanalysesystem zudem eine separate Zählung.

Die Methode der Zellzahlbestimmung mittels Zellzähler hat klare Vorteile, wenn es notwendig ist die Zellanzahl mehrerer Proben zu bestimmen. Sie ist einfach, schnell und verlässlich, aber vor allem lassen sich systematische Fehler, die durch den Experimentator entstehen können, ausschließen. Aus diesem Grund wurde das CASY® Zellanalysegerät für alle in dieser Arbeit durchgeführten Tests genutzt, die einer Normalisierung anhand der Zellzahl bedurften.

Die Proben wurden für die Zellzahlbestimmung wie in 2.2.2.5 beschrieben vorbereitet. Nach dem Auftauen wurden 50 oder 100 µl der Zellsuspension in 10 ml einer isotonischen Flüssigkeit verdünnt und damit auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter eingestellt. Anschließend erfolgten drei unabhängige Messungen von je 400 µl der Probe.

### 2.2.3 Genexpressionsanalyse

#### 2.2.3.1 RNA-Isolation aus Muskelgewebe

Die RNA-Isolation ermöglicht zusammen mit einer nachfolgenden quantitativen Analyse Expressionsmuster von Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen. Für die Extraktion der RNA aus dem Muskelgewebe wurde eine TRIzol®-RNeasy-Kombinationsmethode eingesetzt.

Bei dem von Chomczynski und Sacchi [180] entwickelten Verfahren der RNA-Isolation durch Trennung von Proteinen, DNA und RNA in einem Zwei-Phasen-System wird ein Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Gemisch verwendet. Ein solches Gemisch enthält auch das eingesetzte TRIzol®-Reagenz der Firma Invitrogen. 20mg Muskelgewebe, welches zuvor mit eiskaltem 1x PBS gewaschen wurde, wurde in 600 µl TRIzol® aufgenommen und im TissueLyser

mittels Stahlkugel für 4 Minuten bei 20 Hz aufgeschlossen. Dabei half das im Reagenz enthaltene Guanidiniumisothiocyanat die Zellen und ihre Bestandteile zu lysieren und gleichzeitig die Integrität der RNA vor Denaturierung durch RNasen zu bewahren. Gewebereste wurden durch Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 120 µl Chloroform versetzt, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12000 x g, 15 min, 4°C) war eine Trennung des Gemisches in drei Phasen erkennbar. Dabei enthielt die obere wässrige Phase die RNA während sich in der Interphase und der unteren organischen Phase DNA und Proteine sammelten. Für die Präzipitation der RNA wurde die wässrige Phase mit 300 µl Isopropanol versetzt, für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4°C). Das RNA-Pellet wurde mit 600 µl 75%-igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (7500 x g, 5 min, 4°C), das Ethanol entfernt und an der Luft getrocknet. Das Lösen des Pellets erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser.

Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad der RNA zu erreichen, wurden die Proben anschließend einem zweiten Aufreinigungsverfahren unterzogen. Dafür wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden mit 350 µl des im Kit enthaltenen RLT Puffers und mit 350 µl 70%-igem Ethanol versetzt, anschließend auf eine Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Wechselwirkungen zwischen den Nukleinsäuren und der Silikamembran der Säulen bewirken unter hohen Salzbedingungen die Bindung der RNA an die Säulen. Es folgte ein Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer. 10 µl DNase I wurden mit 70 µl RDD-Puffer gemischt, auf die Säule gegeben und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, um DNA-Reste effektiv zu entfernen. Nach dem DNase-Verdau folgten ein Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer und zwei Waschschriffe mit 500 µl RPE-Puffer. Anschließend wurde die RNA von der Säule durch Zugabe von 45 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.3.3) und Absorptionmessung bei 260 und 280 nm (2.2.3.2) wurden die Reinheit und die RNA-Mengen überprüft.

#### 2.2.3.2 *Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung*

War nach der Isolation von Nukleinsäuren oder von Proteinen eine Überprüfung der Reinheit oder die Bestimmung der Konzentration nötig, so wurden für deren Analyse die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der Biomoleküle genutzt. Die photometrische Messung wurde mittels Nanodrop in einem Probenvolumen von 1 – 2 µl durchgeführt. Während Nukleinsäuren vor allem Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, befindet sich das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm. DNA wurde bei einem Verhältnis von  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ , RNA bei einem Verhältnis von  $\sim 2,0$  und Proteine bei einem Verhältnis von  $< 1,0$  als rein betrachtet.

### 2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wurde Agarose durch Erhitzen in 1x TBE-Puffer gelöst und nach kurzem Abkühlen 1 µl Ethidiumbromid pro 40 ml Gel dazugegeben. Nach dem Auspolymerisieren entstand je nach Agarosekonzentration (1 – 2 % [w/v]) eine Gelmatrix mit größeren oder kleineren Poren. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Vor der Befüllung der Geltaschen wurde Loading Dye zu den Proben gegeben. Die darin enthaltenen Farbstoffe ermöglichten das Fortschreiten der Auftrennung zu verfolgen. Als DNA-Marker wurden ein 100 bp-Marker oder eine 1 kb-Leiter mit bekannten Bandengrößen eingesetzt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 80 V wanderten die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle durch das Gel zur Anode. Dabei konnten kleinere Fragmente eine größere Strecke zurücklegen als größere. Nachdem die Banden genügend weit aufgetrennt waren, wurden sie unter UV-Licht durch den Nukleinsäure interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit dem UV Gel Imaging System Omega von UltraLum.

### 2.2.3.4 cDNA-Synthese mittels RT-PCR

Mittels Reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann RNA in cDNA umgeschrieben werden [181]. cDNA ist wesentlich stabiler als RNA und es besteht die Möglichkeit der Amplifikation. So kann nach der cDNA-Synthese eine Quantifizierung mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) erfolgen. Für die Umschreibung wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems verwendet. Die Reverse Transkription erfolgte nach Herstellerprotokoll. Es wurden 20 µl eines Reaktionsmix aus 1x RT-Puffer, 1x dNTP-Mix, 1x Random Primer, 50U MultiScribe RT, 20 U RNase Inhibitor und 1µg RNA hergestellt. Die cDNA-Synthese fand im Thermocycler bei 37°C für zwei Stunden statt (10 min 25°C, 120 min 37°C, 5 sec 85°C).

### 2.2.3.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Mit der quantitativen Real Time Polymerasekettenreaktion lassen sich DNA-Abschnitte vervielfältigen und gleichzeitig durch den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes quantifizieren. Sie beruht auf dem von Kary B. Mullis [182] entwickelten Prinzip der selektiven Amplifikation von DNA mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase. Dabei erfolgt die exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments durch mehrere aufeinanderfolgende Zyklen bestehend aus der Denaturierung der Doppelstränge, der Anlagerung der Primerpaare (Annealing) und der Neusynthese der komplementären DNA-Stränge (Elongation). Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wird bei dem Verfahren der qRT-PCR ein Farbstoff eingesetzt, der an Nukleinsäuren bindet und dabei ein Fluoreszenzsignal aussendet. Durch die Messung der Intensität des Signals während der PCR kann die Vervielfältigung der DNA in „Echtzeit“ verfolgt werden. Nach dem Lauf lässt die Bestimmung des

sogenannten *Cycle Threshold* (Ct)-Werts einen Rückschluss auf die relative Menge an eingesetztem Templat eines DNA-Abschnitts zu. Der Schwellenwert-Zyklus ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenzstärke das erste Mal einen festgelegten Wert, der die Hintergrundfluoreszenz definiert, überschreitet. Er befindet sich immer am Anfang der exponentiellen Phase der Amplifikation.

Für die Durchführung der qPCR wurde der Power SYBR® Green Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet. Dieser enthält eine hot start-Polymerase, die erst bei sehr hohen Temperaturen mit der Polymerisation beginnt. Das soll eine unspezifische Amplifikation verhindern und sicherstellen, dass die Doppelstränge beim Reaktionsstart vollständig aufgeschmolzen sind. Der PCR Mix wurde zusammen mit 300 nM Primer und dem Template (3 ng cDNA) in einem Reaktionsvolumen von 5 µl (cDNA) oder 10 µl (genomische DNA) auf einer 384-Lochplatte inkubiert. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 1 Zyklus: 10 min 95°C; 40 Zyklen: 15 sec 95°C, 1 min 60°C; 1 Zyklus: 15 sec 95°C, 15 sec 60°C, 15 sec 95°C.

Die quantitative Polymerasekettenreaktion wurde im 7900HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems durchgeführt und mit Hilfe der Software SDS 2.2.1 dokumentiert und analysiert. Die Spezifität der Amplifikation wurde im Anschluss an den Lauf mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse kontrolliert. Diese erfolgte durch die Messung der Fluoreszenzintensität während des Aufschmelzens der DNA im Thermocycler. Denaturieren die DNA-Stränge, so nimmt die Fluoreszenzintensität durch die Freisetzung des Farbstoffs stark ab. Da die Denaturierungstemperatur von der Fragmentgröße abhängig ist, lassen sich unspezifische Produkte anhand der Fluoreszenzabnahme identifizieren. Kleinere DNA-Fragmente denaturieren bei einer geringeren Temperatur als größere und zeigen somit schneller eine Verringerung der Fluoreszenzintensität. Idealerweise weisen die Amplifikate demnach eine einheitliche Schmelztemperatur auf. Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte nach dem Lauf auf ein Agarosegel (2.2.3.3) aufgetragen, um die Primerspezifität zu überprüfen. Das Mitführen einer Negativkontrolle, d.h. eines Reaktionsansatzes ohne Template DNA, ermöglichte die Überprüfung der eingesetzten Komponenten auf eine Verunreinigung mit Fremd-DNA.

Für die Quantifizierung wurde außerdem eine interne Kontrolle gemessen, um Variationen in der Ausgangsmenge auszugleichen. Bei der RNA-Analyse diente  $\beta$ -Aktin als Referenz-Gen. Die Menge an gemessener genomischer DNA bei der Chromatinimmunopräzipitation wurde auf die Inputmenge bezogen.

Während der Polymerasekettenreaktion sollte pro Zyklus genau eine Verdopplung der DNA-Menge erfolgen. Dafür sind optimale Amplifikationsbedingungen notwendig, die jedoch nicht immer gegeben sind. Aus diesem Grund wurden die Primereffizienzen anhand einer Konzentrationsreihe der zu untersuchenden DNA-Proben bestimmt und bei der Quantifizierung mit einberechnet.

#### 2.2.4 *Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)*

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ist eine Form der Immunopräzipitation (IP), die die Untersuchung der Interaktion von Proteinen mit der DNA innerhalb einer Zelle zum Ziel hat. So ermöglicht diese Methode die Identifikation von Bindungsstellen eines bestimmten Transkriptionsfaktors auf der DNA oder auch die Lokalisation von epigenetischen Modifikationen des Chromatins. Darüber hinaus kann das Verfahren Aufschluss über mögliche Interaktionsorte des Chromatins mit Enzymen geben, die für die epigenetischen Veränderungen verantwortlich sind.

Für die Interaktionsuntersuchung wird die Protein-DNA-Bindung fixiert, das Chromatin durch eine Ultraschallbehandlung in Fragmente von einigen hundert Basenpaaren zerkleinert und das zu untersuchende Protein oder die interessierende Histonmodifikation mit einem spezifischen Antikörper immunopräzipitiert. Nach der Auflösung des DNA-Protein-Komplexes kann eine Analyse der präzipitierten DNA mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgen. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsablaufes findet sich unter 2.2.4.1 bis 2.2.4.5.

##### 2.2.4.1 *Probenvorbereitung*

Für den Versuch wurden 30 mg Muskelgewebe abgewogen und mittels Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Die Zugabe einer 1%-igen Formaldehydlösung in PBS (+ 1x PI) diente der Fixierung der Protein-DNA-Bindung. Nach 5-minütigem Rotieren stoppten 125 mM Glycin die Reaktion ab. Das Gewebe wurde weitere 5 Minuten in der Lösung rotiert und anschließend mit 710 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das zerkleinerte Gewebe in 200 µl eiskaltem Lysispuffer aufgenommen und für 4 Minuten bei 20 Hz im TissueLyser homogenisiert. Die Proben wurden während des Prozesses kühl gehalten. Nach der Zugabe von 1% Natriumlaurylsulfat folgte eine Ultraschallbehandlung im Bioruptor für 45 Zyklen (1 Zyklus: 30 Sekunden an, 30 Sekunden aus) auf höchster Stufe. Dabei entstanden DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bis 500 Basenpaaren. Im Anschluss wurde das Lysat zentrifugiert (20000 x g, 10 min, 4°C) um Gewebereste zu entfernen. Der Überstand konnte nun für die Immunopräzipitation verwendet werden.

##### 2.2.4.2 *Überprüfung der Fragmentgrößen*

Vor der IP erfolgte die Überprüfung der DNA-Fragmentgrößen auf einem Agarosegel. Um die Protein-DNA-Bindung wieder zu lösen wurden 15 µl des Überstands mit 400 µl Salzlösung versetzt und über Nacht bei 65°C und 1300 rpm geschüttelt. Außerdem wurden 20 µg RNase dazu gegeben. Die Beseitigung der Proteine fand anschließend durch Inkubation mit 4 µg Proteinase K bei 63°C für 2 Stunden und anschließender Aufreinigung unter Verwendung des MinElute® PCR Purification Kits statt. Für die Aufreinigung wurde das Herstellerprotokoll befolgt. Die Elution der DNA erfolgte in 15 µl Wasser. Für die Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben wurde eine photometrische Messung entsprechend 2.2.3.2 durchgeführt. Die Größenverteilung der entstandenen DNA-Fragmente zeigte die Auftrennung von 12 µl Probe im Agarosegel (2.2.3.3).

#### 2.2.4.3 Immunopräzipitation

Für die selektive Präzipitation wurden die spezifischen Antikörper an magnetische Kügelchen gebunden, um später eine Abtrennung von den ungebundenen Proteinen mit Hilfe eines Magneten zu erreichen. Die Antikörper-Kugel-Bindung wird durch Protein A vermittelt, welches an der Oberfläche der Magnetkugeln fixiert ist. Das aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* stammende Protein besitzt die Fähigkeit, die Fc-Domäne von Immunglobulinen zu binden.

Zuerst wurden die Magnetkügelchen gewaschen. Dafür wurden pro Ansatz zu 10 µl Beads 20 µl RIPA-Puffer gegeben, mit 190 x g für eine Minute bei 4°C zentrifugiert, die Kugeln an einen Magneten gezogen und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt und die Beads im Anschluss in 100 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Nun folgte die Bindung der Antikörper durch das auf den Kugeln befindliche Protein A. Pro Ansatz wurden 3 µg Antikörper pro Ansatz dazugegeben und für zwei Stunden mit 40 rpm bei 4°C auf einem Rotorrad rotiert. Anschließend wurde der Überstand nach der Zentrifugation mit 190 x g für eine Minute bei 4°C und magnetischer Anziehung der Kügelchen abgenommen. 200 µl verdünntes Gewebelysat (30 µl Lysat in 170 µl RIPA-Puffer) wurde zu den Kügelchen gegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. 100 µl der verdünnten Probe wurden als Input bei -20°C aufbewahrt.

Um ungebundene Proteine zu entfernen folgten mehrere Waschschriffe. Die Proben wurden für eine Minute mit 190 x g bei 4°C zentrifugiert, die Kügelchen an einen Magneten gezogen und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Kügelchen mit 100 µl RIPA-Puffer versetzt und für vier Minuten unter rotieren bei 4°C gewaschen. Dieser Vorgang erfolgte drei Mal. Im Anschluss wurde die Probe mit 100 µl Puffer C gewaschen. Um unerwünschte DNA zu beseitigen, die an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes haftet, wurden die Chromatin-Histon-Antikörper-Magnetkugel-Komplexe in ein neues Gefäß überführt. Bis zu diesem Schritt fand der gesamte beschriebene Versuchsablauf bei 4°C statt. Die anschließende Auflösung der DNA-Protein-Bindung und die Aufreinigung der DNA wurden bei RT durchgeführt.

#### 2.2.4.4 DNA-Isolation

Zur Isolation der DNA aus den präzipitierten DNA-Histon-Antikörper-Magnetkugel-Komplexen müssen die Bindungen zwischen den einzelnen Komponenten als erstes gelöst werden bevor die Aufreinigung der DNA erfolgen kann. Dafür wurde der Waschpuffer von den Kügelchen entfernt und Elutionspuffer zu den Proben gegeben. Ab diesem Schritt wurden die immunopräzipitierten Proben und der Input parallel behandelt. Zu ersteren wurde 150 µl kompletter Elutionspuffer mit 30 µg RNase, zum Input 300 µl Elutionspuffer mit 60 µg RNase gegeben. Beide schüttelten mit 1300 rpm für zwei Stunden bei 65°C. Es folgte ein Proteinase K-Verdau mit 7,5 bzw. 15µg des Enzyms für zwei Stunden bei 63°C unter Schütteln. Nachdem die Proben zentrifugiert (190 x g für eine Minute bei 4°C) und die Kügelchen mittels Magneten vom Überstand getrennt waren, konnte dieser abgenommen und aufgereinigt werden. Für die Isolation der DNA wurde das MinElute® DNA Purification Kit

verwendet und die Aufreinigung nach Protokollangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte in 20µl Wasser. Für eine anschließende Messung des DNA-Gehalts diente der PicoGreen Assay entsprechend 2.2.4.5. Die Analyse der präzipitierten DNA fand mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR statt (2.2.3.5).

#### 2.2.4.5 *PicoGreen Assay*

Eine sehr sensitive Bestimmung des DNA-Gehalts ist mit Hilfe des PicoGreen Assays möglich. Durch einen DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff können unter Verwendung eines NanoDrop 3300 bis zu 1 pg/ µl doppelsträngige DNA detektiert werden. Die Durchführung der Messung erfolgte nach Herstellerangaben des verwendeten Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Kits. Die zu messende Probe wurde 1:1 mit 1xPicoGreen® dsDNA Reagenz gemischt, für 5 Minuten bei RT inkubiert und gemessen (Ex/Em=480/525nm). Die immunopräzipitierten Ansätze wurden zuvor 1:3, der Input 1:20 in Wasser verdünnt, um sicher zu stellen, dass die gemessenen Werte in den Bereich der Standardgerade fallen. Für die Standardgerade wurde eine Konzentrationsreihe von 1 pg bis 1 ng Lambda-DNA pro µl hergestellt. Die Messung fand in einem Probenvolumen von 2µl statt.

#### 2.2.5 *Quantifizierung von Proteinen und posttranslationalen Proteinmodifikationen*

##### 2.2.5.1 *Quantitative Proteinbestimmung mittels Bradford-Test*

Der 1976 von Marion M. Bradford entwickelte Test [183] diente der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Das Testprinzip beruht auf der spezifischen Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an die kationischen und unpolaren hydrophoben Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Diese Komplexbildung bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 470 auf 595 nm. Eine photometrische Messung beim Absorptionsmaximum der gebundenen Form lässt einen Rückschluss auf die Gesamtproteinkonzentration der Lösung zu.

Zur Messung des Proteingehalts wurden 10 µl einer Probe mit 200 µl Farbstofflösung (Bio-Rad Protein Assay Dye) in einer 96-Lochplatte gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Absorption im POLARstar Omega (BMG Labtech) bei 595nm gemessen wurde. Die Erstellung einer BSA-Eichreihe im Bereich von 25 bis 250 µg BSA pro Milliliter diente die Berechnung der Proteinkonzentration der Probe. Alle Proben wurden vor der Messung so verdünnt, dass ihre Absorptionswerte in den Bereich der Standardkurve fielen.

##### 2.2.5.2 *Herstellung von Gewebe- und Zellextrakten zur Western Blot-Analyse*

Für die Herstellung der Gewebe- oder Zellextrakte zur Western-Blot Analyse wurden 10 mg Muskelgewebe oder  $\sim 1 \times 10^7$  Muskelzellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in 100 µl Lysispuffer aufgenommen. Die Proben wurden für insgesamt 4 Minuten bei 20 Hz im TissueLyser mit einer

Stahlkugel durch mechanische Scherkräfte homogenisiert. Um sicher zu stellen, dass die Proben während dieses Prozesses kühl blieben, wurden die Adapter des Gerätes vorgekühlt und die Homogenisierung jede Minute unterbrochen, um die Proben für fünf Minuten auf Eis zu stellen. Anschließend fand für 15 Zyklen (1 Zyklus: 30sec on, 30sec off) eine Ultraschallbehandlung im Bioruptor® statt. Um das Aufbrechen der Zellkernmembran zu erleichtern wurde vor dem Ultraschallbad 1% SDS zu den Proben gegeben. Zur Abtrennung des Lysats von Gewebe- oder Zellresten erfolgte ein Zentrifugationsschritt (20000 x g, 5 min, 4°C).

Vor der weiteren Prozessierung der Proben wurde deren Proteingehalt mittels Bradford Assay (2.2.5.1) bestimmt und auf gleiche Konzentrationen eingestellt. Zu 7,7 µl Proteinlysate wurden 3,3 µl Ladepuffer gegeben und bei 70°C für 10 Minuten im Thermocycler erhitzt. Das im Ladepuffer enthaltene LDS bzw. DTT unterstützte die vollständige Denaturierung der Proteine.

#### 2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Vor der Auftragung auf das Gel werden die Proben mit einem denaturierenden Detergenz wie in 2.2.5.2 beschrieben behandelt. Dieses anionische Detergenz bindet an Aminosäuren und überdeckt deren Eigenladung. Dadurch entsteht eine negative Ladungsverteilung über das gesamte Protein und es wird annähernd ein konstantes Ladung-zu-Größe-Verhältnis erreicht. Die Migrationsgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nur noch von der Größe und nicht mehr von der Ladung abhängig.

Für die Auftrennung der vorbereiteten Proben wurden 10 µl (30 oder 40 µg Protein) auf ein 4-12%-iges NuPAGE® Bis-Tris-Gel geladen. Es wurde ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, bei dem der MES SDS Puffer der Firma Invitrogen als Laufpuffer diente. Das Anlegen einer elektrischen Spannung bewirkte die Migration der negativ geladenen Proteine zur Anode. Dabei wanderten die kleineren Proteine schneller durchs Gel als die höhermolekularen, da sie die Poren leichter passieren konnten. Die Elektrophorese war beendet als die Proben genügend weit gelaufen waren. Bei einer Spannung von 100V dauerte der Lauf zwei bis drei Stunden. Für den späteren Vergleich des Molekulargewichts eines detektierten Proteins mit einem Standard wurde auf jedem Gel ein Größenmarker mit aufgetragen.

#### 2.2.5.4 Proteintransfer mittels Western Blot

Die in der vorangegangenen Polyacrylamidgelelektrophorese in Banden aufgetrennten Proteingemische werden bei dem Western Blot-Verfahren auf eine Trägermembran übertragen, auf der sie anschließend nachgewiesen werden können [184]. Der Transfer findet durch ein zum Gel senkrecht ausgerichtetes elektrisches Feld statt. Dieses bewirkt die Wanderung der Proteine aus dem Gel auf die Membran, an der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert werden.

Die verwendete Nitrozellulosemembran wurde vor dem Transfer für 10 Minuten in bidestilliertem Wasser und anschließend wie auch alle weiteren Blottingkomponenten in Transferpuffer geschwenkt. Zusammen mit dem Proteingel wurde sie zwischen 2x2 Whatman® Filterpapier und zwei Schwämme geklemmt und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Dabei war die Membran zur Anode ausgerichtet. Der Transfer dauerte bei einer Stromstärke von 400 mA zwei Stunden lang. Um eine starke Wärmeentwicklung zu vermeiden, wurde der Western Blot im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

### 2.2.5.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung lassen sich Proteine nach einer Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel visualisieren. Die Färbung wurde hier nach dem Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran durchgeführt, um sicher zu stellen, dass dieser erfolgreich gewesen ist. Das Gel wurde in bidestilliertem Wasser gewaschen und in einer Färbelösung, die den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 enthielt, für 15 Sekunden bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für weitere 15 Minuten in dieser bei RT inkubiert. Zum Auswaschen von überschüssiger Farbe folgte die Behandlung mit Entfärber. Das Gel wurde ebenfalls für 15 Sekunden bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für weitere 15 Minuten in der Lösung inkubiert. Der Entfärber wurde erneuert und das Proteingel über Nacht so weit ausgewaschen bis der Hintergrund nahezu klar war.

### 2.2.5.6 Ponceau-Färbung von Membranen

Die Ponceau-Färbung dient der reversiblen Anfärbung von Proteinen auf einer Membran. Hier wurde der Farbstoff genutzt, um die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran nach dem Western Blot zu überprüfen. Dabei gibt die Färbung Aufschluss über den Erfolg des Transfers, den Lauf der Proteine im Gel und die Menge an geladener Probe.

Die Membran wurde nach der Proteinübertragung kurz in Transferpuffer gewaschen und anschließend in einer Ponceau S enthaltenden Färbelösung geschwenkt. Der Farbstoff bindet an die positiv geladenen Aminosäuren und macht infolgedessen Proteine sichtbar. Er wurde durch siebenmaliges Waschen mit 1x TBS wieder entfernt und die Membran konnte für die spezifische Detektion von Proteinen mittels Antikörper weiterverwendet werden.

### 2.2.5.7 Immunologische Proteindetektion

Die aufgetrennten und auf die Membran transferierten Proteine konnten mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert und visualisiert werden. Nach dem Western Blot wurde die Membran mit 2,5% BSA/ 2,5% Milchpulver in TBST für eine Stunde unter Schütteln bei RT abgesättigt, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend erfolgte die Antikörperbehandlung durch Zugabe von 10 ml des in BSA oder Milchpulver verdünnten, spezifisch gegen das gewünschte Protein gerichteten, primären Antikörpers auf die Membran. Die Inkubation fand über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C statt. Um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper zu

entfernen, wurde die Membran für 3x 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde sie mit einem mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten sekundären Antikörper, der die Fc-Domäne des Primärantikörpers erkennt, für eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein 3x10 minütiger Waschschrift mit TBST. Durch Zugabe des Zwei-Komponenten-Chemilumineszenz-Reagenzes auf die Membran konnte die aus der HRP-katalysierten Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form resultierende Chemilumineszenz detektiert werden. Diese wurde mit Hilfe des Fuji LAS-1000 Geldokumentationssystems festgehalten und konnte anschließend mit Hilfe der Software GelAnalyzer2010a quantifiziert werden.

#### 2.2.5.8 *Membranstripping*

Der Nachweis von verschiedenen Proteinen auf einer Membran wird durch das Strippen möglich. Bei diesem Verfahren werden die an die Proteine gebundenen Antikörper wieder von der Membran gelöst.

Nach der Immunodetektion wurde der Blot für 15 Minuten in TBS-T gewaschen, um das verwendete Chemilumineszenzreagenz zu entfernen. Für das Lösen der Antikörper wurde die Membran bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter leichtem Schwenken in 10 ml Restore™ Western Blot Stripping Buffer inkubiert. Nach 3x 10 minütigem Waschen in TBS-T konnten die Proteine erneut, wie in 2.2.5.6 beschrieben, nachgewiesen werden.

#### 2.2.6 *Analyse von Metaboliten*

##### 2.2.6.1 *Pyruvat*

Die Menge an Pyruvat, die in einer Muskelzelle vorhanden ist, wurde mittels Pyruvate Assay Kit der Firma Biovision (Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Der Assay basiert auf der Umwandlung von Pyruvat durch die Pyruvatoxidase in ein Produkt, welches für eine weitere Enzymreaktion nötig ist, bei der am Ende ein Farb- bzw. Fluoreszenzsignal entsteht. Die Stärke des Signals ist proportional zu der Menge an Pyruvat in der gemessenen Probe und ermöglicht anhand einer erstellten Standardkurve eine direkte Bestimmung der Pyruvatkonzentration.

Für die Messung des Pyruvats in den Gewebeproben mussten diese zuerst aufgeschlossen werden. Dafür wurde 50mg Gewebe abgewogen, mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und in 250 µl eiskaltem Pyruvat Assay Puffer mittels TissueLyser und Stahlkugel homogenisiert. Der Homogenisierungsprozess fand für vier Minuten bei 20 Hz statt. Um sicher zu stellen, dass die Proben während der gesamten Prozessierungsphase kühl blieben, wurden die Adapter des Gerätes vorgekühlt und die Homogenisierung jede Minute unterbrochen, um die Proben für fünf Minuten auf Eis zu stellen. Zur Abtrennung des Homogenats von Geweberesten erfolgte anschließend ein Zentrifugationschritt mit 20000 x g für 5 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde in einen 10 kD Ausschlussfilter überführt und für ca. 40 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat diente der späteren

Pyruvatmessung während der vom Filter zurückgehaltene Teil der Probe Enzyme enthielt, die die Quantifizierung durch den Verbrauch von Pyruvat beeinflussen würden.

Zur Bestimmung der Menge an Pyruvat in den behandelten C2C12-Zellen wurde die Aufnahme von Pyruvat aus dem Medium gemessen. Die Pyruvatquantifizierung innerhalb der Zellen war aufgrund einer zu geringen Konzentration nicht möglich. Das Medium welches entsprechend 2.2.2.5 gewonnen wurde, wurde nach dem Auftauen 1:10 in Pyruvat Assay Puffer verdünnt und konnte anschließend gemessen werden.

Die Quantifizierung des Pyruvats erfolgte laut Herstellerprotokoll, wurde aber in einem kleineren Reaktionsvolumen durchgeführt. Der Reaktionsmix bestehend aus Pyruvat Assay Puffer, Substrat und Enzymmix wurde wie angegeben hergestellt und 5  $\mu$ l des Gemisches mit 5  $\mu$ l der zu messenden Probe vermengt, für 30 Minuten im Dunklen bei RT inkubiert und anschließend im 384-er Plattenformat im POLARStar Omega gemessen. Für die Bestimmung des Pyruvatgehalts im Muskelgewebe wurde die emittierte Fluoreszenz (Ex/Em = 535/590) der Probe aufgezeichnet und für die Quantifizierung im Medium die Absorption bei 570 nm gemessen.

Um Unterschiede herauszurechnen, die zwischen den Gewebeproben aufgrund unterschiedlicher Aufschlusseffizienz oder bei der Pyruvatmessung im Medium durch eine abweichende Zellanzahl entstanden sind, wurde entweder der Proteingehalt mittels Bradfordtest (2.2.5.1) oder die Anzahl der Zellen wie in 2.2.2.7 beschrieben bestimmt und die Pyruvatkonzentration anhand der gemessenen Werte normalisiert.

### 2.2.6.2 *Lactat*

Zur Lactatquantifizierung wurde das Lactate Assay Kit der Firma Biovision verwendet. Dieses basiert auf einer spezifischen Reaktion von Lactat mit einem Enzym, welche ein Produkt entstehen lässt, das wiederum für eine Enzymreaktion benötigt wird, bei der ein Farb- oder Fluoreszenzsignal entsteht, welches direkt proportional zur Menge an Lactat in der gemessenen Probe ist.

Die Probenvorbereitung für die Messung gestaltete sich ähnlich wie der in 2.2.6.1 beschriebenen. 50 mg Gewebe wurde in 250  $\mu$ l eiskaltem Lactat Assay Puffer homogenisiert und nach der Filtration 1:50 verdünnt. Für die Bestimmung des von den Muskelzellen produzierten Lactats wurde das mit den Zellen inkubierte Medium (2.2.2.5) mit Lactat Assay Puffer je nach Inkubationszeit unterschiedlich stark verdünnt.

Die Absorptionsmessung bei 570 nm wurde in einem miniaturisierten Reaktionsvolumen von 10  $\mu$ l, bestehend aus Reaktionsmix und Probe, laut Hersteller durchgeführt. Eine Normalisierung erfolgte anhand des Proteingehalts (2.2.5.1) oder entsprechend der Zellanzahl (2.2.2.7).

### 2.2.6.3 *NAD<sup>+</sup> und NADH*

Die Ermittlung des NAD<sup>+</sup>- sowie des NADH-Gehalts fand unter Verwendung des NAD<sup>+</sup>/NADH-Quantifikation Kit von Biovision statt. Das Prinzip des Tests beruht auf einer Reaktion von NADH mit einem Reagenz, welche entsprechend der Menge an NADH zu einer Absorption bei 450 nm führt und die Bestimmung der Nukleotidkonzentration in der gemessenen Probe ermöglicht. NAD<sup>+</sup> und NADH werden separat quantifiziert. In einem Teil der Probe wird das hitzeempfindliche NAD<sup>+</sup> zerstört und nur das vorhandene NADH gemessen. Im anderen Teil wird NAD<sup>+</sup> durch eine Enzymreaktion in NADH umgewandelt und die Gesamtmenge der beiden Nukleotide ermittelt. Durch die Subtraktion der NADH- von der Gesamtmenge kann der NAD<sup>+</sup>-Gehalt berechnet werden.

Die Quantifizierung von NAD<sup>+</sup> und NADH fand entweder im Mausmuskelgewebe oder in C2C12-Zellen statt. Dafür mussten die Gewebe- bzw. Zellproben als erstes homogenisiert und anschließend gefiltert werden. Die Durchführung entsprach im Wesentlichen der in 2.2.6.1 beschriebenen. Es wurden 20 mg Gewebe oder  $\sim 2 \times 10^7$  Zellen in 200  $\mu$ l Extraktionspuffer aufgenommen und im TissueLyser zerkleinert. Das entstandene Homogenat wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und filtriert. Anschließend erfolgte die Zerstörung von NAD<sup>+</sup>. Dafür wurden 70  $\mu$ l des Filtrats für 30 Minuten bei 60°C erhitzt, während der Rest der Probe auf Eis lagerte. Vor der Messung des NAD-Gehalts wurden die Proben 1:4 mit Extraktionspuffer verdünnt.

Zur Bestimmung der Menge an NADH und NADt wurden jeweils 5  $\mu$ l des hitzebehandelten und unbehandelten Filtrats mit 10  $\mu$ l Enzymmix gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jeder Probe wurde 1  $\mu$ l Reagenz gegeben, 16  $\mu$ l in eine 384-Lochplatte überführt und nach 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 450 nm mittels POLARstar bestimmt. Eine erstellte Standardkurve ermöglichte die Berechnung der NAD-Konzentration in jeder Probe. Der Normalisierung anhand des Proteingehalts diente ein Bradford Test (2.2.5.1).

### 2.2.6.4 *ADP und ATP*

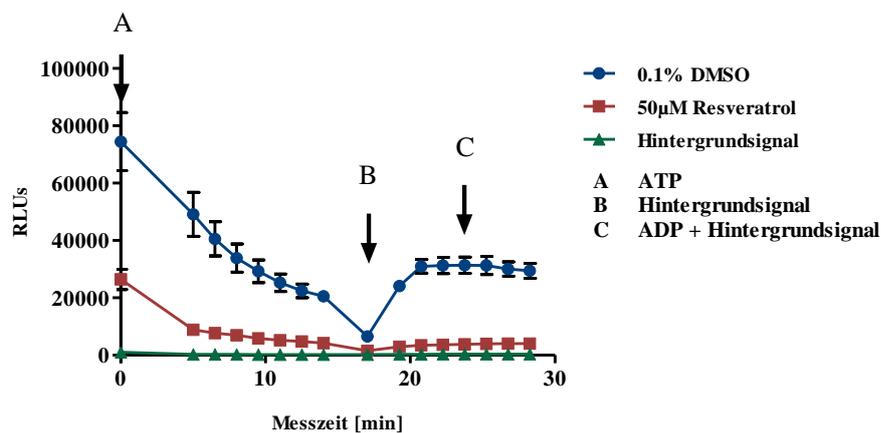
Für die Detektion von ADP und ATP wurde das Apoglow® Assay Kit der Firma Lonza (Köln, Deutschland) verwendet, welches auf einer Messung der unter ATP-Verbrauch produzierten Biolumineszenz beruht. Es findet eine Umwandlung von ATP und Luziferin unter Verwendung von Sauerstoff zu Oxyluziferin, AMP, Pyrophosphat, Kohlendioxid und Licht statt. Diese Reaktion wird durch das Enzym Luziferase vermittelt und ist linear abhängig von der verfügbaren Konzentration an ATP. Die Stärke des emittierten Lichtes kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden. Bei der hier verwendeten Methode wird, nachdem die beschriebene Reaktion vollständig abgelaufen ist, ADP zu ATP konvertiert und das entstandene ATP wiederum durch Umwandlung mittels Luziferase als Biolumineszenz detektiert.

Die Kultivierung, Differenzierung und Behandlung der Muskelzellen erfolgte direkt in der 384-Lochplatte in einem Volumen von 25  $\mu$ l. Vor der Messung wurde die Zellkulturplatte auf

Raumtemperatur gebracht. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  NRR lysiert, um die zu messenden Nukleotide für das Enzym frei zugänglich zu machen.

Für die Bestimmung des ATP-Gehalts wurden 5  $\mu\text{l}$  des Luziferasereagenzes NMR zu den Proben gegeben und mit einer Verzögerung von zwei Sekunden die Stärke der entstandenen Biolumineszenz detektiert. Die Reaktion lief für weitere 10 Minuten ab bis nahezu das gesamte ATP aufgebraucht war. Gleichzeitig mit der Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  ADP-Umwandlungsreagenz (ADP-CR) wurde das Hintergrundsignal aufgezeichnet. Nach weiteren 5 Minuten Reaktionszeit wurde die Menge an ADP durch Konversion in ATP gemessen.

In Abbildung 8 ist zur Illustration der Messverlauf zweier unterschiedlich behandelte Zellkulturproben dargestellt. Punkt A zeigt die entstandene Biolumineszenz nach Zugabe des NMRs. Die Stärke dieses Signals entspricht der Menge an ATP in der gemessenen Probe. Punkt B stellt das Hintergrundsignal dar, welches zur Berechnung des ADP-Gehalts vom Wert am Punkt C subtrahiert wird.



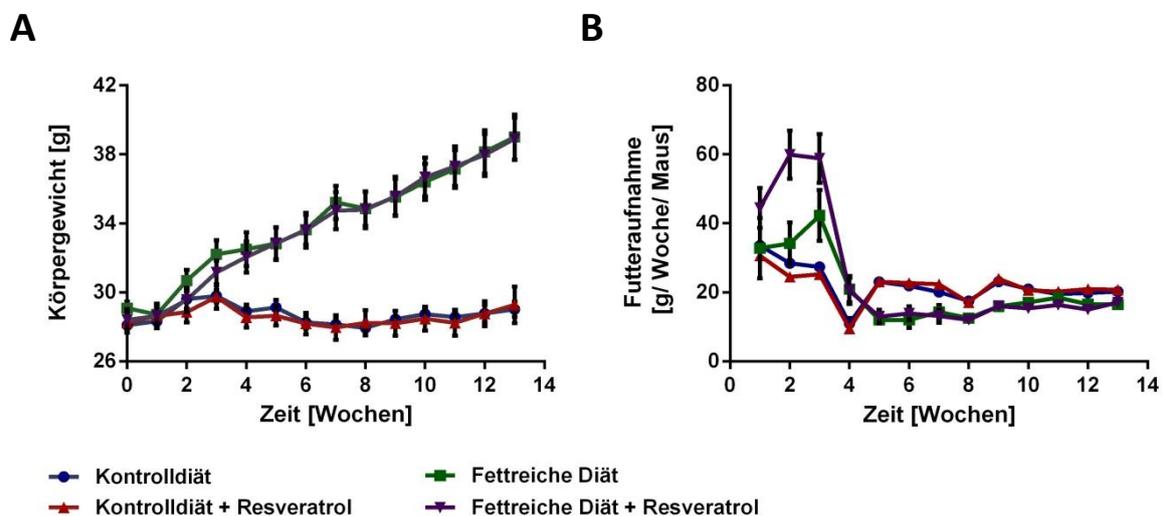
**Abbildung 8.** Messverlauf für die ADP-/ ATP-Quantifizierung. Gezeigt sind zwei unterschiedlich behandelte Zellkulturproben. Zellen wurden mit 0,1% DMSO oder 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol behandelt. Die Inkubation von Medium ohne Zellen stellt die Messkurve des Hintergrundsignals dar. Nach Zugabe des Luziferasereagenzes (NMR) wurde zum Zeitpunkt Null (Punkt A) die Lumineszenzintensität, die den ATP-Gehalt widerspiegelt, gemessen. Nachdem das gesamte ATP umgesetzt war, wurde gleichzeitig mit der Zugabe des ADP-Konvertierungsenzyms ein zweiter Messpunkt (Punkt B) aufgezeichnet, der die verbleibende Hintergrundlumineszenz der Probe definiert. Nach Umwandlung von ADP zu ATP entstand durch die luziferasevermittelte Umsetzung des ATPs wiederum ein Lumineszenzsignal. Somit stellt Punkt C die Signalintensität dar, die dem ADP-Gehalt + Hintergrundsignal entspricht.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 GEWICHTSENTWICKLUNG DER VERSUCHSTIERE

Um mögliche Effekte von Resveratrol auf die Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere zu belegen, wurde das Gewicht wie auch die Nahrungsaufnahme der C57BL/6-Mäuse wöchentlich über den Behandlungszeitraum von 13 Wochen dokumentiert.

Abbildung 9A zeigt die Entwicklung des Körpergewichts der in vier Gruppen eingeteilten Tiere. Zwei Gruppen bekamen eine Standarddiät mit einem Fettgehalt von nur 13% (K) verabreicht, während den anderen beiden Nahrung mit einem Fettanteil von 60% gefüttert wurde (F). Das Futter jeweils einer Gruppe enthielt zudem einen Zusatz von 100 mg trans-Resveratrol pro kg Nahrungsmenge (K+Rsv und F+Rsv). Bei der Zunahme des Körpergewichts zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Mäusen, die die Kontrolldiät bekamen zu denen, die sich sehr kalorienreich ernährten. Dabei gibt es jedoch zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Differenz zwischen den Tieren, denen Resveratrol verabreicht wurde zu denen, deren Futter der gleichen Diät kein Resveratrol enthielt. Bereits nach vier Wochen kristallisierte sich ein sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) höheres Körpergewicht der Mäuse heraus, die eine hochkalorische Diät bekamen. Das durchschnittliche Endgewicht betrug für K 29,0 g  $\pm$  0,5 g, für K+Rsv 29,3 g  $\pm$  1,1 g, für F 39,0 g  $\pm$  1,3 g und für F+Rsv 38,9 g  $\pm$  1,2 g, was rund 101% (K+Rsv), 135% (F) und 134% (F+Rsv) des Gewichts der Mäuse der Kontrollgruppe entspricht.



**Abbildung 9. A** Gewichtsentwicklung und **B** Futteraufnahme der Mäuse über den Behandlungszeitraum von drei Monaten. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert (*arithmetic mean, M*) und der Standardfehler des arithmetischen Mittels (*standard error of the mean, SEM*) basierend auf zwölf Tieren pro Gruppe.

Abbildung 9B verdeutlicht, dass die Menge der aufgenommenen Nahrung in allen vier Gruppen ähnlich war und sich nur der Kaloriengehalt dieser unterschied. Damit lässt sich ein Einfluss der Futtermenge auf die Gewichtsentwicklung ausschließen und ein Vergleich ist möglich. Die Tiere hatten unbegrenzt Zugang zu Nahrung und die Menge an aufgenommenem Futter wurde über das

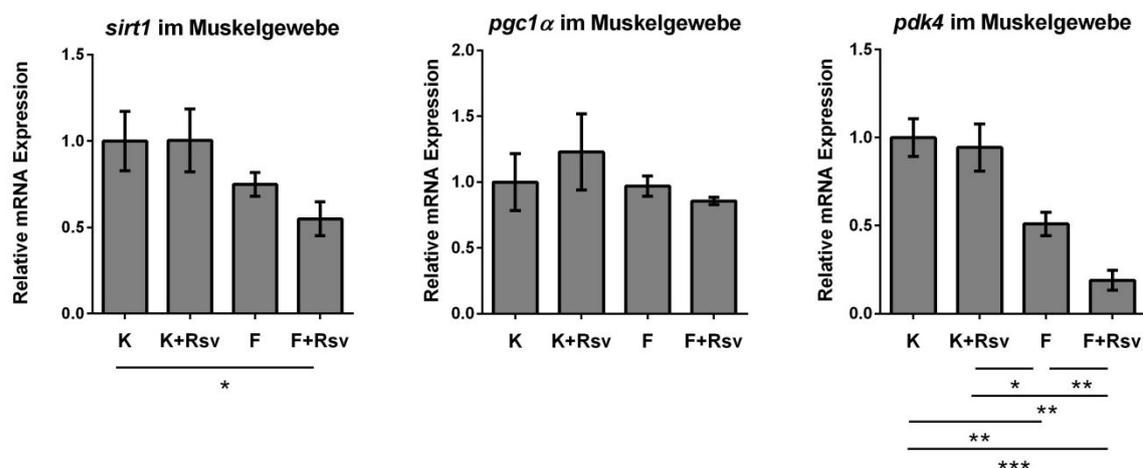
Wiegen der Nahrung vor Futtergabe und des Restbestands nach einer Woche kalkuliert. Die durchschnittliche Futteraufnahme betrug für K 21,9 g ± 1,7 g, für K+Rsv 21,7 g ± 1,5 g, für F 20,4 g ± 4,6 g und für F+Rsv 24,3 g ± 5,9 g pro Woche und Maus.

### 3.2 STOFFWECHSELREGULATION

#### 3.2.1 *sirt1*, *pgc1α* und *pdk4*

Hinsichtlich der Beurteilung des Einflusses der Resveratrolgabe auf den mitochondrialen Stoffwechsel, erfolgte eine Quantifizierung der mRNA der an diesen Prozessen maßgeblich beteiligten Regulatoren Sirt1, Pgc1α und Pdk4.

Für die RNA-Extraktion wurde jeweils Muskelgewebe von zwei Mäusen einer Gruppe gepoolt, so dass fünf Pools pro Gruppe entstanden, die insgesamt die Informationen von zehn Tieren trugen. Dass die Integrität des Transkriptomts nach der Extraktion immer noch gegeben war, zeigte die Intaktheit der 28 S und 18 S ribosomalen RNA in der Agarosegelaufrennung (Abbildung 29 im Anhang). Optimale Bedingungen für die quantifizierende Amplifikation wurden mit Primerkonzentrationen von 300 nM (Abbildung 30A im Anhang) und mit Primerpaaren, die relativ genau eine Verdopplung der RNA pro Zyklus ermöglichen (Abbildung 30B im Anhang), erreicht.



**Abbildung 10.** Relative mRNA-Expression von *sirt1*, *pgc1α* und *pdk4* im Mausskelettmuskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den  $M$ , die Fehlerbalken den  $SEM$  von jeweils fünf Pools zu je zwei Mäusen pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, hoch signifikant ( $p < 0,001$ ): \*\*\*.

In Abbildung 10 ist die relative mRNA-Expression, d.h. die auf die *aktin*-Menge normalisierte, mit den Primereffizienzen verrechnete Tabelle 4 im Anhang) RNA-Menge, von *sirt1*, *pgc1α* und *pdk4* dargestellt. Dabei repräsentieren die Expressionswerte der Kontrolldiät 100%. Es ergab sich eine signifikant um das 1,8-Fach erniedrigte Expression von *sirt1* in Mäusen der F+Rsv-Ernährung verglichen mit der Kontrolldiät, aber keine Unterschiede in der relativen mRNA Expression von K,

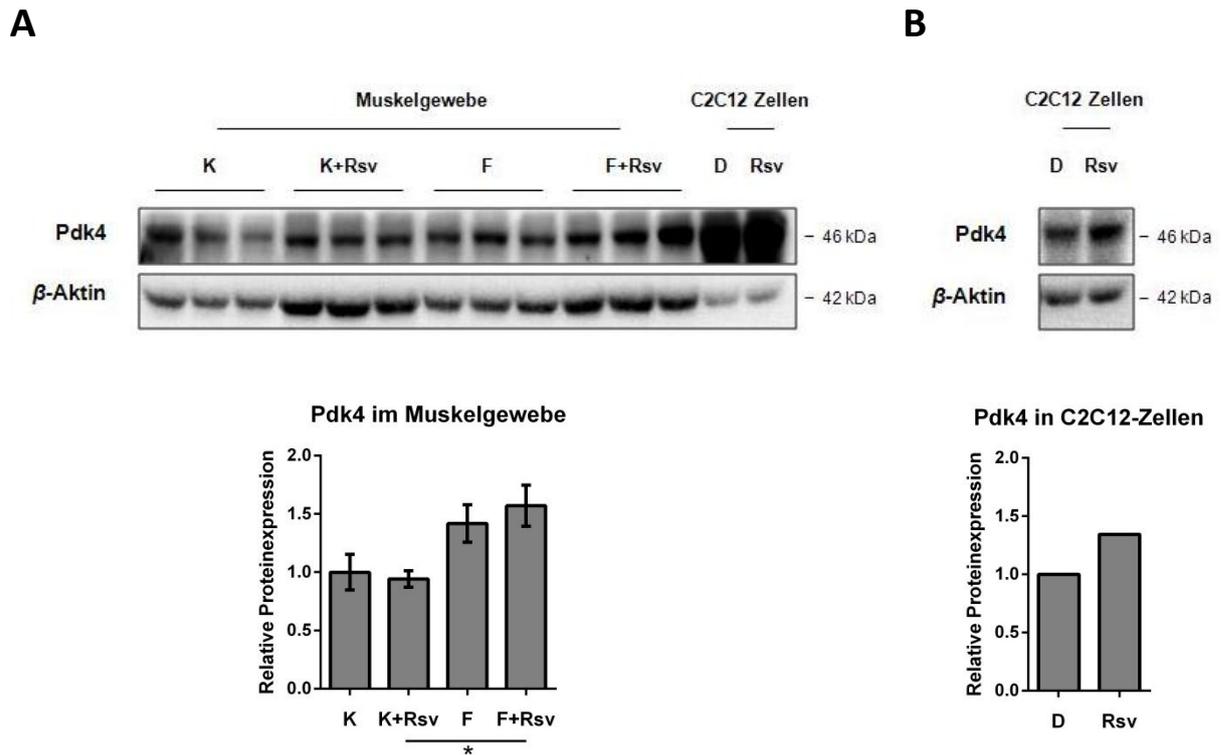
K+Rsv und F. Die *pgc1 $\alpha$* -Menge wurde weder durch eine hochkalorische Ernährungsweise noch durch die Gabe von Resveratrol beeinflusst. Der *pdk4*-Gehalt im Skelettmuskel variierte hingegen zwischen den verschiedenen Futterarten sehr. Zwar waren die Werte der Kontrolldiät zu denen der Kontrolldiät mit Resveratrolzusatz annähernd gleich, doch unterschieden sich diese beiden deutlich von der kalorienreichen Nahrung. Die RNA-Menge bei fettreicher Ernährung betrug lediglich das 0,5-Fache von K und K+Rsv und bei fettreicher Ernährung mit Resveratrolzusatz nur das 0,2-Fache. Zwischen diesen beiden ergab sich zudem ebenfalls ein sehr signifikanter Unterschied – der *pdk4*-Gehalt bei F+Rsv stellt das 0,4-Fache von F dar.

### 3.2.2 *Pdk4*

Die Proteinkinase Pdk4 ist aufgrund ihres Einflusses auf die E1 $\alpha$ -Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PdhE1 $\alpha$ ) ein zentraler Regulator im mitochondrialen Stoffwechsel des Skelettmuskels und möglicherweise Gegenstand der Wirkung von Resveratrol. Es wurden vergleichende Pdk4-Expressionsanalysen von Zellkulturmuskelzellen und Gewebemuskelzellen mittels Western Blot angestellt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen aufzudecken als auch einen Vergleich von *in vivo* und *in vitro* Effekten zu ermöglichen.

In Abbildung 11A ist die Menge an Pdk4 und als Ladekontrolle der  $\beta$ -Aktin-Gehalt im Skelettmuskel und in C2C12-Zellen gezeigt. Es wurden jeweils drei Replikate jeder Gruppe des Muskelgewebes sowie je eine Probe der behandelten und eine der unbehandelten Zellen aufgetragen. Dabei entsprach jedes Replikat des Muskels einem Pool an Gewebe von drei bzw. vier Mäusen, so dass für jede Behandlungsgruppe insgesamt zehn biologische Replikate untersucht wurden. Jede Probe der Zellkulturzellen setzte sich aus drei Replikaten zusammen. Für die Resveratrolbehandlung (Rsv) wurden 50  $\mu$ M des Stoffes für 16 Stunden zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die lediglich mit der gleichen Menge DMSO, wie sie in den behandelten Proben verwendet wurde, versetzt waren (D). Die im Western Blot detektierten Banden wurden quantifiziert und sind im Säulendiagramm als relative Proteinmenge, d.h. als die auf Aktin bezogene Expression, dargestellt, wobei die relative Expression der Kontrolldiät gleich eins gesetzt wurde.

Wie Abbildung 11A verdeutlicht, sind keine Unterschiede in der Proteinmenge innerhalb der Diäten mit und ohne Resveratrol zu verzeichnen, allerdings kristallisiert sich eine Differenz zwischen der Standardnahrung und der kalorienreichen Ernährung heraus. Signifikant ist jedoch nur die um das 1,7-Fach erhöhte Pdk4-Expression von F+Rsv im Vergleich zu K+Rsv. Die Pdk4-Menge der C2C12-Zellen überstieg die des Muskels bei weitem, so dass in Abbildung 11B eine kürzere Belichtungszeit des Blots herangezogen wurde, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Bei diesem betrug die Pdk4-Expression unter Rsv-Behandlung das 1,3-Fache der unbehandelten Probe.



**Abbildung 11. A** Relative Pdk4-Expression im Mausskelettmuskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den *M*, die Fehlerbalken den *SEM* von jeweils drei Pools zu je drei oder vier Mäusen, insgesamt zehn pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). **B** Relative Pdk4-Expression in resveratrolbehandelten (Rsv) und unbehandelten (D) C2C12-Zellen. Gezeigt sind die Expressionswerte jeweils eines Pools bestehend aus drei Replikaten. Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*.

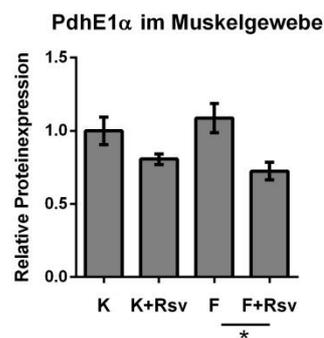
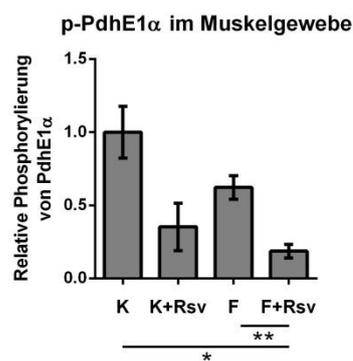
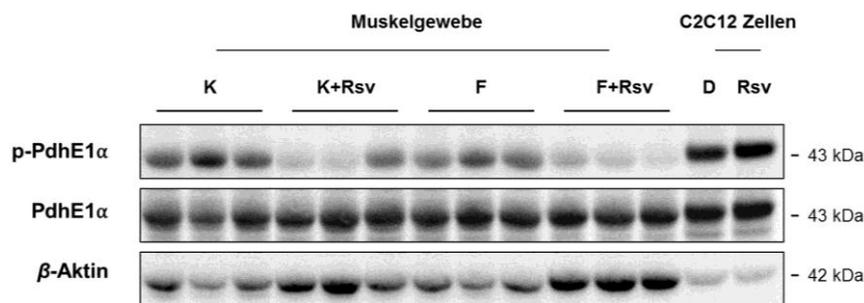
### 3.2.3 Phosphorylierung von PdhE1 $\alpha$

Die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von PdhE1 $\alpha$  sollte Aufschluss über dessen Aktivität und damit über das Maß an der aus Glucose gewonnenen Energie geben. Dabei ist der dephosphorylierte Zustand des Pdc $\alpha$  der aktive, der die irreversible oxidative Phosphorylierung von Pyruvat katalysiert und somit die Glykolyse mit dem Citratzyklus verbindet. Die Phosphorylierung am Serinrest 293 der E1 $\alpha$ -Untereinheit wird über Pdk4 vermittelt und ist maßgeblich an der Inaktivierung des gesamten Komplexes beteiligt.

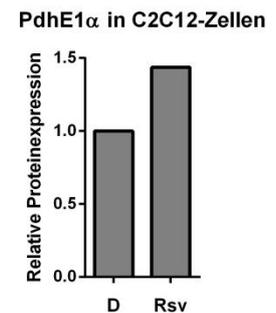
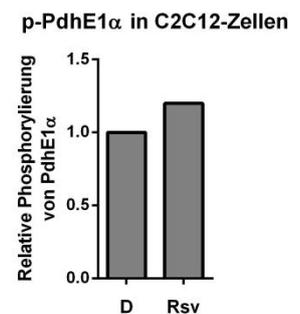
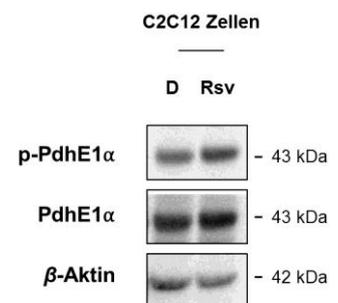
Unter Resveratrolgabe liegt das Enzym verstärkt in der dephosphorylierten Form vor (Abbildung 12A), in der es besonders aktiv ist und vermehrt die Umwandlung des Pyruvats vorantreibt. Der Phosphorylierungsgrad von PdhE1 $\alpha$  bei K+Rsv entspricht dem 0,4-Fachen dessen von K, doch ergab der t-Test keinen signifikanten Unterschied. Eine signifikante Differenz zeigt sich zwischen F und F+Rsv sowie K und F+Rsv. Die relative Phosphorylierung beträgt das 0,2- bzw. 0,3-Fache der genannten Diäten. Interessanterweise wird auch die Proteinexpression von PdhE1 $\alpha$  von Resveratrol beeinflusst. Die Proteinsynthese bzw. der Abbau werden in der Weise reguliert, dass sowohl tendenziell für K+Rsv als auch für F+Rsv insgesamt weniger PdhE1 $\alpha$  vorliegt. Die Expression beläuft sich für K+Rsv auf das 0,8-Fache von K und für F+Rsv auf das 0,7-Fache von F. Ein signifikanter

Unterschied unter Resveratrolgabe ergibt sich lediglich bei der fettreichen Diät. Da PdhE1 $\alpha$  in den Zellkulturzellen zu einem höheren Anteil als im Muskelgewebe vorliegt, zeigt Abbildung 12B denselben Blot einer geringeren Belichtungszeit, um eine quantitative Analyse zu ermöglichen. Anders als im Muskelgewebe verursacht die Resveratrolbehandlung in den C2C12-Zellen eine 1,4-Fach erhöhte Proteinexpression als auch eine 1,2-Fach gesteigerte Phosphorylierung von PdhE1 $\alpha$ .

**A**



**B**



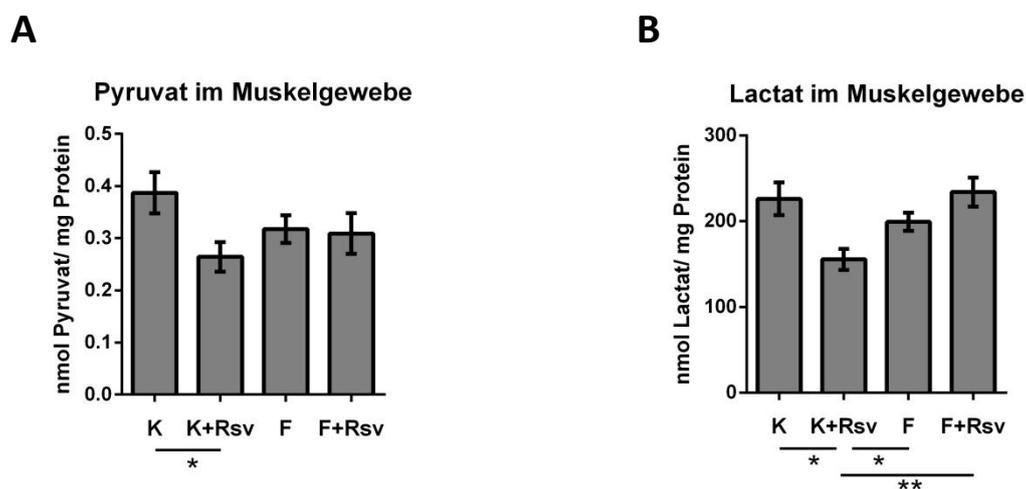
**Abbildung 12.** **A** Relative PdhE1 $\alpha$ -Phosphorylierung und Expression im Muskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den *M*, die Fehlerbalken den *SEM* von jeweils drei Pools zu je drei oder vier Mäusen, insgesamt zehn pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). **B** Relative PdhE1 $\alpha$ -Phosphorylierung und Expression in resveratrolbehandelten (Rsv) und unbehandelten (D) C2C12-Zellen. Gezeigt sind die Expressionswerte jeweils eines Pools bestehend aus drei Replikaten. Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*.

### 3.2.4 Pyruvat und Lactat

#### 3.2.4.1 Pyruvat und Lactat im Skelettmuskelgewebe

Ob die Veränderungen im Phosphorylierungsgrad von PdhE1 $\alpha$  unter Resveratroleinfluss mit der Pyruvatkonzentration innerhalb des Muskels korrelieren, sollten entsprechende Messungen klären. Zudem wurde der Lactatgehalt der Zellen, der mit dem Gehalt an Pyruvat eng verknüpft ist, bestimmt. Für die Quantifizierung im Skelettmuskelgewebe wurden insgesamt zehn Tiere pro Gruppe untersucht, von denen jeweils zwei in einem Pool zusammengefasst waren.

Abbildung 13A zeigt die Ergebnisse der Pyruvat-, Abbildung 13B die der Lactatmessung. Im Skelettmuskelgewebe wurden durchschnittlich 0,3 nmol Pyruvat und 0,2  $\mu$ mol Lactat pro mg Protein detektiert. Die gemessene Konzentration an Pyruvat unterscheidet sich signifikant zwischen der Mäusegruppe, die eine Kontrolldiät mit Resveratrol bekam und der, die die Kontrolldiät ohne Resveratrol zu sich nahm. Während die Letztere pro mg Protein 0,39 nmol Pyruvat vorwies, senkt die resveratrolhaltige Ernährung die Menge auf 0,26 nmol pro mg Gesamtprotein, was dem 0,7-Fachem der Kontrolle entspricht. Zwischen den restlichen Gruppen ergaben sich bezogen auf die Pyruvatmenge keine signifikanten Unterschiede. Die in Abbildung 13B dargestellte Lactatkonzentration im Skelettmuskelgewebe der Kontrolldiät mit Resveratrolzusatz weist Differenzen zu allen anderen Ernährungsgruppen auf, während diese sich untereinander in ihrem Lactatgehalt nicht unterscheiden. Die Unterschiede belaufen sich auf 0,04 und 0,07  $\mu$ mol Lactat pro mg Protein zur fettreichen Diät und zur Kontrolldiät bzw. zur fettreichen Ernährung mit Resveratrolzusatz, das entspricht dem 0,7 und 0,8-Fachen dieser Diäten.

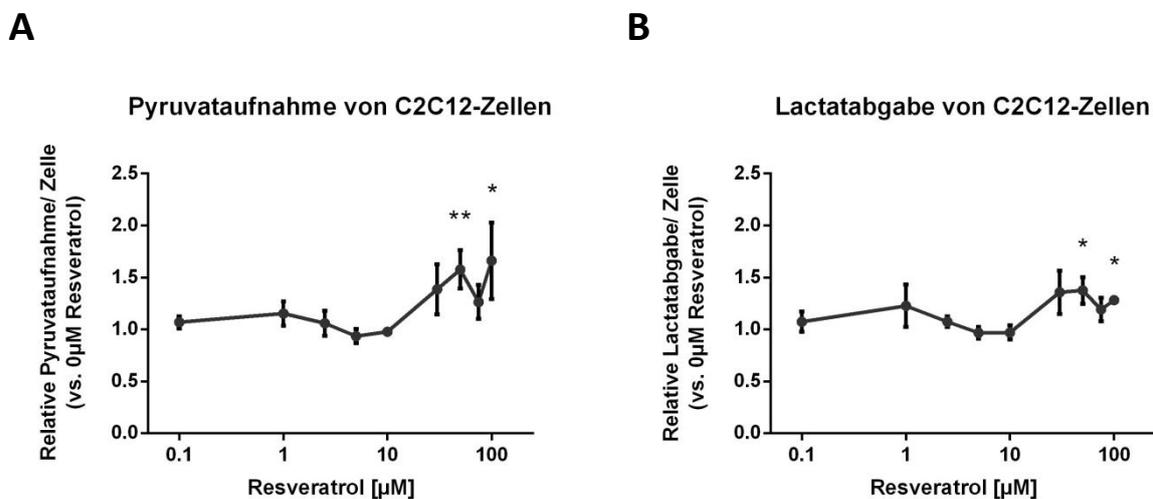


**Abbildung 13.** **A** Pyruvat- und **B** Lactatgehalt im Skelettmuskelgewebe von Mäusen, die eine Kontrolldiät (K), eine Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), eine fettreichen Diät (F) oder eine fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv) bekamen. Die Säulen repräsentieren den  $M$ , die Fehlerbalken den  $SEM$  von jeweils fünf Pools zu je zwei Mäusen, insgesamt zehn Tieren pro Gruppe. Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*.

3.2.4.2 Dosisabhängige Studie in C2C12-Zellen

Um auch in den C2C12-Zellen einen Eindruck davon zu gewinnen, wie Resveratrol die Mengen an Pyruvat und Lactat beeinflusst und um zu sehen wie sich diese unter verschiedenen Konzentrationen an Resveratrol verändern, wurden konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit 0,1 bis 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol für 16 Stunden inkubiert und anschließend die Menge an Pyruvat und Lactat im Medium detektiert. Dabei wird davon ausgegangen, dass die in den Zellen vorhandene Metabolitkonzentration mit der im Medium gemessenen in einer Art Gleichgewicht steht. Das bedeutet, es ist anzunehmen, dass eine erhöhte Pyruvataufnahme aus dem Medium erfolgt, wenn verstärkt Pyruvat in der Zelle verbraucht wird und dass umso mehr Lactat abgegeben wird, je mehr es in der Zelle produziert wird.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Metabolitquantifizierung unter verschiedenen Resveratrolkonzentrationen. Die von den Zellen aufgenommene Pyruvatmenge, wie sie in Abbildung 14A dargestellt ist, wurde über die Pyruvatabnahme im Medium berechnet. Pyruvat ist dem Medium bereits zugesetzt, um eine optimale Ernährung der Zellen zu gewährleisten. Wird Pyruvat von den Zellen aufgenommen, sinkt seine Konzentration im gleichen Maße im Medium und somit ist die Menge an aufgenommenem Pyruvat gleich der Differenz der Pyruvatmenge im Medium vor und nach der Inkubation mit den Zellen.



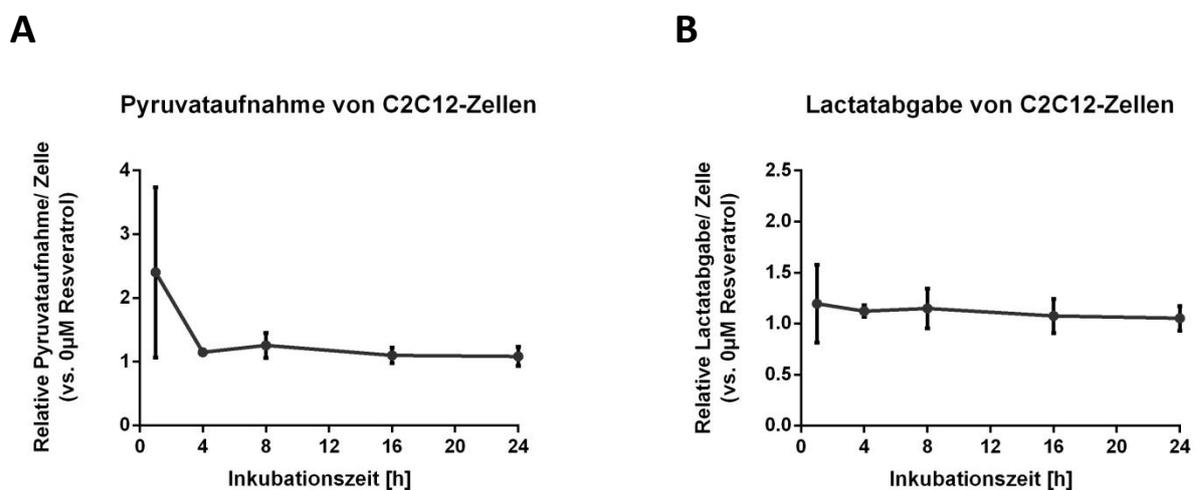
**Abbildung 14.** **A** Relative Pyruvataufnahme und **B** Lactatabgabe von C2C12-Zellen bei der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Resveratrol (0 bis 100  $\mu\text{M}$ ) für 16 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert  $M$ , die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (*Standard deviation*, *SD*) von jeweils drei biologischen Replikaten. Die p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, wobei als Referenz immer die unbehandelten Zellen dienen.

Abbildung 14A zeigt, dass sich bis 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol die aufgenommene Pyruvatmenge nicht verändert, ab 30  $\mu\text{M}$  hingegen steigt die relative Pyruvataufnahme pro Zelle tendenziell leicht an. Für 50 und 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol ergeben sich signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Zellen. Die Menge an aufgenommenem Pyruvat pro Zelle entspricht dem 1,6-Fachen (50  $\mu\text{M}$  Rsv) und dem 1,7-

Fachen (100  $\mu\text{M}$  Rsv) der unbehandelten Zellen. Die Lactatabgabe in Abbildung 14B ist gleich der gemessenen Lactatmenge im Medium. Auch hier zeigt sich ein tendenzieller Anstieg ab einer Behandlung der Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol, während niedrigere Konzentrationen keine Veränderungen in der Lactatkonzentration hervorrufen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied für 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol, der sich auf eine Differenz von 0,4 und 0,3 im Vergleich zur Kontrolle beläuft.

### 3.2.4.3 Zeitabhängige Studie in C2C12-Zellen

In der dosisabhängigen Studie an C2C12-Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Pyruvataufnahme wie auch Lactatabgabe unter Einfluss von 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol. Um zu überprüfen, nach welcher Inkubationszeit mit Resveratrol dieser gesteigerte Pyruvatumsatz auftritt, wurden zeitabhängige Messungen bis zu 24 Stunden durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die relative Menge an aufgenommenem Pyruvat bzw. abgegebenem Lactat pro Zelle nach den angegebenen Inkubationszeiten unter Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol im Vergleich zu unbehandelten Zellen.



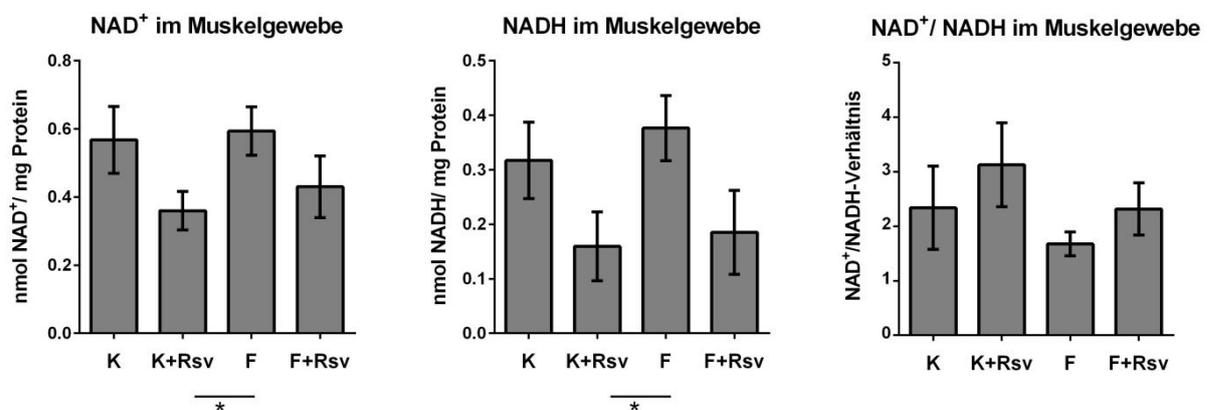
**Abbildung 15.** **A** Relative Pyruvataufnahme und **B** Lactatabgabe von C2C12-Zellen bei der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol für unterschiedlich lange Inkubationszeiten (0 bis 24 Stunden). Dargestellt ist der Mittelwert  $M$ , die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung  $SD$  von jeweils drei biologischen Replikaten. Die  $p$ -Werte des Zweistichproben- $t$ -Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, wobei als Referenz immer die unbehandelten Zellen dienen.

In Abbildung 15A sind die Ergebnisse für die zeitabhängige Pyruvataufnahme unter Resveratrolbehandlung relativ zu den unbehandelten Zellen gezeigt. Für keine der gewählten Inkubationszeiten ergab sich ein signifikanter Unterschied von den mit Resveratrol behandelten zu den unbehandelten Zellen. Es gibt jedoch eine Tendenz zu einer erhöhten Pyruvataufnahme der Zellen unter Resveratrolbehandlung, die bereits nach einer Stunde Inkubationszeit zu detektieren ist. Ähnliches zeigt sich für die in Abbildung 15B dargestellte Lactatabgabe. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen zu messen, doch ist tendenziell eine gesteigerte Abgabe von Lactat ins Medium bereits nach einer Stunde Inkubationszeit mit 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol auszumachen.

### 3.2.5 NAD

#### 3.2.5.1 NAD im Skelettmuskelgewebe

Die Konzentration der oxidierten ( $\text{NAD}^+$ ) wie auch reduzierten Form (NADH) von NAD variiert mit dem metabolischen Status der Zelle. Während  $\text{NAD}^+$  in der  $\beta$ -Oxidation, der Glykolyse und im Citratzyklus zu NADH reduziert wird, wird NADH in der oxidativen Phosphorylierung zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. So können diese Prozesse das Verhältnis von  $\text{NAD}^+$ /NADH beeinflussen, welches wiederum Auskunft über den Energiezustand der Zelle gibt.  $\text{NAD}^+$  fungiert weiterhin als Koenzym, welches für die Aktivität von Sirt1 entscheidend ist und somit Einfluss auf die Regulation des Stoffwechsels hat. Die Quantifizierung von  $\text{NAD}^+$  und NADH bzw. deren Verhältnis zueinander soll Aufschluss über den Energiezustand der Skelettmuskelzellen wie auch über die Aktivität von Sirt1 unter den verschiedenen Fütterungsbedingungen der einzelnen Mäusegruppen geben.

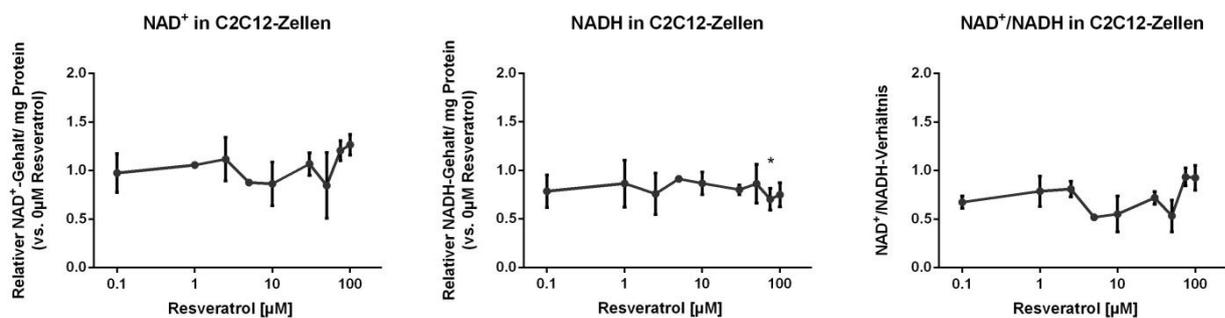


**Abbildung 16.** Dargestellt sind der  $\text{NAD}^+$ - und NADH-Gehalt sowie das Verhältnis der beiden NAD-Formen zueinander im Skelettmuskelgewebe von Mäusen, die eine Kontrolldiät (K), eine Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), eine fettreiche Diät (F) oder eine fettreiche Diät mit Resveratrol (F+Rsv) bekamen. Die Säulen repräsentieren den  $M$ , die Fehlerbalken den  $SEM$  von jeweils fünf Pools zu je zwei Mäusen, insgesamt zehn Tieren pro Gruppe. Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der  $\text{NAD}^+$  und der NADH-Messung wie auch das Verhältnis von  $\text{NAD}^+$  und NADH zueinander. Die Gabe von Resveratrol beeinflusst sowohl die Menge an  $\text{NAD}^+$  als auch an NADH insofern, als dass es sie tendenziell zu erniedrigen scheint. Allerdings konnte nur für die Kontrolldiät mit Resveratrolzusatz im Vergleich zur fettreichen Ernährungsweise ein signifikanter Unterschied ausgemacht werden. Im Skelettmuskel der K+Rsv-Gruppe ist 0,6-mal so viel  $\text{NAD}^+$  und 0,4-mal so viel NADH vorhanden wie in der Gruppe, der eine kalorienreiche Diät verabreicht wurde. Das Verhältnis von  $\text{NAD}^+$  zu NADH wird durch Resveratrolgabe nicht signifikant beeinflusst, doch zeigt sich eine Tendenz zu einem erhöhten  $\text{NAD}^+$ /NADH-Verhältnis unter Resveratrolgabe sowohl für die Kontroll- als auch für die fettreiche Diät.

### 3.2.5.2 Dosisabhängige Studie in C2C12-Zellen

In einer dosisabhängigen Studie sollte gezeigt werden, wie sich die Mengen an  $\text{NAD}^+$  und NADH unter verschiedenen Konzentrationen an Resveratrol in C2C12-Zellen verhalten und wie sich ihr Verhältnis zueinander verändert. Die Zellen wurden mit 0,1 bis 100  $\mu\text{M}$  Resveratrol behandelt und ihr NAD-Gehalt nach 16 Stunden Inkubationszeit detektiert. In Abbildung 17 sind die gemessenen relativen  $\text{NAD}^+$  und NADH-Mengen sowie deren Verhältnis zueinander dargestellt. Bezugspunkt ist dabei immer der gemessene Wert der DMSO-Kontrolle. Für den  $\text{NAD}^+$ -Gehalt der Zellen unter Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an Resveratrol ergab sich für keine Dosis ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Zellen. Lediglich eine Tendenz zu einer erhöhten  $\text{NAD}^+$ -Menge ab 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol ist zu erkennen. Der NADH-Gehalt der Zellen liegt bereits ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Resveratrol unter dem der unbehandelten Zellen, eine signifikante Differenz zu diesen zeigt jedoch nur die Behandlung mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol. Berechnet man das  $\text{NAD}^+$ /NADH-Verhältnis steigt dieses zwar ab einer Resveratrolkonzentration von 75  $\mu\text{M}$  an, doch ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten Proben.

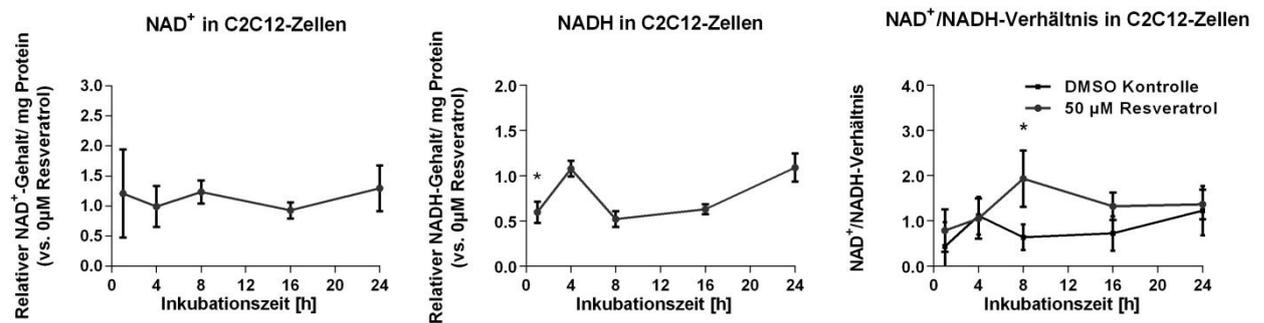


**Abbildung 17.** Gezeigt sind der  $\text{NAD}^+$ - und NADH-Gehalt sowie das Verhältnis der beiden NAD-Formen zueinander in C2C12-Zellen, die für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 100  $\mu\text{M}$ ) an Resveratrol behandelt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert  $M$ , die Fehlerbalken repräsentieren den  $SEM$  von jeweils drei biologischen Replikaten. Die  $p$ -Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, wobei als Referenz immer die unbehandelten Zellen dienen.

### 3.2.5.3 Zeitabhängige Studie in C2C12-Zellen

Ob eine zeitabhängige Regulierung des NAD-Gehalts bei der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol stattfindet, sollten Studien zeigen, die die zeitliche Entwicklung der NAD-Menge nach Zugabe von Resveratrol zu den Zellen über 24 Stunden dokumentieren. Abbildung 18 stellt die gewonnenen Ergebnisse für den  $\text{NAD}^+$  und den NADH-Gehalt wie auch deren Verhältnis dar. Der  $\text{NAD}^+$ -Gehalt ist tendenziell etwas erhöht im Vergleich zur DMSO Kontrolle, doch ergibt sich zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Resveratrol und den unbehandelten Zellen. Die Messung der in den Zellen vorhandenen NADH-Menge ergab eine tendenziell leichte Erniedrigung für die Messpunkte nach einer, acht und 16 Stunden unter Resveratrolbehandlung, doch lediglich nach einer Stunde Inkubationszeit zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Proben, der sich auf das 0,4-Fache der Kontrolle beläuft. Bildet man das  $\text{NAD}^+$ /NADH-Verhältnis scheint Resveratrol dieses zu erhöhen, wobei sich eine signifikante Differenz nur nach acht Stunden zeigt. An

diesem Punkt entspricht das Verhältnis der beiden Metabolite unter Resveratrolbehandlung dem 3-Fachen der unbehandelten Zellen.

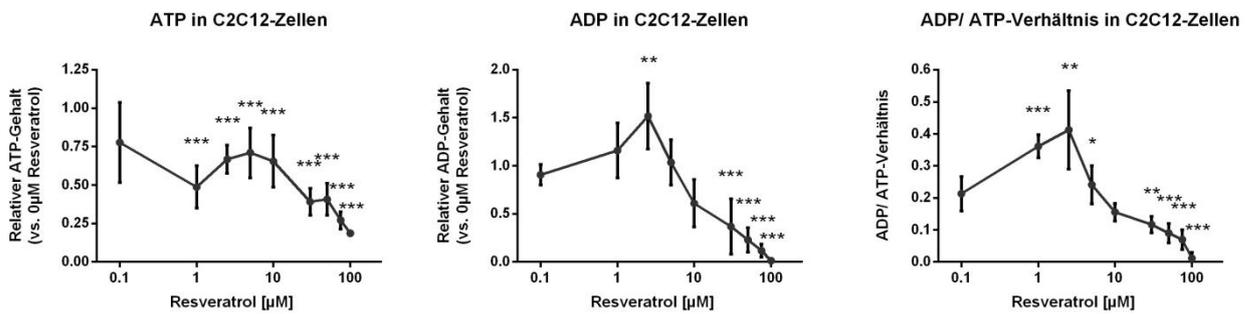


**Abbildung 18.** Gezeigt sind der NAD<sup>+</sup>- und NADH-Gehalt sowie das Verhältnis der beiden NAD-Formen zueinander in C2C12-Zellen, die für unterschiedliche Inkubationszeiten (0 bis 24 Stunden) mit 50 µM Resveratrol oder nur mit DMSO behandelt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert  $\bar{M}$ , die Fehlerbalken repräsentieren die  $SD$  von jeweils drei biologischen Replikaten. Die p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, wobei als Referenz immer die unbehandelten Zellen dienen.

### 3.2.6 ADP und ATP

#### 3.2.6.1 Dosisabhängige Studie in C2C12-Zellen

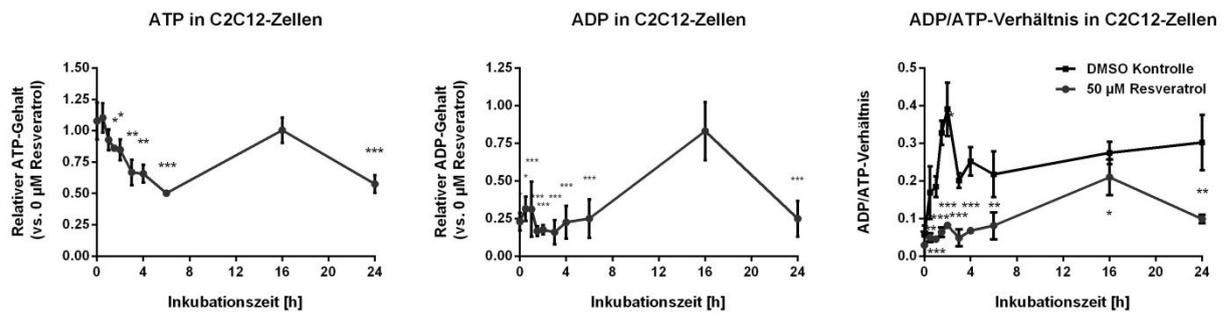
Um herauszufinden inwieweit verschiedene Konzentrationen an Resveratrol den ADP- und ATP-Gehalt wie auch deren Verhältnis zueinander verändern und damit auf die Aktivität von AMPK einwirken, wurden entsprechende dosisabhängige Studien an C2C12-Zellen durchgeführt. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der ATP und ADP-Messung dargestellt als relativer Gehalt zu dem der unbehandelten Zellen. Analysiert wurden Resveratrolkonzentrationen von 0,1 bis 100 µM, die für 16 Stunden inkubiert wurden. Die ATP-Menge in den Zellen sinkt bereits signifikant bei Behandlung mit 1 µM Resveratrol und fällt bis auf das 0,2-Fache der Kontrollbehandlung bei der Inkubation mit 100 µM Resveratrol ab. Der ADP-Gehalt wird hingegen in der Weise beeinflusst, dass er bis zu einer Resveratrolkonzentration von 2,5 µM um das 0,5-Fache ansteigt und anschließend bis auf das 0,02-Fache der Kontrollbehandlung bei Inkubation mit 100 µM abfällt. Die Kalkulation des ADP/ATP-Verhältnisses ergibt ein ähnliches Bild; es steigt bis zu 2,5 µM auf das 2,4-Fache an und fällt dann bis auf das 0,1-Fache der Kontrollbehandlung bei Inkubation mit 100 µM ab.



**Abbildung 19.** Gezeigt sind der ATP- und ADP-Gehalt sowie das Verhältnis der beiden Metabolite zueinander in C2C12-Zellen, die für 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 bis 100 µM) an Resveratrol behandelt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert  $M$ , die Fehlerbalken repräsentieren die  $SD$  von jeweils fünf biologischen Replikaten. Die  $p$ -Werte des Zweistichproben- $t$ -Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, hoch signifikant ( $p < 0,001$ ): \*\*\*, wobei als Referenz immer die unbehandelten Zellen dienten.

### 3.2.6.2 Zeitabhängige Studie in C2C12-Zellen

Eine zeitabhängige Studie in C2C12-Zellen sollte zeigen, wie sich die ATP- bzw. ADP-Menge in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit 50 µM Resveratrol verändert. Es wurden Inkubationszeiten bis zu 24 Stunden untersucht. In Abbildung 20 ist der Gehalt der Energieäquivalente relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt sowie das Verhältnis der beiden Adenosinphosphate zueinander für die resveratrolbehandelten Proben wie auch zum Vergleich für die Kontrolle. Der ATP-Gehalt in den Zellen nimmt bei Behandlung mit 50 µM Resveratrol mit der Zeit stetig ab, lediglich für 16 Stunden Inkubationszeit zeigt sich wieder ein Anstieg auf nahezu den Gehalt zu Beginn der Behandlung. Ein signifikanter Unterschied in der ATP-Menge im Vergleich zur DMSO Kontrolle ergibt sich ab 1,5 Stunden Inkubationszeit mit Ausnahme von 16 Stunden. Dabei sinkt der Metabolit-Gehalt nach sechs bzw. 24 Stunden bis auf die Hälfte der Referenz ab. Ähnlich verhält sich die ADP-Menge in den Resveratrol-behandelten Zellen, wobei sofort mit der Behandlung das ADP in den Zellen verbraucht bzw. abgebaut wird und auf ein Viertel dessen der unbehandelten Zellen fällt. Aber auch hier ist ein deutlicher Anstieg auf dreiviertel der Vergleichsmenge nach 16 Behandlungstunden zu verzeichnen. Somit ergibt sich für alle Inkubationszeiten mit einer Ausnahme eine signifikante Differenz zu den unbehandelten Proben. Das dargestellte ADP-zu-ATP-Verhältnis vermittelt einen Eindruck über den Energiestatus der Zelle zu den entsprechenden Inkubationszeiten. In Abbildung 20 ist neben dem Verhältnis der Adenosinphosphate unter Behandlung mit Resveratrol zum Vergleich auch das der Kontrollzellen aufgetragen. Es wird deutlich, dass diese auf den Mediumswechsel mit einem deutlichen Anstieg von ADP gegenüber ATP reagieren, der nach zwei Stunden wieder abfällt. Für die mit Resveratrol behandelten Zellen zeigt sich hingegen eine langsame Steigerung des Verhältnisses bis zu 16 Stunden. Bereits nach einer halben Stunde ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Zellen, die auch bis zum letzten Messpunkt nach 24 Stunden anhalten.



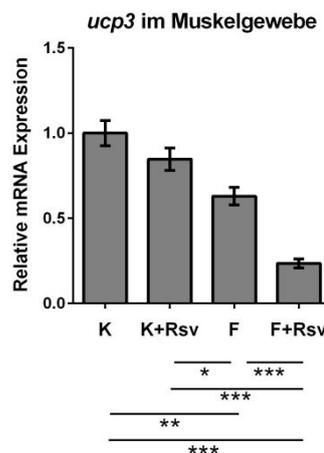
**Abbildung 20.** Gezeigt sind der ATP- und ADP-Gehalt sowie das Verhältnis der beiden Metabolite zueinander in C2C12-Zellen, die für unterschiedliche Inkubationszeiten (0 bis 24 Stunden) mit 50 µM Resveratrol behandelt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert  $M$ , die Fehlerbalken repräsentieren die SD von jeweils fünf Replikaten. Die p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, hoch signifikant ( $p < 0,001$ ): \*\*\*, wobei als Referenz immer die unbehandelten Zellen dienten.

### 3.3 ANTIOXIDATIVE WIRKUNG VON RESVERATROL

#### 3.3.1 *Ucp3*

Das hauptsächlich in Skelettmuskelzellen exprimierte *Ucp3* entkoppelt die Atmungskette von der ATP-Synthese indem es den Protonengradienten über der Mitochondrienmembran durch den Wiedereintritt der Protonen in die mitochondriale Matrix aufhebt. Dieser Mechanismus hilft, die Entstehung von ROS zu vermeiden, die beispielsweise durch eine erhöhte Fettsäureoxidation auftreten oder in der Oxidativen Phosphorylierung produziert werden. Da Resveratrol eben diese Prozesse anzukurbeln scheint [66, 67, 110], könnte eine positive Regulation der *Ucp3*-Expression helfen, oxidativen Stress zu minimieren. Ob die Gabe von 100 mg Resveratrol pro kg Nahrungsmenge bzw. die Behandlung von C2C12-Zellen mit 50 µM Resveratrol für 16 Stunden die *Ucp3*-Expression fördern kann, sollten entsprechende Studien zeigen.

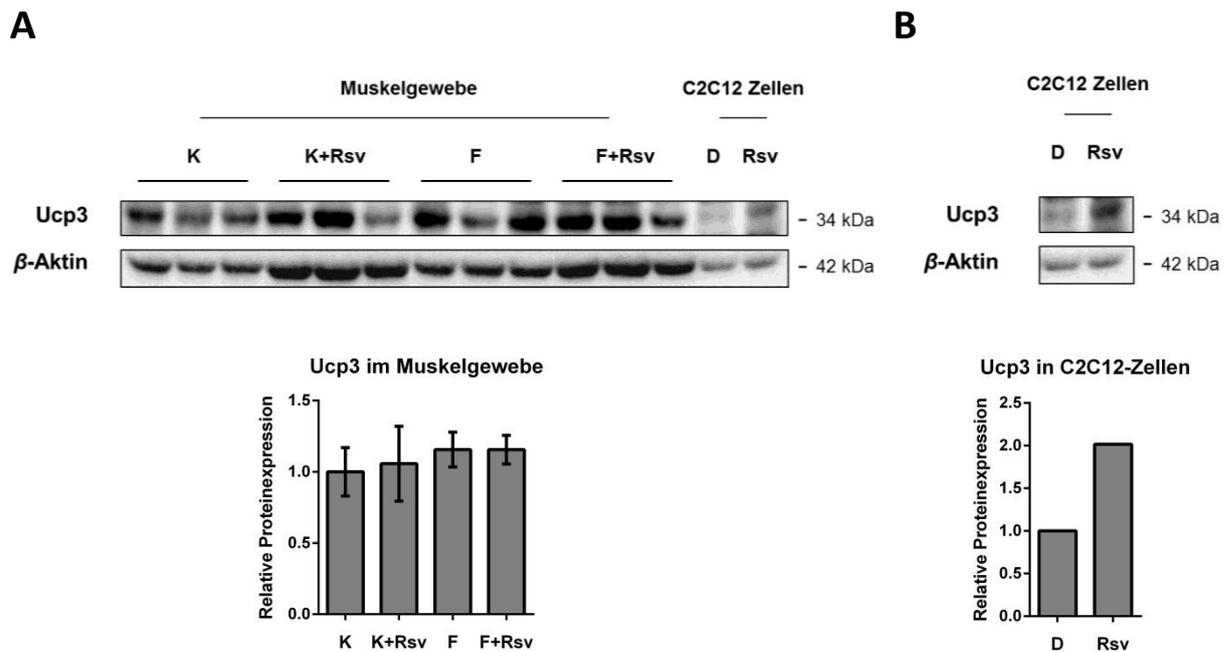
In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe wurde bereits herausgestellt, dass Resveratrol unter den genannten Bedingungen die relative *ucp3*-Menge in C2C12-Zellen um das 8-Fache erhöht (unveröffentlichte Daten der AG). Ob die Substanz ein ähnliches Expressionsverhalten im Skelettmuskel auslösen kann, sollte eine qPCR-Analyse klären.



**Abbildung 21.** Relative *ucp3*-Expression im Mausskelettmuskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den *M*, die Fehlerbalken den *SEM* von jeweils fünf Pools zu je zwei Mäusen pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, hoch signifikant ( $p < 0,001$ ): \*\*\*.

Abbildung 21 zeigt die gewonnenen Ergebnisse für die unterschiedlichen Mäusegruppen. Während zwischen der Standarddiät (K) und der Standarddiät mit Resveratrolzusatz (K+Rsv) keine Differenz zu detektieren war, unterscheiden sich die fettreiche Diät (F) und die fettreiche Diät mit Resveratrolzusatz (F+Rsv) signifikant von den Kontrolldiäten. Beide weisen im Vergleich eine geringe Menge an *ucp3* im Skelettmuskelgewebe auf, die sich auf das 0,6- bzw. 0,7- (F) und das 0,2- bzw. 0,3-Fache (F+Rsv) der K- bzw. K+Rsv-Ernährung belaufen. Außerdem verringert die Resveratrolaufnahme die *ucp3*-Menge deutlich in den Mäusen, die eine kalorienreiche Kost zu sich nahmen. Die *ucp3*-Expression der mit Resveratrol gefütterten Tiere beläuft sich auf das 0,4-Fache derer, die eine fettreiche Nahrung ohne Zusatz zu sich nahmen.

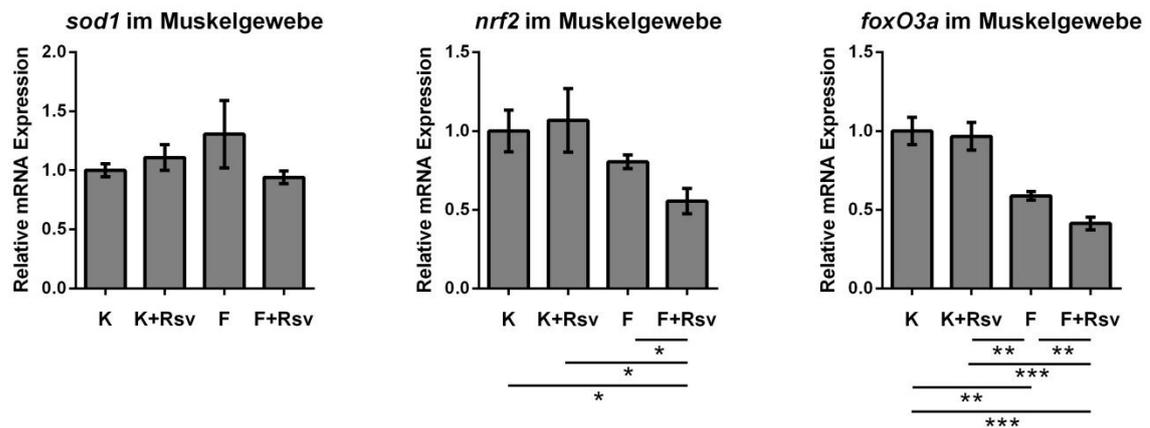
Die in Abbildung 22A abgebildete Ucp3-Detektion im Western Blot und die anschließende quantitative Analyse ergaben zwischen den verschiedenen Futtersorten mit und ohne Resveratrol keinen sichtbaren Unterschied. Die Resveratrolbehandlung der Zellen erzielte eine doppelt so hohe Ucp3-Menge wie die Kontrollbehandlung, dargestellt in Abbildung 22B.



**Abbildung 22. A** Relative Ucp3-Proteinexpression im Muskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den *M*, die Fehlerbalken den *SEM* von jeweils drei Pools zu je drei oder vier Mäusen, insgesamt zehn pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). **B** Relative Ucp3-Expression in resveratrolbehandelten (Rsv) und unbehandelten (D) C2C12-Zellen. Gezeigt sind die Expressionswerte jeweils eines Pools bestehend aus drei Replikaten. Der Zweistichproben-t-Test ergab keine signifikanten Veränderungen.

### 3.3.2 *sod1*, *nrf2* und *foxO3a*

Ob Resveratrol andere für den Schutz vor oxidativem Stress verantwortliche Enzyme zu induzieren vermag, wurde in einer mRNA-Expressionsanalyse von *superoxide dismutase 1* (*Sod1*), *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (*Nrf2*) und *Forkhead box O3a* (*FoxO3a*) im Skelettmuskelgewebe festgestellt. In C2C12-Zellen zeigten Microarrayanalysen bereits, dass Resveratrol Glutathion-Stoffwechselprozesse wie auch die *sod1*-Expression positiv reguliert (unveröffentlichte Daten der AG). Abbildung 23 veranschaulicht die im Muskelgewebe vorhandene relative mRNA-Menge unter den unterschiedlichen Ernährungsweisen der Tiere. Für die Expression des für die Umwandlung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid verantwortlichen *sod1* ergaben sich keine detektierbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die *nrf2*-Menge wird durch Resveratrolgabe bei einer fettreichen Diät signifikant herunterreguliert. Der *Nrf2*-Signalweg ist einer der initialen zellulären Abwehrmechanismen gegen die zytotoxischen Effekte von oxidativem Stress [185-187]. *Nrf2* induziert als Transkriptionsfaktor die Expression antioxidativer Enzyme, die dann die vorhandenen reaktiven Spezies reduzieren. Andere Studien haben bereits eine gesteigerte *nrf2*-Expression unter Resveratrolgabe in Endothelzellen der Koronararterien und der Lunge wie auch in Leberzellen belegt [188-190]. Hier entspricht die vorhandene *nrf2*-Menge in mit Resveratrol gefütterten übergewichtigen Mäusen allerdings lediglich dem 0,6-Fachen derer, die eine Kontrolldiät bekamen und dem 0,7-Fachen der übergewichtigen Mäuse, die kein Resveratrol zu sich nahmen.



**Abbildung 23.** Relative mRNA-Expression von *sod1*, *nrf2* und *foxO3a* im Mausskelettmuskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den  $M$ , die Fehlerbalken den  $SEM$  von jeweils fünf Pools zu je zwei Mäusen pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, hoch signifikant ( $p < 0,001$ ): \*\*\*.

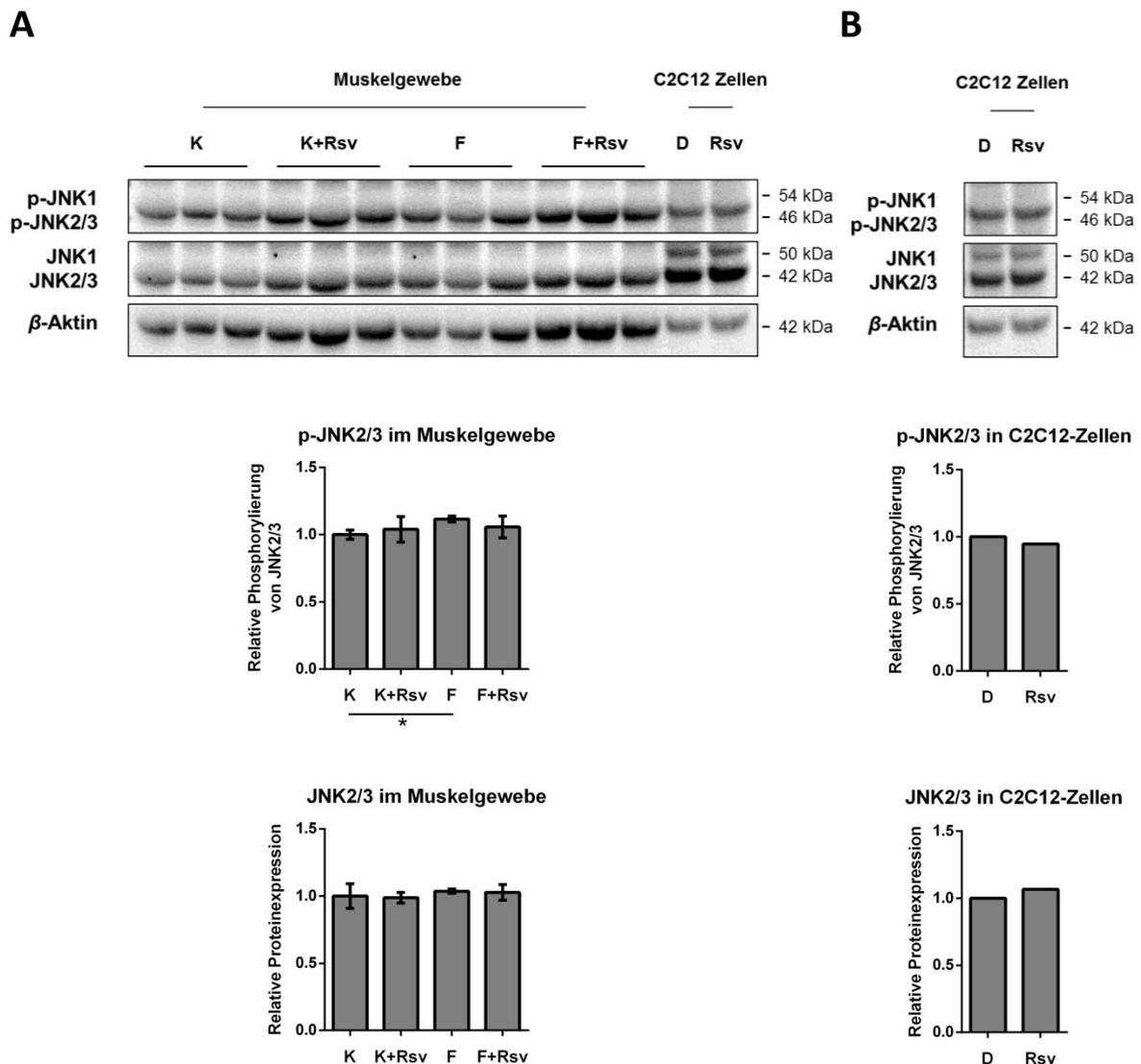
Auch in der *foxO3a*-Expression gab es Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. FoxO3a stellt ein weiteres Zielprotein von Sirt1 dar [127] und ist u.a. für die Induktion der Expression von antioxidativen Enzymen verantwortlich [191]. Seine Expression wird unter Nahrungsentzug erhöht [192] und trägt dazu bei die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegen oxidativen Stress zu steigern. Zusammen mit p53 agiert es zudem am Sirtuin-1-Promotor und reguliert die Sirt1-Transkription [193]. Seine mRNA-Expression fiel auf das 0,6-Fache der Kontrolldiäten bei einer hochkalorischen Ernährung der Mäuse. Noch stärker war dies bei der zusätzlichen Gabe von Resveratrol zu beobachten. In diesen Proben entsprach die *foxO3a*-Menge dem 0,4-Fachen der Kontrolldiäten. Des Weiteren zeigte sich ein Unterschied zwischen den fettreichen Ernährungsweisen. Unter F+Rsv wird nur 0,7-mal so viel *foxO3a* exprimiert wie bei F.

### 3.3.3 JNK-Phosphorylierung

c-Jun N-terminale Kinasen (*c-Jun N-terminal kinase*, JNK) werden durch Stressereignisse, wie beispielsweise das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies, aktiviert [194, 195]. Sie sind in Signalkaskaden eingebunden, an deren Ende die Regulation einer Vielzahl von wichtigen zellulären Funktionen wie Zellwachstum, Differenzierung, Überleben und Apoptose stehen [196, 197]. So können diese Proteinkinasen u.a. auch die Aktivität von Nrf2 [198, 199] und FoxO3a [200] regulieren. Da ihre Aktivität direkt mit ihrem Phosphorylierungsgrad korreliert soll eben dieser Aufschluss über das Vorhandensein von ROS als Stressfaktor unter Resveratroleinfluss geben.

Abbildung 24 zeigt zum einen den Phosphorylierungsstatus und zum anderen die Proteinmenge der drei JNK-Typen 1,2 und 3 im Western Blot. Die Ergebnisse für JNK2/3 wurden analysiert und in Säulendiagrammen wie unten abgebildet sowohl für das Muskelgewebe als auch für die C2C12-Zellen dargestellt. JNK1 konnte nicht untersucht werden, da es im Muskelgewebe nur recht schwach exprimiert zu werden scheint. Für den Phosphorylierungsgrad von JNK2/3 ergab sich ein kleiner aber

signifikanter Unterschied im Muskelgewebe zwischen der Gruppe der fettreichen Ernährung zur Kontrollgruppe, der einer 1,1-Fachen Erhöhung entspricht. Die relative JNK2/3-Expression variierte nicht zwischen den verschiedenen Diäten. Interessanterweise ist ein sehr viel höherer Prozentsatz der Proteinkinasen im Muskelgewebe phosphoryliert als es in den Zellkulturzellen der Fall ist. Bei diesen ist jedoch auch sehr viel mehr Gesamtprotein vorhanden. In Abbildung 24B zeigt sich nur ein minimaler bis kein Unterschied zwischen den für 16 Stunden mit 50  $\mu$ M Resveratrol behandelten und den unbehandelten Zellen für die Phosphorylierungs- und die Gesamtproteinmenge.



**Abbildung 24. A** Relative JNK-Phosphorylierung und Expression im Muskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den  $M$ , die Fehlerbalken den  $SEM$  von jeweils drei Pools zu je drei oder vier Mäusen, insgesamt zehn pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). **B** Relative JNK-Phosphorylierung und Expression in resveratrolbehandelten (Rsv) und unbehandelten (D) C2C12-Zellen. Gezeigt sind die Expressionswerte jeweils eines Pools bestehend aus drei Replikaten. Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*

### 3.4 CHIP-QPCR VON H1K26AC

Sirtuin-1 kann neben einer ganzen Reihe von Transkriptionsfaktoren und Koregulatoren auch ganz spezifisch N-terminale Lysinreste von Histonen deacetylieren und damit die Expression der an dem entsprechenden Locus codierten Gene herunterregulieren. Eines seiner Ziele ist das Lysin 26 des Linkerhistons H1, welches eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Heterochromatin einnimmt [170]. Der acetylierte Zustand von H1K26 ist dabei mit offenem Chromatin und einer verstärkten Genexpression assoziiert [167]. Da festgestellt wurde, dass Resveratrol die Expression wie auch die Aktivität von Sirt1 positiv regulieren kann, stellt sich die Frage, ob es gleichzeitig durch Sirt1 vermittelte Deacetylierungsvorgänge am Chromatin den Histon-Code umschreiben und so zur Regulation der Genexpression beitragen können. Tatsächlich zeigten vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe in einer Mausmyoblastenzelllinie eine doppelt so hohe Sirtuin-1-Proteinexpression unter Resveratrolbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die mit einer verstärkten globalen Deacetylierung von H1K26Ac einherging (unveröffentlichte Daten der AG). Durchgeführte ChIP-Analysen mit nachgeschalteter Sequenzierung (ChIP-Seq) von H1K26Ac ergaben anschließend ein differenzierteres Bild der H1-Acetylierungsstellen und gaben eine interessante Einsicht in deren Verteilung über das Genom. Bei diesen Untersuchungen wurde offen gelegt, dass Sirt1 unter Resveratroleinfluss an distinkten Stellen H1K26Ac nicht deacetyliert bzw. eine verstärkte Acetylierung des Histons stattfindet. Als besonders stark acetyliert fielen die Regionen der Exons von *Sirt1* selbst auf sowie Exons der Gene des *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (*Ppar $\gamma$* ) und des *Liver X receptor  $\alpha$*  (*Lxra*). Um diese Ergebnisse im Muskelgewebe zu validieren wurden ChIP-qPCR-Analysen von ausgewählten Exons der genannten Gene durchgeführt.

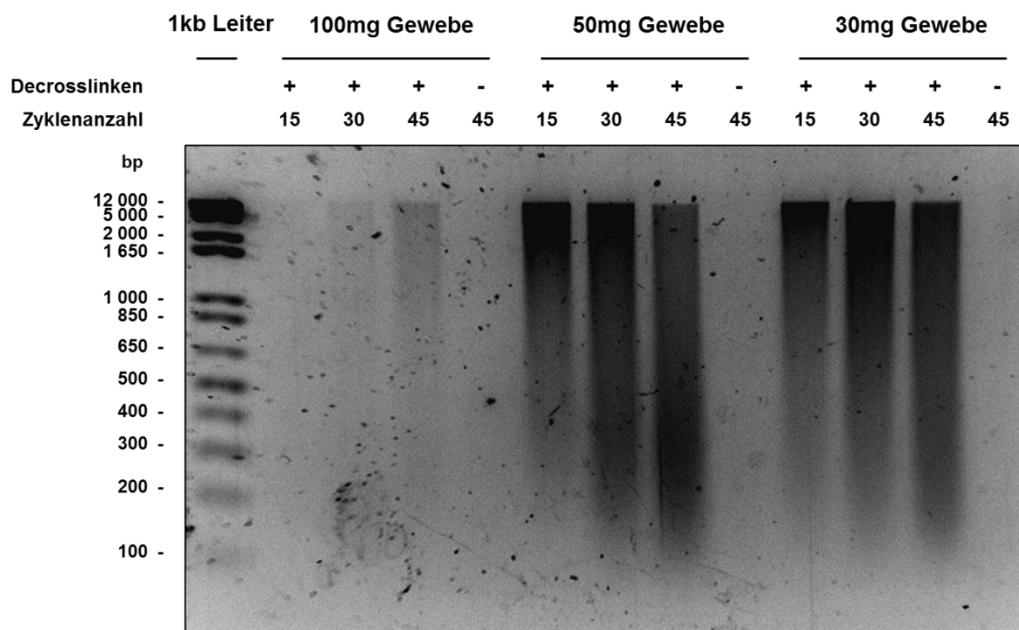
#### 3.4.1 Gewebeaufbereitung

Um eine bestmögliche Ausgangssituation für die anschließende ChIP zu gewährleisten, wurden als erstes die optimalen Parameter für die Gewebeaufbereitung wie Gewebemenge, Formaldehydfixierungszeit und Scherzyklenanzahl bestimmt. Die Gewebemenge sollte ausreichend Material für die anschließenden Analysen liefern, aber immer noch mittels Ultraschall scherbare sein. Die Fixierungszeit musste so gewählt werden, dass an der DNA sitzende Proteine an diese kovalent gebunden wurden, es aber noch möglich war, diese Bindung wieder aufzulösen. Bei der Bestimmung der optimalen Scherzyklenanzahl im Ultraschallbad ging es darum eine DNA-Fragmentlänge von rund 100 bis 500 Basenpaaren zu erreichen, um sicherzustellen, dass Acetylierungsstellen von Nachbarregionen der zu analysierenden Gene nicht zu einer Verzerrung der Ergebnisse führten. Dabei sollte die Fragmentlänge für die anschließende Amplifikation aber noch ausreichend groß sein.

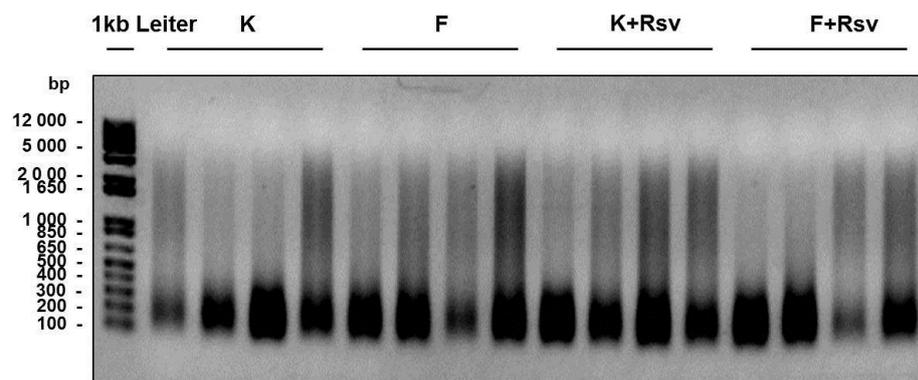
Abbildung 25A zeigt die Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Gewebemengen, die unterschiedlich lang geschert wurden im Agarosegel. Es wurden 100, 50 und 30 mg Skelettmuskelgewebe mit Formaldehyd für fünf Minuten fixiert, anschließend homogenisiert und für 15, 30 und 45 Zyklen im Ultraschallbad zerkleinert. Bei einem Teil der behandelten Proben wurde die

Bindung zwischen Proteinen und DNA aufgehoben und die gereinigten DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Es zeigt sich deutlich, dass bei einer großen Gewebemenge (100 mg) die Ultraschallbehandlung nicht ausreicht, um das Chromatin zu zerkleinern und folglich die großen Fragmente bei der Aufreinigung verloren gehen. Das Chromatin von 50 und 30 mg Gewebe kann hingegen mittels Ultraschall gut geschert werden. Dabei ergab der Einsatz von mehr Gewebe allerdings am Ende keine höhere DNA-Ausbeute, weshalb 30 mg Skelettmuskelgewebe der Mäuse für die ChIP-qPCR-Analyse verwendet wurden. In Abbildung 25A wird deutlich, dass mit einer erhöhten Scherzyklenanzahl die DNA-Fragmentlängen kleiner werden. Um eine Basenpaarlänge von 100 bis 500 zu erreichen, bedarf es mindestens 45, wenn nicht noch mehr Zyklen im Ultraschallbad. Zur Überprüfung der geeigneten Fixierungszeit, wurden bei einem Teil der Proben die Vernetzungen von Proteinen und DNA nicht rückgängig gemacht und diese nach deren Aufreinigung ebenfalls im Agarosegel aufgetrennt. Dass keine freien DNA-Fragmente in Abbildung 25A zu erkennen sind, zeigt, dass eine Fixierungszeit von fünf Minuten ausreicht, um Proteine kovalent an den DNA-Strang zu binden. Gleichzeitig ist diese Inkubationszeit aber auch kurz genug, als dass die Bindungen wieder rückgängig gemacht werden können.

**A**



**B**

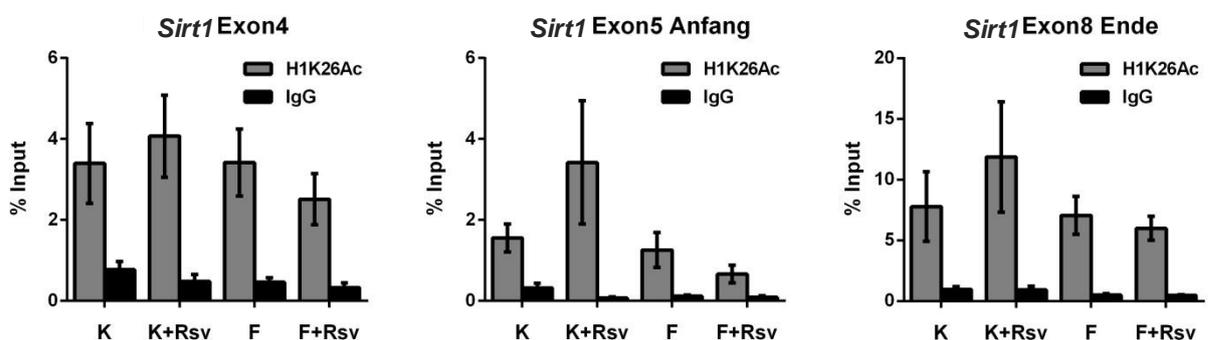


**Abbildung 25. A** Optimierung der Probenvorbereitung für die Chromatinimmunopräzipitation. Es wurde die Menge an Ausgangsgewebe wie auch die Scherzyklenanzahl variiert, um eine möglichst große Menge an 100 bis 500 bp langen DNA-Fragmenten zu erhalten. Des Weiteren wurde die Effektivität der Fixierung des Skelettmuskelgewebes mit Formaldehyd für fünf Minuten überprüft. Dargestellt ist die Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel nach dem Scheren, Decrosslinken (+) bzw. Nicht-Decrosslinken (-) und Aufreinigen der Proben. **B** Agarosegelauf trennung der DNA-Fragmente der vier unterschiedlichen Mäusegruppen, die eine Kontrolldiät (K), eine fettreiche Diät (F), eine Kontrolldiät mit Resveratrolzusatz (K+Rsv) und eine fettreichen Diät mit Resveratrolzusatz (F+Rsv) zu fressen bekamen. Gezeigt sind jeweils vier Pools bestehend aus zwei bis drei Mäusen, insgesamt neun Tieren pro Gruppe. Die Proben wurden für fünf Minuten fixiert, für 60 Zyklen im Ultraschallbad geschert, die DNA-Protein-Bindungen gelöst, die DNA-Fragmente aufgereinigt und im Gel aufgetrennt.

In Abbildung 25B sind die aufbereiteten Skelettmuskelp Proben der vier Mäusegruppen dargestellt, die für 60 Zyklen geschert wurden. Für die ChIP-qPCR-Analyse wurden pro Gruppe jeweils vier Pools von je zwei bis drei Tieren eingesetzt, so dass am Ende das Chromatin von neun Mäusen je Gruppe untersucht wurde.

### 3.4.2 H1K26Ac am *Sirt1*-Locus

Die Chromatinfragmente der fixierten und gescherten Gewebeproben wurden mittels H1K26Ac-Antikörper immunopräzipitiert. Anschließend wurde die DNA von den Proteinen gelöst, um eine Analyse der präzipitierten Genabschnitte mittels qPCR durchführen zu können. Es wurden ausgewählte Genabschnitte des *Sirt1*-Locus amplifiziert, um mögliche Unterschiede im Acetylierungsstatus von H1K26 zwischen den verschiedenen Gruppen an Mäusen zu detektieren. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der untersuchten Exonabschnitte von *Sirt1* dargestellt. Die Menge der präzipitierten DNA wurde dabei in Relation zu der vorhandenen Menge vor der Immunopräzipitation gesetzt. Als Negativkontrolle diente Immunglobulin G (IgG), welches keine DNA-bindenden Proteine erkennt und somit kein Chromatin präzipitieren sollte. Für alle drei untersuchten Genabschnitte der Exons 4, 5 und 8 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen an Mäusen. Es zeichnet sich jedoch eine leichte Tendenz der Anreicherung von H1K26Ac an allen genannten *Sirt1*-Regionen bei der K+Rsv-Gruppe ab. Der mittlere Prozentsatz an präzipitiertem Chromatin in Relation zur Input-DNA-Menge beläuft sich auf  $3,4\% \pm 0,6\%$  (Exon 4),  $1,7\% \pm 1,2\%$  (Anfangsregion von Exon 5) und  $8,2\% \pm 2,6\%$  (Endregion von Exon 8).

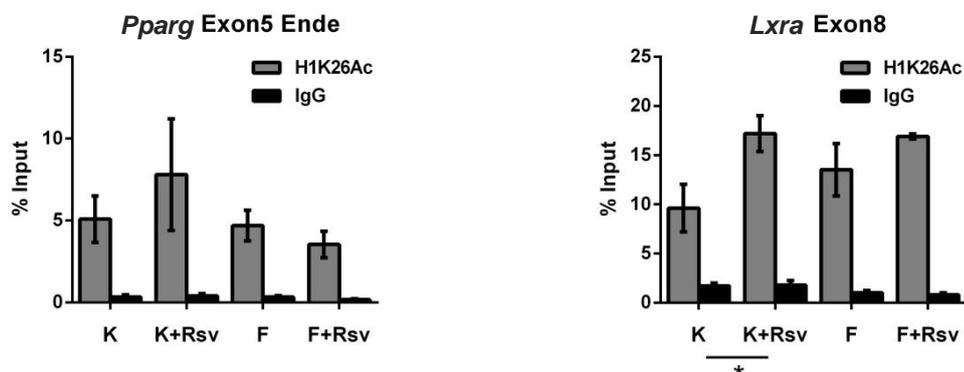


**Abbildung 26.** H1K26Ac immunpräzipitierte *Sirt1*-Genabschnitte (Exon 4, Exon 5 Anfangsregion und Exon 8 Endregion) dargestellt als prozentualer Anteil der vor der ChIP-Prozedur vorhandenen DNA-Menge. Die Säulen repräsentieren den *M*, die Fehlerbalken den *SEM* von jeweils vier Pools zu je zwei oder drei Mäusen, insgesamt neun pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). IgG diente als Negativkontrolle.

### 3.4.3 H1K26Ac am *Pparg*- und *Lxra*-Locus

Auch die Endregion von Exon 5 von *Pparg* und Exon 8 von *Lxra* wurden mittels qPCR analysiert, um mögliche Unterschiede im Acetylierungsstatus von H1K26 zwischen den verschiedenen Mäuse-Gruppen zu detektieren. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Untersuchungen gezeigt. Es ergibt sich wiederum nur ein tendenziell erhöhter Acetylierungsgrad der K+Rsv-Gruppe des Endbereiches vom *Pparg*-Exon 5, aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen der verschiedenen Diäten. Für Exon 8 des *Lxra*-Locus stellte sich hingegen eine signifikant, um das 1,8-Fach erhöhte Acetylierungsmenge von K+Rsv im Vergleich zu K heraus. Der mittlere Prozentsatz an präzipitiertem

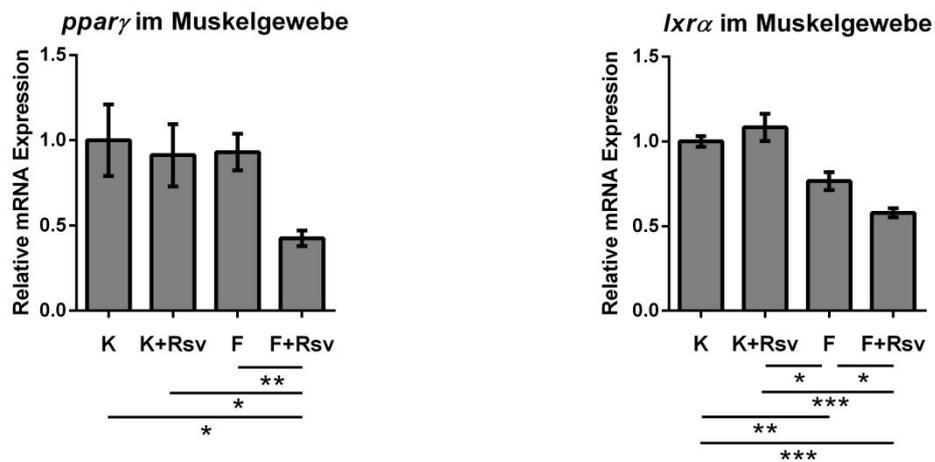
Chromatin in Relation zur Input-DNA-Menge beläuft sich auf  $5,3\% \pm 1,8\%$  (Endregion von *Pparg*-Exon 5) und  $14,3\% \pm 3,5\%$  (*Lxra*-Exon 8).



**Abbildung 27.** H1K26Ac immunopräzipitierte Genabschnitte von *Pparg* (Exon 5 Endregion) und *Lxra* (Exon 8) dargestellt als prozentualer Anteil der vor der ChIP-Prozedur vorhandenen DNA-Menge. Die Säulen repräsentieren den  $M$ , die Fehlerbalken den  $SEM$  von jeweils vier Pools zu je zwei oder drei Mäusen, insgesamt neun pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). Immunglobulin G (IgG) diente als Negativkontrolle. Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*.

### 3.4.4 *ppary* und *lxra*

Ob der Acetylierungsgrad von H1K26 an den einzelnen Exons Einfluss auf die mRNA-Expression im Skelettmuskelgewebe hat, sollten qPCR-Analysen der untersuchten Gene klären. In vorangegangenen Analysen der C2C12-Zellen zeigte sich bereits neben der verstärkten Acetylierung von H1K26 an den Exons von *Sirt1*, *Pparg* und *Lxra* eine gesteigerte Expression der Gene unter Resveratroleinfluss (unveröffentlichte Daten der AG). Interessanterweise sind *Pparg* und *Lxra* beide Zielproteine von *Sirt1*, werden von diesem deacetyliert und so in ihrer Aktivität reguliert. Beides sind Transkriptionsfaktoren, genauer nukleäre Rezeptoren, die ebenfalls an der Regulation des Fettsäure- und Glukosestoffwechsels beteiligt sind. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse von *ppary* und *lxra* im Skelettmuskelgewebe der vier Mäusegruppen. Die *sirt1*-Expression ist in Abbildung 10 dargestellt. Für die vorhandenen *ppary*-Mengen im Muskelgewebe unter Einfluss der verschiedenen Diäten ergab sich ein signifikanter Unterschied zu den Mäusen, die fettreiche Kost mit Resveratrolzusatz zu sich nahmen. In diesen entspricht die Expression dem 0,4-Fachen der Kontroll- und dem 0,5-Fachen der Kontrolldiät mit Resveratrol und der kalorienreichen Nahrung. Diese drei Diäten unterschieden sich in ihrer *ppary*-Expression jedoch nicht. Bei der Ermittlung der *lxra*-Mengen war eine Differenz zwischen den Kontrolldiäten zu den fettreichen Ernährungsweisen detektierbar. Die relative *lxra*-Expression der letzteren war dabei signifikant erniedrigt. Es ergab sich zudem eine signifikant erniedrigte Menge an mRNA der hochkalorischen Nahrung mit Resveratrolzusatz im Vergleich zu der Diät ohne Resveratarol. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen entsprechen einer Differenz von 0,2 (K – F), 0,4- (K – F+Rsv), 0,3 (K+Rsv – F), 0,5 (K+Rsv – F+Rsv) und 0,2 (F – F+Rsv).



**Abbildung 28.** Relative mRNA-Expression von *pparγ* und *Ixrα* im Mausskelettmuskelgewebe. Die Säulen repräsentieren den  $\bar{M}$ , die Fehlerbalken den  $SEM$  von jeweils fünf Pools zu je zwei Mäusen pro Gruppe der Kontrolldiät (K), der Kontrolldiät mit Resveratrol (K+Rsv), der fettreichen Diät (F) und der fettreichen Diät mit Resveratrol (F+Rsv). Die berechneten p-Werte des Zweistichproben-t-Tests sind wie folgt dargestellt: signifikant ( $p < 0,05$ ): \*, sehr signifikant ( $p < 0,01$ ): \*\*, hoch signifikant ( $p < 0,001$ ): \*\*\*.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 DISKUSSION DER ZELLKULTUREXPERIMENTE

#### 4.1.1 *Pdk4 und PdhE1 $\alpha$*

Bisherige in der Arbeitsgruppe durchgeführte Zellkulturstudien an C2C12-Zellen bestätigten die von Barger *et al.* und Lagouge *et al.* veröffentlichten Ergebnisse im Skelettmuskelgewebe hinsichtlich der Wirkung von Resveratrol auf die Expression der entscheidenden metabolischen Regulatoren Sirt1, Pgc1 $\alpha$  und Pdk4 [67, 110]. Unter Behandlung mit 50  $\mu$ M Resveratrol für 16 Stunden verdoppelte sich die Expression von Sirt1 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene und die Menge an *pdk4* stieg auf das 9-Fache der Kontrolle an (unveröffentlichte Daten der AG). Dies ist auch vergleichbar mit der Reaktion von C2C12-Zellen auf eine Reduktion der Glucosekonzentration im Zellkulturmedium [139]. Der *pgc1 $\alpha$* -Transkriptgehalt blieb unverändert (unveröffentlichte Daten der AG), was jedoch einer verstärkten Aktivität, bedingt durch die Regulation posttranslationaler Modifikationen, nicht widerspricht. Zusammengenommen lassen die soweit bekannten Daten vermuten, dass Resveratrol seine Wirkung über eine Umstellung des Stoffwechsels von Kohlenhydraten auf Fette als Energielieferant, ähnlich wie bei einer Reduktion der Nahrung, erzielt. Ob jedoch tatsächlich eine verstärkte Phosphorylierung von PdhE1 $\alpha$  durch Pdk4 und damit eine Inhibition der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA erfolgt, wurde bisher nicht untersucht. Eine quantitative Bestimmung von Pdk4 sowie des PdhE1 $\alpha$ -Phosphorylierungsgrads in C2C12-Zellen, die für 16 Stunden mit 50  $\mu$ M Resveratrol behandelt wurden, sollte aus diesem Grund Aufschluss über diesen Sachverhalt geben. Densitometrische Analysen der im Western Blot detektierten Proteine ergaben eine erhöhte Pdk4-Proteinexpression (Abbildung 11) und in Übereinstimmung damit eine gesteigerte Phosphorylierungsrate von PdhE1 $\alpha$  (Abbildung 12). Zudem lag unter Resveratrolbehandlung mehr PdhE1 $\alpha$  vor als bei der Kontrollbehandlung (Abbildung 12). Während die durch den erhöhten Pdk4-Gehalt hervorgerufene verstärkte Phosphorylierung von PdhE1 $\alpha$  und damit die Inaktivierung des Pdc $\alpha$  auf eine verminderte Umsetzung von Pyruvat schließen lässt, ist nicht klar, ob die erhöhte Expression der Pyruvatdehydrogenase diesem Effekt entgegenwirkt. Um herauszufinden inwieweit der Pyruvatumsatz durch den Wirkstoff beeinflusst wird, wurde die Pyruvatmenge der Muskelzellen in einem enzymbasierten Assay bestimmt.

#### 4.1.2 *Pyruvat und Lactat*

Ein detailliertes Bild der Wirkung sollte die Messung der Pyruvat- bzw. Lactat-Menge unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an Resveratrol und eine Quantifizierung von Pyruvat und Lactat unterschiedlicher Inkubationszeiten liefern. Da die in den Zellen vorhandene Menge der Metabolite zu gering ist, um sie mit der gewählten Methode quantifizieren zu können, wurde die Konzentrationsmessung im Medium durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zu den

Kontrollproben war für die Behandlung mit 50 und 100  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen (Abbildung 14). Unter diesen Bedingungen fand eine verstärkte Pyruvataufnahme aus sowie Lactatabgabe ins Medium statt. Das lässt darauf schließen, dass Resveratrol konzentrationsabhängig die Verstoffwechslung von Pyruvat vorantreibt. In welchem Maße die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA davon betroffen ist, lässt sich jedoch nicht eindeutig beurteilen.

Bereits nach einer Stunde Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol steigt die Pyruvataufnahme wie auch die Lactatabgabe der Zellen im Vergleich zur Kontrolle an und bleibt bis zum letzten Messpunkt nach 24 Stunden erhöht (Abbildung 15). Anders als bei der dosisabhängigen Untersuchung waren die detektierten Unterschiede zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Die Differenz zu den Kontrollzellen fiel auch deutlich geringer aus (abgesehen von der Pyruvatmessung nach einer Stunde) als bei der konzentrationsabhängigen Messung. Die Ergebnisse zeigen, dass 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol in C2C12-Zellen sehr schnell den Stoffwechselumsatz von Pyruvat steigern, wobei die Änderungen jedoch eher gering sind und nicht immer statistische Signifikanz erreichen. Die leichte Diskrepanz zwischen dem konzentrations- und dem zeitabhängigen Versuch bezüglich der Messwerte für eine Resveratrolkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  könnte unterschiedlichen Versuchsbedingungen geschuldet sein, die beispielsweise durch genotypische und phänotypische Variationen der Zellen, bedingt durch eine abweichende Passagenanzahl, zustande kommen können [201]. Weitere Wiederholungen des Experiments sollten im Mittel diese Unterschiede aufheben.

#### 4.1.3 NAD

Die Reduktion von Pyruvat zu Lactat geht auch immer mit einer Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> einher. Um herauszufinden ob Resveratrol das Verhältnis dieser beiden Nukleotide in der Zelle ebenfalls zu beeinflussen vermag, wurden zeitliche wie auch konzentrationsbedingte Änderungen im NAD<sup>+</sup> und NADH-Gehalt bestimmt.

Ab einer Resveratrolkonzentration von 75  $\mu\text{M}$  ist bei einem Behandlungszeitraum von 16 Stunden mehr NAD<sup>+</sup> in den Zellen vorhanden und die Menge an NADH ist im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich allerdings nur für den NADH-Gehalt unter Behandlung mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol. Das NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis wird nicht signifikant verändert, doch steigt dieses um ein Drittel unter Einfluss von 75 bzw. 100  $\mu\text{M}$  des Wirkstoffs an (Abbildung 17). Diese Resultate lassen schlussfolgern, dass eine relativ hohe Resveratrolkonzentration benötigt wird, um eine geringe, wenn auch nicht signifikante Erhöhung im NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis zu bewirken und dass sowohl die Variation der NAD<sup>+</sup> als auch der NADH-Menge seinen Anteil zu dieser Änderung beiträgt. Womöglich tritt der durch Resveratrol ausgelöst Effekt verstärkt nach kürzerer oder längerer Zeit der Inkubation auf und ist nach 16 Stunden nur schwach ausgeprägt. Erkenntnisse darüber sollten zeitabhängige Untersuchungen liefern.

Bei diesen zeigte sich unter Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Differenz des  $\text{NAD}^+$ -Gehalts im Vergleich mit den Kontrollzellen (Abbildung 18). Die NADH-Menge unterschied sich indessen tendenziell nach einer, acht und 16 Stunden. Nur die gemessenen Werte nach einer Stunde wiesen jedoch einen signifikanten Unterschied auf. Das Verhältnis von  $\text{NAD}^+$  zu NADH war nach einer Inkubationszeit von acht Stunden um das 3-Fache signifikant erhöht. Vergleicht man diese Werte mit Studien, in denen Muskelzellen einer Glucoseresuktion ausgesetzt waren, so ist festzustellen, dass in diesen erst deutlich später, nämlich nach 30 bis 36 [139] bzw. 48 Stunden Inkubationszeit [150] ein Effekt zu verzeichnen war. Zudem hat man vor allem eine gesteigerte  $\text{NAD}^+$ -Konzentration in den Zellen registriert. Von dieser wird angenommen, dass sie neben NAM den wichtigsten Regulator der Sirt1-Aktivität darstellt [126, 202, 203]. Der Wirkung von NADH als Inhibitor von Sirt1 wurde hingegen, anders als in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, in Säugetieren bisher weniger Einfluss zugesprochen [204]. Ob Resveratrol die Sirt1-Aktivität ähnlich wie bei einer verminderten Glucoseverfügbarkeit über einen erhöhten  $\text{NAD}^+$ -Gehalt erst nach längerer Inkubation reguliert oder ob Resveratrol seine Wirkung schneller und über eine Verminderung der NADH-Menge erreicht, können nur weiterführende vergleichende Untersuchungen zeigen. Weiterhin könnten etwa zellkompartimentspezifische Messungen einen differenzierteren Einblick leisten.

#### 4.1.4 ATP und ADP

Neben dem NAD-Gehalt liefert das Level an ATP einen wichtigen Hinweis auf den metabolischen Status der Zelle. Aus diesem Grund wurden zeit- und dosisabhängig Messungen der ATP und ADP-Menge durchgeführt. In den Experimenten ergab sich bereits ab 1  $\mu\text{M}$  Resveratrol ein signifikant niedrigeres ATP-Level als das der unbehandelten Zellen (Abbildung 19). Mit steigender Konzentration sinkt es kontinuierlich ab. Der ADP-Gehalt steigt indessen um die Hälfte bei der Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  des Wirkstoffs und nimmt bei höheren Konzentrationen bis zu 100  $\mu\text{M}$  beträchtlich ab. Damit ergibt sich für das Verhältnis der beiden Energieäquivalente zueinander ein maximaler Anstieg auf das doppelte bei 2,5  $\mu\text{M}$  und bei 30  $\mu\text{M}$  und höheren Resveratrolkonzentrationen eine deutliche Erniedrigung. Offenbar stimuliert Resveratrol schon in geringen Dosen energieverbrauchende Prozesse bzw. hemmt es die Synthese von ATP. Die Energiegewinnung scheint bei der Behandlung mit niedrigen Konzentrationen vor allem aus ATP, bei höheren eher aus der Abspaltung der Phosphatgruppe des ADPs zu erfolgen. Möglicherweise könnte eine Inhibition der ATPase durch Resveratrol, wie sie bereits in anderen Zelllinien beobachtet wurde [205, 206], ursächlich für die sinkenden Konzentrationen der Energieäquivalente sein. Inwieweit eine mögliche Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese zu dem erniedrigten ATP-Level beiträgt, zeigen Expressionsuntersuchungen des entkoppelnden Proteins Ucp3, deren Ergebnisse im kommenden Abschnitt erörtert werden.

Ab einer Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol kommen sowohl ATP als auch ADP stark vermindert in der Zelle vor (Abbildung 19), was vermuten lässt, dass die AMP-Menge deutlich ansteigt. Das hat

Einfluss auf die Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), die Prozesse wie die Oxidation von Fettsäuren und die Aufnahme von Glucose fördert, um die zelluläre Energiehomöostase aufrecht zu erhalten. Daneben steigert AMPK die Expression von Nampt, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der NAD<sup>+</sup>-Synthese, was wiederum Einfluss auf die Aktivität von NAD<sup>+</sup>-abhängigen Regulatoren des Stoffwechsels hat [149, 150]. Laut der ermittelten Werte, ist der Einfluss auf den NAD<sup>+</sup>-Gehalt (Abbildung 18) jedoch nicht besonders groß. Ob sich das mit einer geringen AMPK-Aktivität, einer schwachen Nampt-Expression oder anderen Einflussfaktoren begründen lässt, müssten entsprechende Untersuchungen zeigen.

Schaut man sich die Behandlung mit 50 µM Resveratrol im zeitlichen Verlauf an, so wird deutlich, dass das Level an ATP kontinuierlich mit der Zeit absinkt und nach etwa sechs Stunden sein Minimum erreicht (Abbildung 20). Der ADP-Gehalt ist indessen bereits beim ersten Messpunkt deutlich erniedrigt und verändert sich anschließend über einen Zeitraum von 24 Stunden nicht merklich. Es ist davon auszugehen, dass die Messwerte, die in dieser Versuchsreihe nach 16 Stunden Inkubationszeit ermittelt wurden, zu vernachlässigen sind, da sie zum einen deutlich von denen der konzentrationsabhängigen Studie abweichen und sich zum anderen nicht in den Verlauf der andern Messpunkte einfügen. Der Wert der konzentrationsabhängigen Untersuchung für 50 µM nach 16 Stunden stimmt hingegen sehr gut mit dem Kurvenverlauf überein. Auch in der ATP/ADP-Messreihe ist, ähnlich wie bei der Analyse von Pyruvat, Lactat und NAD, eine sehr schnelle Reaktion auf den Wirkstoff zu verzeichnen. Bereits nach einer halben Stunde unterscheidet sich der ADP-Gehalt und nach 1,5 Stunden die ATP-Menge von denen der Kontrollen. Das ADP/ATP-Verhältnis steigt langsam mit der Zeit um etwa das 3-Fache bis zum letzten Messpunkt an.

Betrachtet man neben den Resveratrol behandelten Zellen außerdem das ADP/ATP-Verhältnis der DMSO Kontrolle, ist auch für dieses erstaunlicherweise eine Veränderung über den untersuchten Behandlungszeitraum festzustellen (Abbildung 20). Die Zellen reagieren in den ersten drei Stunden nach Zugabe von DMSO besonders intensiv. Im Vergleich dazu fallen die Werte der Resveratrol behandelten Proben deutlich geringer aus, was mit den besonders niedrigen ADP-Werten zu erklären ist. DMSO dient als Lösungsmittel für viele Substanzen und wird darum standardmäßig bei Einsatz dieser in der gleichen Konzentration der Kontrolle beigefügt, um DMSO-basierte Effekte herauszurechnen. Allerdings hat DMSO selbst auch eine Wirkung auf Zellen und ist in höheren Dosen sogar toxisch. In Anbetracht der Tatsache, dass DMSO eine dermaßen starke Reaktion der Zellen verursacht, wäre es sinnvoll zukünftig neben der DMSO auch immer eine vollkommen unbehandelte Kontrolle mitzuführen.

#### 4.1.5 *Ucp3 und JNK*

Um herauszufinden, ob der stark erniedrigte ATP-Gehalt in den Zellen durch ein erhöhtes Vorkommen von Ucp3 mitverursacht ist, wurde das Protein im Western Blot mittels Antikörper

detektiert und anschließend densitometrisch analysiert. Tatsächlich ist die Ucp3-Menge in den Zellen, die mit 50  $\mu\text{M}$  Resveratrol behandelt wurden doppelt so hoch wie in den DMSO Kontrollzellen (Abbildung 22). Das steht im Einklang mit der bereits zuvor in der Arbeitsgruppe beobachteten Erhöhung des mRNA-Levels (unveröffentlichte Daten der AG) und erklärt mindestens teilweise die geringe Menge an ATP. Eine verstärkte Ucp3-Expression trägt weiterhin dazu bei, das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies zu minimieren [207]. Zuvor in der Arbeitsgruppe durchgeführte Expressionsanalysen geben jedoch Anlass zur Vermutung, dass das oxidative Stresslevel erhöht ist. Es wurde eine verstärkte Expression von antioxidativen Enzymen wie Sod1 und die Initiierung von Glutathion-Stoffwechselprozessen beobachtet (unveröffentlichte Daten der AG). Das lässt einen etwaigen Rückschluss auf ein erhöhtes ROS-Level zu, welches eben solche Reaktionen auslöst. Der JNK-Phosphorylierungsgrad sollte deshalb als Indikator für das Vorhandensein von oxidativem Stress in den Zellen dienen. Unter Resveratrolbehandlung blieb dieser allerdings unverändert, was das Vorkommen von ROS nicht zwangsläufig ausschließt, aber eine Involvierung von JNK als antioxidativer Reaktionsmechanismus unter Resveratrolbehandlung unwahrscheinlich macht.

## 4.2 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ZELL- UND TIERMODELL

Im folgenden Kapitel werden die existierenden Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten angeführt und diskutiert. Dieses Wissen soll helfen auftretende Diskrepanzen der Ergebnisse von Zellkultur- und Tierversuchen dieser Arbeit besser zu verstehen und einordnen zu können.

### 4.2.1 Einfluss der Zellkulturbedingungen

Einen großen Unterschied macht die Kultivierung der Zellen in der Zellkultur aus. Anders als Gewebszellen eines Tieres werden diese unter kontrollierten, optimalen Wachstumsbedingungen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung gehalten. Während sich physiologische Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* zwischen ein und 13% bewegen können, werden Zellen in Kultur bei einer sehr hohen Konzentration an Sauerstoff von bis zu 21% inkubiert. Dem Zellkulturmedium sind viele Wachstumsfaktoren beigesetzt, um eine optimale Entwicklung und Vermehrung der Zellen zu gewährleisten, die unter natürlichen Bedingungen in dem Maße nicht vorhanden sind. Zellen in Kultur unterliegen nur geringfügig einer Zell-Zell-Kontakthibition und auch die Zellkommunikation ist aufgrund der zweidimensionalen Anordnung der Zellen eingeschränkt. Zudem sind verschiedene Medium Zusammensetzungen erhältlich, die sich in pH, Glucosekonzentration, Wachstumsfaktoren und Nährstoffen unterscheiden. Studien haben bereits gezeigt, dass Variationen dieser Bedingungen zu drastischen Unterschieden in Genexpressionsprofilen führen und phänotypische Modifikationen zur Folge haben können. Weiterhin kann vielfaches Passagieren zu einer gehäuften Anzahl an Mutationen führen, die sich in genotypischen und eventuell auch phänotypischen Veränderungen der Zelle äußern [201]. All diese Faktoren haben einen Einfluss darauf, wie sich die Zelle unter Einwirkung von zu

testenden Substanzen verhält und sie können dafür verantwortlich sein, dass dieses Verhalten nicht dem *in vivo* Effekt entspricht.

#### 4.2.2 Komplexe Gewebe

Neben den genannten Unterschieden zwischen der Kultivierung von Zellen und Gewebszellen im lebenden Organismus, ist immer zu berücksichtigen, dass das untersuchte Gewebe aus mehreren Zelltypen aufgebaut ist. Diese unterscheiden sich in ihrer Funktion und tragen gemeinsam zu den spezifischen Eigenschaften und Funktionen des Gewebes bei. Die Funktion der einzelnen Zellen wird von den umgebenden Zellen wie auch von der extrazellulären Matrix beeinflusst. Dieser komplexe Aufbau *in vivo* wird in einer einfachen Zellkultur nicht abgebildet. Um diese Strukturen des Gewebes und Vorgänge zwischen den Zellen möglichst realistisch darzustellen, müsste auf dreidimensionale Co-Kulturen mehrerer Zelltypen zurückgegriffen werden. Bis dato wird diese Arbeitsweise jedoch selten genutzt, da sie sehr aufwendig ist.

Im Organismus bilden sich in ihrer Funktion unterstützende Gewebe weiterhin ein Organ. Dieses ist wiederum Teil eines Organsystems und kommuniziert als solches über komplexe Mechanismen mit anderen Organen und Organsystemen. Dieser Austausch ermöglicht dem Körper die Tätigkeit jedes Organs den Bedürfnissen des gesamten Körpers anzupassen und die Körperhomöostase aufrecht zu erhalten.

Jeder Muskel als Organ des Skelettmuskelsystems besteht hauptsächlich aus Skelettmuskelgewebe, Bindegewebe, Nerven und Blutgefäßen. Durch die Zusammenarbeit dieser einzelnen Komponenten wird erst die korrekte Funktionsweise des Muskelorgans erreicht. Einen Beitrag dazu leisten auch die verschiedenen Zelltypen aus denen die Skelettmuskelfasern aufgebaut sind. Grob lassen sich diese in Typ-I- und Typ-II-Fasern einteilen. Während Typ-I-Fasern, auch als rote Muskelfasern bezeichnet, für Dauerbeanspruchung mit begrenztem Kraftaufwand ausgelegt sind, können weiße Typ-II-Fasern sehr viel Kraft erzeugen, ermüden aber auch sehr viel schneller. Sie haben anders als Typ-I-Zellen eine recht hohe Kontraktionsrate, wofür eine große Menge an Energie aufgewendet werden muss. Um diesen kurzfristig benötigten Energiebetrag bereitstellen zu können, erfolgt die ATP-Produktion in den Typ-II-Fasern nicht nur aerob glykolytisch sondern auch anaerob. Typ-I-Muskelzellen greifen hingegen vor allem auf aus Fetten gewonnene Energie zurück und betreiben ausschließlich einen aeroben Energiestoffwechsel. Dementsprechend spricht man auch von *oxidativen* und *glykolytischen* Muskelfasern. Jeder Zelltyp geht zudem mit einer für ihn charakteristischen Mitochondriendichte einher, die die Art der Energiegewinnung reflektiert. So besitzen oxidative Skelettmuskelzellen deutlich mehr Mitochondrien als glykolytische Zellen das tun. Diese Unterscheidung in die zwei genannten Typen von Muskelfasern ist allerdings nicht so absolut zu sehen wie gerade dargestellt. So kann man Typ-II-Muskelzellen nochmals in mindestens zwei Typen unterteilen: Typ-IIa-Zellen ähneln in ihren Eigenschaften teilweise den Typ-I-Fasern; Typ-IIb-Muskelzellen sind hingegen sehr kräftige,

schnelle, aber in hohem Maße ermüdende Fasern. Überdies ist der Typ einer Skelettmuskelzelle nicht völlig festgelegt; er kann durch äußere Reize verändert werden.

Der große Unterschied zwischen dem verwendeten Skelettmuskelgewebe und C2C12-Zellen besteht vor allem auch darin, dass ersteres eine Kombination aus verschiedenen Muskelfasertypen darstellt. Diese betreiben also teilweise einen oxidativen und teilweise einen glykolytischen Energiestoffwechsel, während C2C12-Zellen primär glykolytisch arbeiten.

#### 4.2.3 *Metabolisierung und Bioverfügbarkeit von Resveratrol*

Abweichungen gibt es auch bezüglich der Resveratrol-Menge und -Form, welche am Zielort letztendlich ihre Wirkung entfaltet. In der Zellkulturschale wirkt die Substanz in ihrer unmetabolisierten Reinform in etwa in der Menge, in der sie dem Medium beigesetzt wurde. *In vivo* finden hingegen eine ganze Reihe von Prozessen statt bevor Resveratrol schließlich an den Skelettmuskelzellen Einfluss nehmen kann. So unterliegt der Wirkstoff der Aufnahme in die Blutbahn, der Verteilung im Körper sowie biochemischen Um- und Abbauprozessen. Resveratrol wird im Organismus relativ schnell und gut absorbiert, aber auch rasch metabolisiert.

Bei oraler Gabe wurde in Testpersonen eine Absorption von bis zu 70% der Ausgangsmenge beobachtet [208], allerdings konnte nur weniger als 5% des freien Resveratrols im Blutplasma nachgewiesen werden [208-210]. Die höchste Konzentration mit etwa 2  $\mu\text{M}$  freiem Resveratrol [7, 208] wurde bereits nach 30 [7] bis 90 min [210, 211] detektiert. Die Halbwertszeit betrug ebenfalls nur eine bis maximal neun Stunden [208, 210]. Bei Ratten konnten ganz ähnliche Werte gemessen werden. Auch hier befand sich die Blutplasmakonzentration von Resveratrol im niedrigen mikromolaren Bereich [38, 212-215], die Maximalkonzentration wurde schon nach 10 [216] bis 30 min [212] erreicht und als Halbwertszeit wurden 1,5 Stunden ermittelt [212]. In einer Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass nur Spuren, d.h. weniger als 1% der Ausgangsmenge an unmetabolisiertem Resveratrol in den Geweben ankommt. Es wird vor allem in der Leber und den Nieren gespeichert und schließlich mit dem Urin ausgeschieden [217, 218].

Ursache für die geringe Konzentration an Resveratrol ist die schnelle Metabolisierung des Wirkstoffs. Bereits nach 30 min nach Verabreichung liegt nahezu die gesamte Menge in glukuronidierter oder sulfatierter Form im Blut vor [208]. Die Metabolisierung erfolgt in Leber und Darm sehr schnell und führt dazu, dass die Bioverfügbarkeit von freiem Resveratrol rapide sinkt [211, 219-221]. Einige Arbeiten argumentieren, dass die Sulfatkonjugate [208] bzw. die Glukuronide [222] die eigentlich biologisch wirksamen Formen des Resveratrols sind [10, 223]. Das würde bedeuten, dass den meisten der *in vitro*-Studien nicht die Bedeutung beigegeben werden kann, wie bisher angenommen.

Um den *in vivo*-Zustand möglichst realistisch in *in vitro*-Experimenten zu reflektieren und damit eine verbesserte Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse zu erreichen, müsste zum einen der Zustand der nur vorübergehenden, aber wiederkehrenden Präsenz von einer geringen Menge an Resveratrol an den

Zellen geschaffen und zum anderen das Vorhandensein und der Effekt der Glukuronid- und Sulfat-Konjugate miteinbezogen werden. Wie groß der tatsächliche Einfluss der einzelnen Formen des Resveratrols ist, müssen entsprechende Studien zeigen.

Sollte das unmetabolisierte Resveratrol die vornehmlich aktive Form sein, muss es vor allem das Ziel sein, dessen Bioverfügbarkeit zu verbessern bzw. den Metabolisierungsprozess des Stoffes zu verzögern. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Reihe von Flavonoiden darunter Quercetin die Bioverfügbarkeit von Resveratrol fördern können, indem sie den Metabolisierungsprozess verlangsamen [224, 225]. Auch Barger *et al.* haben einen größeren Effekt im Mausmodell feststellen können, wenn den Tieren neben Resveratrol auch Quercetin und zur Absorptionssteigerung [226] Phytinsäure (*inositol hexaphosphate*, IP6) verabreicht wurde [68].

#### 4.3 DISKUSSION DER *IN VIVO*-ERGEBNISSE

Inwieweit die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse auch für den Organismus gelten, wird in den folgenden Abschnitten illustriert und diskutiert.

##### 4.3.1 *Gewichtsentwicklung der Tiere*

Das Gewicht der Tiere veränderte sich innerhalb des Behandlungszeitraums von 13 Wochen abhängig von der verabreichten Diät. Die durchschnittliche Nahrungsaufnahme unterschied sich dabei zwischen den verschiedenen Gruppen nicht. Während die Tiere, die eine Standardernährung befolgten, ihr Gewicht nicht veränderten, legten die Tiere, die sehr fettreich fraßen 35% an Gewicht zu und das ungeachtet dessen, ob Resveratrol in der Nahrung enthalten war oder nicht (Abbildung 9). Lagouge *et al.* konnten hingegen in ihren Experimenten unter Gabe von Resveratrol (4 g/ kg), verglichen mit Versuchstieren, denen eine hochkalorische Diät ohne die Substanz verabreicht wurde, eine nur halb so starke Gewichtszunahme der Mäuse verzeichnen [110]. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen dieser Studie könnte auf die unterschiedliche Menge an eingesetztem Wirkstoff zurückzuführen sein. So wurde etwa 40-mal weniger Resveratrol in dieser Untersuchung als in der von Lagouge *et al.* verabreicht, was einer niedrigen, aber für den Menschen realistischeren Dosis entspricht. Allerdings konnten Untersuchungen mit etwas höheren Resveratrolmengen (400 mg/ kg) ebenfalls keinen Effekt auf das Körpergewicht nachweisen [66]. Eine weitere Erklärung könnte das geringe Alter oder aber auch die vergleichsweise extrem starke Gewichtszunahme der in der Arbeit von Lagouge *et al.* eingesetzten Tiere liefern [110].

##### 4.3.2 *Stoffwechselregulation*

Ob Resveratrol, ähnlich wie in den *in vitro*-Experimenten beobachtet, auch *in vivo* einen Effekt auf die für die Umstellung des Stoffwechsels wichtigen Regulatoren Sirt1, Pgc1 $\alpha$ , Pdk4 und PdhE1 $\alpha$  ausübt,

zeigen Analysen des mRNA und Proteingehalts dieser Enzyme. Weiterhin geben die untersuchten Pyruvat-, Lactat- und NAD-Mengen Hinweise auf den Stoffwechselzustand der Zellen.

Die Gabe von 100 mg Resveratrol pro kg Futtermenge hatte auf die Expression im Skelettmuskelgewebe von Mäusen, denen die Standarddiät verabreicht wurde, nahezu keinen Effekt. Der *sirt1*, *pgc1a* und *pdk4*-Gehalt wies keinerlei Unterschiede unter Einwirkung der Substanz auf (Abbildung 10) und auch die Pdk4-Menge blieb unbeeinflusst (Abbildung 11). Hinsichtlich des PdhE1 $\alpha$ -Phosphorylierungsgrads führte Resveratrol zu einer tendenziell verminderten Phosphorylierung (Abbildung 12) und damit zu einer gesteigerten Aktivität des Pdc $\alpha$ . Dies lässt allerdings eher auf einen verstärkten Pyruvatumsatz und damit auf eine vermehrte Nutzung von Glucose als Energielieferant schließen. Tatsächlich ist der Pyruvat wie auch Lactatgehalt in der Resveratrolgruppe um etwa 30% geringer als in den Kontrolltieren (Abbildung 13). Das Verhältnis von NAD $^{+}$  zu NADH ist nicht verändert, doch scheinen Prozesse der NAD $^{+}$ -Synthese bzw. des Abbaus durch das Molekül beeinflusst zu werden. Es zeigte sich nämlich eine deutliche Tendenz zu einer geringeren NAD $^{+}$  wie auch NADH-Menge in den behandelten Mäusgeweben (Abbildung 16).

Die Untersuchungen von Barger *et al.* führten hingegen zu anderen Ergebnissen. So zeigte sich in deren Experimenten unter Gabe einer ähnlichen Menge an Resveratrol (50 mg/ kg Futter) eine positive Regulation der Sirt1- wie auch der *pdk4*-Expression [67], was eher auf eine verminderte Nutzung von Glucose hindeutet hin zu einem oxidativen Metabolismus der Zelle. Diese Unterschiede könnten aufgrund der ungleichen Dauer der Resveratrolfütterung (3 vs. 16 Monate), durch eine andere Muskelzusammensetzung oder aber die Altersdifferenz zu Stande kommen. Der erhöhte Glucoseumsatz steht allerdings im Einklang mit einer erhöhten Glucoseaufnahme, wie sie ebenfalls von Barger *et al.* berichtet wurde [67].

In Tieren, denen eine fettreiche Kost verabreicht wurde, zeigte sich ebenfalls ein nur schwacher Einfluss des Wirkstoffs auf den Stoffwechselhaushalt der Zellen. Die Expression von *sirt1* und *pgc1a* wurde nicht beeinflusst, lediglich die *pdk4*-mRNA-Menge wurde gesenkt (Abbildung 10), was jedoch keinen Unterschied im Pdk4-Proteingehalt zur Folge hatte (Abbildung 11). Resveratrol scheint indessen Phosphatasen positiv zu regulieren, die für eine Abnahme des PdhE1 $\alpha$ -Phosphorylierungsgrads sorgen. Daneben wird jedoch auch die PdhE1 $\alpha$ -Proteinexpression vermindert (Abbildung 12), was den Effekt auf die Aktivität des Pdc $\alpha$  wiederum aufheben könnte. In der Tat verändert sich die Pyruvat- wie auch Lactat-Konzentration im Muskel nicht (Abbildung 13). Für den NAD-Gehalt ergab sich ein ähnliches Bild wie für die Standarddiät. Es liegt tendenziell sowohl weniger NAD $^{+}$  als auch NADH in den Zellen vor, was aber zu keinem signifikanten Unterschied im Verhältnis der beiden Metabolite führt (Abbildung 16).

Wie Lagouge *et al.* und Baur *et al.* gezeigt haben, entfaltet Resveratrol allem voran in fettleibigen Mäusen seine positive Wirkung [66, 110]. In diesen vermag das Molekül den negativen gesundheitlichen Konsequenzen des Übergewichts entgegenzuwirken [110] und sogar die

Lebenserwartung der Tiere zu steigern [66]. Diese positiven Effekte wurden von einem Muskelfaserumbau begleitet, der für eben jene Wirkung von großer Bedeutung ist. In den glykolytischen Fasern des in den von Lagouge *et al.* untersuchten Wadenmuskels *Musculus gastrocnemius* fand eine verstärkte Expression sowie Aktivitätssteigerung des metabolischen Regulators *Pgc1 $\alpha$*  statt, die zu einem oxidativeren Phänotyp der Zellen führten [110]. Dass solch ein Effekt in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte, kann die vergleichsweise geringe Menge an eingesetztem Wirkstoff, das Alter und den Grad der Fettleibigkeit der Mäuse, aber auch den Stoffwechsellyp der untersuchten Muskeln zur Ursache haben. So besteht der Gastrocnemius-Muskel vor allem aus Typ II-Muskelfasern, die sehr empfindlich für äußere Stimuli sind und in denen der Basalgehalt der entscheidenden regulatorischen Enzyme deutlich geringer als in Zellen mit einer hohen oxidativen Kapazität ausfällt. Die in dieser Arbeit untersuchten Muskeln der hinteren Gliedmaßen weisen hingegen neben den Eigenschaften von hauptsächlich glykolytisch arbeitenden Muskeln auch solche des überwiegend oxidativen Soleus-Muskels auf. Dadurch ist die Menge der metabolischen regulatorischen Enzyme insgesamt höher und es findet eine eher geringe Reaktion auf äußere Reize statt.

Auch zwischen Tieren, denen die Kontrolldiät und Tieren, denen eine hochkalorische Diät gefüttert wurde, wurden keine besonders großen Unterschiede im Energiestoffwechsel detektiert. Weder die Konzentrationen an NAD (Abbildung 16) noch an Pyruvat oder Lactat (Abbildung 13) wiesen Ungleichheiten zwischen den Gruppen auf. Es zeigte sich allerdings eine Tendenz zu einer verminderten *sirt1*-Expression (Abbildung 10), wie sie bei einer übermäßigen Kalorienaufnahme in Muskelzellen zu beobachten ist [227] sowie ein tendenziell erhöhter *Pdk4*-Gehalt (Abbildung 11), der auch bei Diabetes, einer möglichen Folge von Fettleibigkeit, auftritt [228, 229]. Diese Erhöhung scheint sich jedoch nicht auf den *PdhE1 $\alpha$* -Phosphorylierungsgrad auszuwirken (Abbildung 12).

Nach den bisherigen Veröffentlichungen [65, 66] wäre zu erwarten, dass Resveratrol einen größeren Einfluss auf das Skelettmuskelgewebe von Tieren, die über Wochen eine sehr fettreiche Nahrung zu sich nahmen. Dass das hier nicht gegeben ist, könnte Folge einer nicht ganz so starken Gewichtszunahme sein. Die Mäuse der fettreichen Diät waren am Ende der Behandlung etwa ein Drittel schwerer als zu Beginn der Behandlung (Abbildung 9), während die Mäuse in den vielversprechenden Studien von Lagouge *et al.* über einen kürzeren Zeitraum fast zweidrittel an Gewicht zunahmen [110].

Beim Vergleich der *in vivo* und *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wird ersichtlich, dass Resveratrol einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Zellen in Kultur hat. In diesen deutet die Regulation der verschiedenen metabolischen Enzyme und Metabolite auf eine Umstellung von einem glykolytischen auf einen eher oxidativen Stoffwechsel hin. Im Gegensatz dazu beeinflusste die Gabe von Resveratrol den Metabolismus der Gewebemuskelzellen bei den Tieren der fettreichen Ernährung nur in geringem Maße. Ähnlich ist dies auch bei den Standarddiät-Mäusen, in denen ein verringerter Pyruvatgehalt

zusammen mit einer erniedrigten Lactatmenge (Abbildung 13) und einer verminderten PdhE1 $\alpha$ -Phosphorylierung (Abbildung 12) sogar eher einen verstärkten Glucoseverbrauch vermuten lässt.

Vor allem die Dosis an Resveratrol, die letztendlich an den Zellen wirkt, wie auch der Muskelfasertyp werden für die ungleichen Ergebnisse verantwortlich sein. In Zellkultur wird eine relativ hohe Konzentration von 50  $\mu$ M Resveratrol benötigt, um Effekte in den Zellen hervorzurufen; am Skelettmuskel in der Maus wirkt hingegen, bedingt durch Metabolisierungsprozesse, eine sehr viel geringere Menge der Substanz. Dabei ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch die Metabolite bzw. dass gerade die Metabolite des Resveratrols einen Einfluss auf die Zellen ausüben und dass diese möglicherweise den Wirkmechanismus des Stoffes *in vivo* sogar verändern. Dass die Wirkung im Organismus geringer ausfällt, ist zudem mit dem Vorhandensein mehrerer Fasertypen - darunter auch reaktionsträgen oxidativen Fasern - zu erklären, während die *in vitro*-Kultur nur aus sehr reaktionsfähigen glykolytischen Fasern besteht. Weiterhin maskiert die biologische Variabilität der Tiere eventuell auch geringe Veränderungen im Stoffwechsel, die in Zellkultur deutlich zum Vorschein kommen.

#### 4.3.3 Antioxidative Mechanismen

Da initiale Zellkulturstudien auf eine mögliche oxidative Stressbelastung der Zellen unter Resveratrolbehandlung hindeuteten (unveröffentlichte Daten der AG), wurden Expressionsanalysen von Enzymen der an der zellulären Stressantwort beteiligten Signalwege durchgeführt. Die Untersuchungen des JNK-Phosphorylierungslevels sowie der *sod1*-, *nrf2*- und *foxO3a*-Mengen der Mäuse, die die Kontrolldiät bekamen, weisen in keiner Weise auf ein vermehrtes Auftreten an ROS bei Gabe von Resveratrol hin (Abbildung 23). Bei den Tieren, die sich fettreich ernährten, hatte der Wirkstoff ebenfalls weder einen Einfluss auf den JNK-Phosphorylierungsgrad (Abbildung 24) noch auf die *sod1*-Expression (Abbildung 23). Allerdings wurden *foxO3a* und *nrf2* herunterreguliert (Abbildung 23). Welche Mechanismen dazu führen und welche Relevanz dies für die Zelle hat obliegt weiteren Untersuchungen. Die fettreiche Ernährung an sich führte zu einer leicht verstärkten Phosphorylierung von JNK (Abbildung 24), was bisherige Studien bestätigt [230-232]. Weder die Expression von *sod1* noch von *nrf2* wurde beeinflusst, doch setzte Resveratrol das Level an *foxO3a* in den Gewebezellen herab (Abbildung 23). Dies könnte einer verminderten Sirt1-Aktivität geschuldet sein, wie sie bei einer hochkalorischen Ernährungsweise auftritt [233].

Insgesamt lieferten weder die Ergebnisse in Zellkultur noch im Organismus Hinweise darauf, dass Resveratrol die untersuchten antioxidativen Schutzmechanismen aktiviert. Ob die in den C2C12-Zellen aktivierten Antioxidationsmechanismen (unveröffentlichte Daten der AG) dennoch auf einer vermehrten ROS-Produktion basieren, könnten Analysen von Peroxidationsprodukten, wie Proteincarbonyle, Malondialdehyde, F2-Isoprostane oder Lipidhydroperoxide klären. Dass keine Anzeichen von oxidativem Stress in den Gewebeproben, doch aber in der Zellkultur (unveröffentlichte

Daten der AG) auftreten, könnte auch eine Reaktion der Substanz mit Nährmediumkomponenten zur Ursache haben. Einige Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass Resveratrol unter Reaktion mit dem im Medium enthaltenen  $\text{NCO}_3$  zu Wasserstoffperoxid reagiert und somit die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt sind [234-236].

Zu einer Verminderung von ROS kann auch eine erhöhte Ucp3 Aktivität beitragen und damit die Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden verhindern. Zudem soll das Protein an der Regulation des Lipideintritts in die Mitochondrien und am Schutz vor Adipositas beteiligt sein [237, 238]. Lagouge *et al.* fanden einen erhöhten Ucp3-Gehalt in Mäusen denen eine fettreiche Diät mit Resveratrolzusatz gefüttert wurde [110]. In dieser Arbeit konnte der positive Effekt von Resveratrol auf die Ucp3-Expression hingegen nicht bestätigt werden. Weder in Mäusen der Kontroll- noch der fettreichen Diät veränderte sich das Ucp3-Level unter Resveratrolgabe (Abbildung 22). In den normalgewichtigen Tieren konnten in Übereinstimmung damit Barger *et al.* auch keinen Einfluss feststellen [67]. Diese Unterschiede können, wie bereits zuvor erwähnt, durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen bzw. Fasertypen bedingt sein. Die Zellkulturergebnisse belegten indessen eine Regulation der Ucp3-Expression durch Resveratrol (Abbildung 22). Mögliche Ursachen der Diskrepanz zu den *in vivo*-Ergebnissen sind in 4.2 diskutiert.

#### 4.3.4 H1K26Ac-ChIP

ChIP-Untersuchungen des Sirt1-Zielproteins H1K26Ac zeigten, anders als in vorangegangenen Zellkulturstudien (unveröffentlichte Daten der AG), an den Exons von *Sirt1*, *Pparg* und *Lxra* keine signifikant verstärkte Acetylierung unter Resveratroleinwirkung. Doch ist bei den Tieren, die die Kontrolldiät bekamen, im Gegensatz zu denen der fettreichen Ernährungsweise, eine Tendenz zu einem erhöhten Acetylierungsgrad aller untersuchten Exons erkennbar (Abbildung 26 und Abbildung 27). Ob dies Auswirkungen auf die Expression der entsprechenden Gene hat, sollten qPCR-Analysen klären. Bei der Kontrollgruppe bewirkte Resveratrol keinerlei Änderungen im mRNA-Gehalt der Gene. In der Gruppe, die eine hochkalorische Nahrung bekam, wurde die Expression von *ppary* und *lxra* bedingt durch den Wirkstoff sogar heruntergefahren (Abbildung 28). Eine verminderte Funktion dieser beiden Regulatoren ist mit einer gestörten Glucose- wie auch Fettsäureaufnahme in die Zellen und einer herabgesetzten Metabolisierung dieser Substrate assoziiert [239-241]. Ob sich die geringe Expression auch auf Proteinebene widerspiegelt und eine Relevanz für den Energiestoffwechsel der Zellen hat, können nur weitergehende Studien klären. Bisher wurde im Gegensatz zu den *in vivo*-Ergebnissen durch Resveratroleinwirkung in Zellkulturstudien eine gesteigerte Expression beobachtet (unveröffentlichte Daten der AG). Um eine mögliche Korrelation von Acetylierungsstatus und Genexpression zu erhalten, sollten nachfolgende Untersuchungen den H1K26Ac-Gehalt weiterer Exons wie auch der Promotorregion zur Aufgabe haben. In diesem Zusammenhang ist unter Umständen auch eine Bestimmung des Methylierungsstatus der Histone sinnvoll.

#### 4.4 FAZIT

Dass die in den Zellkulturstudien erworbenen Ergebnisse sich nicht in den *in vivo*-Untersuchungen widerspiegeln schließt eine dennoch vergleichbare Wirkung von Resveratrol nicht zwangsläufig aus. Möglicherweise sind lokale Unterschiede zwischen verschiedenen Bereichen einzelner Muskeln für eine erschwerte Detektion der Effekte verantwortlich oder aber die eingesetzte Wirkstoffdosis war nicht ausreichend, um deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu erzielen. Der Einsatz einer erhöhten Dosis oder aber die Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Resveratrol könnten diesem Problem entgegenwirken.

Eine Bestätigung der in der Zellkultur detektierten Regulation der Energieproduktion, der zellulären Stressantwort auf ROS oder aber auch die Veränderung des „Histon Codes“ am Chromatin könnte Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen der Wirkung von Resveratrol im Organismus liefern. Solche wären nicht nur im Hinblick auf die Behandlung metabolischer Krankheiten interessant, sondern hätten mitunter auch aufgrund des weiten Wirkungsspektrums von Resveratrol für eine ganze Reihe weiterer therapeutischer Anwendungen Relevanz.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Resveratrol, einem natürlicherweise in Pflanzen vorkommenden Phytoalexin, konnten in einer Vielzahl bisheriger Untersuchungen gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben werden. Der Wirkstoff ist im Tiermodell in der Lage schützend auf Herz und Kreislauf zu wirken [9-11, 13-15], aber auch chemopräventive [22, 24, 32, 34, 242], neuroprotektive [16, 26, 27, 243] und anti-inflammatorische [244-246] Eigenschaften zu entfalten. Zudem verlängert er die Lebensspanne in einer Reihe von Modellorganismen [56-58, 62-64] und kann den negativen Konsequenzen einer hochkalorischen Ernährungsweise entgegen [66, 110]. Die Wirkung von Resveratrol ähnelt zum Teil der einer Kalorienrestriktion [65, 67] und es wurden bereits molekulare Regulatoren identifiziert, die daran beteiligt zu sein scheinen. Im Skelettmuskel sorgen sowohl Resveratrol als auch die Kalorienrestriktion über die Regulation von Sirt1 und Pgc1 $\alpha$  dafür, dass vermehrt ein oxidativer Stoffwechsel in den Zellen betrieben wird [110, 126, 128]. Das führt zu einem gesteigerten Verbrauch von Fettsäuren als Energielieferant und könnte den beobachteten Effekt der weniger ausgeprägten Gewichtszunahme von Versuchstieren unter einer fettreichen Ernährungsweise und damit auch die positiven Effekte auf daraus resultierende Erkrankungen erklären [110].

In dieser Arbeit sollten nun Analysen auf mRNA-, Protein- wie auch auf Metabolitebene weitere Erkenntnisse über die Modulation des Energiestoffwechsels in C2C12-Zellen und im Skelettmuskelgewebe von Mäusen unter Resveratroleinwirkung geben. Zudem wurden Untersuchungen angestellt, die einen Hinweis auf eine mögliche Wirkungsvermittlung des Stoffes über antioxidative Schutzmechanismen liefern. ChIP-Analysen des Sirt1 Zielproteins H1K26Ac gaben einen Einblick in die durch Resveratrol regulierte Sirt1-Deacetylaseaktivität am Chromatin.

Die Ergebnisse der Zellkulturstudien dieser Arbeit ergaben eine verstärkte Pdk4-Expression, die in einer erhöhten Phosphorylierung und damit einer negativen Regulation von PdhE1 $\alpha$ , einer Untereinheit des Pdc $\alpha$ , resultierte. Dabei stieg der Gesamtproteingehalt der Pyruvatdehydrogenase, was sich allerdings wiederum positiv auf deren Aktivität auswirkt. Die Aufnahme von Pyruvat sowie dessen Oxidation zu Lactat war in den Zellen für 50 und 100  $\mu$ M des Wirkstoffs verstärkt. Inwieweit die Pyruvatumsetzung zu Acetyl-CoA von diesen Prozessen betroffen ist, lässt sich jedoch nicht eindeutig beurteilen. Das NAD<sup>+</sup>/NADH-Verhältnis stieg nach acht Stunden Inkubationszeit von 50  $\mu$ M Resveratrol auf das Dreifache der Kontrollzellen an, woraus eine positive Regulation von NAD<sup>+</sup>-abhängigen Enzymen wie Sirt1 resultiert. Resveratrol beeinflusst besonders stark die Energieträger ATP und ADP. Beide liegen vermindert bei Einwirkung höherer Dosen an Resveratrol in den Zellen vor. Dazu trägt das die ATP-Synthese von der Atmungskette entkoppelnde Protein Ucp3 bei. Im Vergleich zu Kontrollzellen wird dieses doppelt so stark bei Behandlung mit 50  $\mu$ M Resveratrol exprimiert. Resveratrol reguliert in C2C12-Zellen offenbar wichtige metabolische Enzyme, die sich wiederum auf den zellulären Metabolitgehalt auswirken. Die Regulation der ATP-Synthese scheint bei der Wirkungsvermittlung von besonderer Bedeutung zu sein. Eine Reaktion der Zellen auf

Metabolitebene findet schon nach sehr kurzer Inkubationszeit statt, allerdings bedarf es zumindest für die Regulation der Pyruvat-, Lactat- und NAD-Konzentration einer relativ hohen Konzentration des Wirkstoffes von mindestens 50  $\mu\text{M}$ .

Da die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf den Gesamtorganismus zulassen, wurden diese im Skelettmuskelgewebe von Mäusen validiert. Analysen von Tieren einer Standarddiät oder einer fettreichen Diät sollten die Effekte auf beiderlei Umstände verdeutlichen. Pdk4 wurde, anders als in den Zellen, von Resveratrol nicht reguliert. Allerdings ergibt sich dennoch ein Effekt auf den PdhE1 $\alpha$ -Phosphorylierungsstatus. Für beide Diäten zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung und damit eine verstärkte Aktivität des Pdc $\alpha$ . Signifikant war dieser Unterschied jedoch nur für Mäuse der fettreichen Ernährung. In diesen nahm unter Resveratroleinwirkung auch der PdhE1 $\alpha$ -Proteingehalt ab, was der erhöhten Aktivität wiederum entgegenwirkt. Das bestätigt der Pyruvat-Gehalt der Zellen, denn dieser wurde durch Resveratrol nicht beeinflusst. In den Tieren der Kontrolldiät nahm die Pyruvat- wie auch die Lactat-Menge hingegen ab, was auf einen verstärkten Umsatz von Pyruvat zu Acetyl-CoA und damit auf eine vermehrte Nutzung von Glucose als Energielieferant schließen lässt. Die NAD-Konzentration wurde durch Resveratrol nicht signifikant verändert. Und auch auf den Ucp3-Gehalt hatte der Wirkstoff *in vivo* keinen Einfluss. Die Untersuchungen der an der zellulären Antwort auf oxidativen Stress beteiligten Enzyme wiesen auf keine Regulation durch Resveratrol hin, die an der Wirkungsvermittlung beteiligt sein könnte. Die *in vitro* beobachtete verstärkte Acetylierung von H1K26 konnte in ChIP-Analysen des Gewebes nicht bestätigt werden. Lediglich eine Tendenz zu einem erhöhten Acetylierungsstatus bei Mäusen, denen Resveratrol mit einer Standarddiät verabreicht wurde, wurde festgestellt. Der Wirkstoff zeigte somit insgesamt in dieser Arbeit nur einen sehr geringen Effekt auf Mäuse beider Diäten.

Die *in vitro* erzielten Ergebnisse konnten demnach im Skelettmuskelgewebe der Mäuse nicht reproduziert werden. Unter anderem könnten dafür Unterschiede im Stoffwechsel der Zellen in Kultur und im Organismus verantwortlich sein oder aber die eingesetzte Resveratrol-Dosis genügt nicht, um eine ausreichend hohe Verfügbarkeit des Stoffes an den Zellen zu gewährleisten. Zukünftige Studien mit einer höheren Wirkstoffmenge oder der Gewährleistung einer verbesserten Bioverfügbarkeit durch Flavonoide wie Quercetin [221, 224, 225] könnten die Ergebnisse der Zellkultur durchaus bestätigen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Mark, L., et al., *A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines*. J Chromatogr Sci, 2005. **43**(9): p. 445-9.
2. Arichi, H., et al., *Effects of stilbene components of the roots of Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. on lipid metabolism*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1982. **30**(5): p. 1766-70.
3. Vastano, B.C., et al., *Isolation and identification of stilbenes in two varieties of Polygonum cuspidatum*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(2): p. 253-6.
4. Poussier, B., et al., *Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis*. J Vasc Surg, 2005. **42**(6): p. 1190-7.
5. Bohm, M., S. Rosenkranz, and U. Laufs, *[The "French Paradox"--effects of alcohol, wine and wine polyphenols on the heart]*. Dtsch Med Wochenschr, 2002. **127**(51-52): p. 2748-56.
6. Rosenkranz, S., et al., *Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the "French paradox"*. FASEB J, 2002. **16**(14): p. 1958-60.
7. Goldberg, D.M., J. Yan, and G.J. Soleas, *Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects*. Clin Biochem, 2003. **36**(1): p. 79-87.
8. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
9. Wang, Z., et al., *Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels*. Int J Mol Med, 2005. **16**(4): p. 533-40.
10. 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.
11. Zou, J., et al., *Effects of resveratrol on oxidative modification of human low density lipoprotein*. Chin Med J (Engl), 2000. **113**(2): p. 99-102.
12. 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.
13. Kaga, S., et al., *Resveratrol enhances neovascularization in the infarcted rat myocardium through the induction of thioredoxin-1, heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(5): p. 813-22.
14. Ray, P.S., et al., *The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(1-2): p. 160-9.
15. Sato, M., et al., *Myocardial protection with red wine extract*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(2): p. 263-8.
16. Raval, A.P., et al., *Resveratrol and ischemic preconditioning in the brain*. Curr Med Chem, 2008. **15**(15): p. 1545-51.
17. Rivera, L., et al., *Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(6): p. 1053-63.

18. Chen, Y.R., et al., *Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-term survival in rats with myocardial infarction*. Cardiovasc Drugs Ther, 2008. **22**(6): p. 479-85.
19. Naderali, E.K., P.J. Doyle, and G. Williams, *Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs*. Clin Sci (Lond), 2000. **98**(5): p. 537-43.
20. Jager, U. and H. Nguyen-Duong, *Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated porcine coronary arteries*. Arzneimittelforschung, 1999. **49**(3): p. 207-11.
21. Das, S., et al., *Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart*. Vascul Pharmacol, 2005. **42**(5-6): p. 281-9.
22. Imamura, G., et al., *Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H1996-2003.
23. 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.
24. Hung, L.M., et al., *The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(7): p. 1627-33.
25. Frankel, E.N., A.L. Waterhouse, and J.E. Kinsella, *Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol*. Lancet, 1993. **341**(8852): p. 1103-4.
26. Parker, J.A., et al., *Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 349-50.
27. Kumar, P., et al., *Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms*. Behav Pharmacol, 2006. **17**(5-6): p. 485-92.
28. Kim, D., et al., *SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis*. EMBO J, 2007. **26**(13): p. 3169-79.
29. Blanchet, J., et al., *Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(5): p. 1243-50.
30. Lu, K.T., et al., *Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(16): p. 6910-3.
31. Chao, J., et al., *Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(7): p. 1019-26.
32. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science, 1997. **275**(5297): p. 218-20.
33. Li, Z.G., et al., *Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol*. Carcinogenesis, 2002. **23**(9): p. 1531-6.
34. Athar, M., et al., *Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **224**(3): p. 274-83.

35. Kimura, Y. and H. Okuda, *Resveratrol isolated from Polygonum cuspidatum root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice*. J Nutr, 2001. **131**(6): p. 1844-9.
36. Su, J.L., et al., *Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 19385-98.
37. Harper, C.E., et al., *Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice*. Carcinogenesis, 2007. **28**(9): p. 1946-53.
38. van Ginkel, P.R., et al., *Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(17): p. 5162-9.
39. Benitez, D.A., et al., *Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines*. J Androl, 2007. **28**(2): p. 282-93.
40. Vanamala, J., et al., *Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 238.
41. Brakenhielm, E., R. Cao, and Y. Cao, *Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes*. FASEB J, 2001. **15**(10): p. 1798-800.
42. Cao, Y., et al., *Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants*. J Asian Nat Prod Res, 2005. **7**(3): p. 205-13.
43. Docherty, J.J., et al., *Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication*. Antiviral Res, 1999. **43**(3): p. 145-55.
44. Palamara, A.T., et al., *Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol*. J Infect Dis, 2005. **191**(10): p. 1719-29.
45. Daroch, F., et al., *In vitro antibacterial activity of Chilean red wines against Helicobacter pylori*. Microbios, 2001. **104**(408): p. 79-85.
46. Tegos, G., et al., *Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(10): p. 3133-41.
47. Jung, H.J., et al., *Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi*. Arch Pharm Res, 2005. **28**(5): p. 557-60.
48. McCay, C.M., M.F. Crowell, and L.A. Maynard, *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935*. Nutrition, 1989. **5**(3): p. 155-71; discussion 172.
49. Barger, J.L., R.L. Walford, and R. Weindruch, *The retardation of aging by caloric restriction: its significance in the transgenic era*. Exp Gerontol, 2003. **38**(11-12): p. 1343-51.
50. Lin, S.J., et al., *Calorie restriction extends Saccharomyces cerevisiae lifespan by increasing respiration*. Nature, 2002. **418**(6895): p. 344-8.
51. Partridge, L., M.D. Piper, and W. Mair, *Dietary restriction in Drosophila*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 938-50.
52. Piper, M.D. and L. Partridge, *Dietary restriction in Drosophila: delayed aging or experimental artefact?* PLoS Genet, 2007. **3**(4): p. e57.

53. Walker, G., et al., *Dietary restriction in C. elegans: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 929-37.
54. Guarente, L. and F. Picard, *Calorie restriction--the SIR2 connection*. Cell, 2005. **120**(4): p. 473-82.
55. Howitz, K.T., et al., *Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 191-6.
56. Wood, J.G., et al., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 686-9.
57. Viswanathan, M., et al., *A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining C. elegans life span*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 605-15.
58. Bauer, J.H., et al., *An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12980-5.
59. Pacholec, M., et al., *SIRT1720, SIRT2183, SIRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8340-51.
60. Kaeberlein, M., et al., *Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17038-45.
61. 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.
62. Jarolim, S., et al., *A novel assay for replicative lifespan in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2004. **5**(2): p. 169-77.
63. Gruber, J., S.Y. Tang, and B. Halliwell, *Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of Caenorhabditis elegans*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 530-42.
64. Valenzano, D.R., et al., *Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate*. Curr Biol, 2006. **16**(3): p. 296-300.
65. Pearson, K.J., et al., *Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span*. Cell Metab, 2008. **8**(2): p. 157-68.
66. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
67. Barger, J.L., et al., *A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2264.
68. Barger, J.L., et al., *Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart*. Exp Gerontol, 2008. **43**(9): p. 859-66.
69. Su, H.C., L.M. Hung, and J.K. Chen, *Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(6): p. E1339-46.
70. Lane, M.A., D.K. Ingram, and G.S. Roth, *Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk*. Toxicol Sci, 1999. **52**(2 Suppl): p. 41-8.

71. Das, D.K. and N. Maulik, *Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine*. Mol Interv, 2006. **6**(1): p. 36-47.
72. Fontana, L., et al., *Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6659-63.
73. Hursting, S.D., et al., *Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 131-52.
74. Sharma, M. and Y.K. Gupta, *Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats*. Life Sci, 2002. **71**(21): p. 2489-98.
75. Mattson, M.P., S.L. Chan, and W. Duan, *Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior*. Physiol Rev, 2002. **82**(3): p. 637-72.
76. Isomaa, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2001. **24**(4): p. 683-9.
77. Lakka, H.M., et al., *The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men*. JAMA, 2002. **288**(21): p. 2709-16.
78. Girman, C.J., et al., *The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS)*. Am J Cardiol, 2004. **93**(2): p. 136-41.
79. Hanson, R.L., et al., *Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3120-7.
80. Laaksonen, D.E., et al., *Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study*. Am J Epidemiol, 2002. **156**(11): p. 1070-7.
81. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. JAMA, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
82. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
83. Boden, G. and G.I. Shulman, *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction*. Eur J Clin Invest, 2002. **32 Suppl 3**: p. 14-23.
84. Jensen, M.D., et al., *Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects*. Diabetes, 1989. **38**(12): p. 1595-601.
85. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 347-55.
86. Fernandez-Real, J.M. and W. Ricart, *Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome*. Endocr Rev, 2003. **24**(3): p. 278-301.
87. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.
88. Boden, G., et al., *Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2438-46.

89. Kim, J.A., Y. Wei, and J.R. Sowers, *Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance*. *Circ Res*, 2008. **102**(4): p. 401-14.
90. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. *Diabetes*, 1997. **46**(6): p. 983-8.
91. Lewis, G.F., et al., *Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(1): p. 158-66.
92. Lewis, G.F. and G. Steiner, *Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state*. *Diabetes Care*, 1996. **19**(4): p. 390-3.
93. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, *Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes*. *Arch Med Res*, 2005. **36**(3): p. 232-40.
94. Murakami, T., et al., *Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(11): p. 1819-28.
95. Yamauchi, T., et al., *Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine*. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2003. **3**(4): p. 243-54.
96. Matsuzawa, Y., et al., *Adiponectin and metabolic syndrome*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(1): p. 29-33.
97. Wisse, B.E., *The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(11): p. 2792-800.
98. Mertens, I., et al., *Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome*. *Int J Obes (Lond)*, 2006. **30**(8): p. 1308-14.
99. Wiman, B., *Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease*. *Thromb Haemost*, 1995. **74**(1): p. 71-6.
100. Yudkin, J.S., et al., *Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?* *Atherosclerosis*, 2000. **148**(2): p. 209-14.
101. Ferrannini, E., et al., *Insulin resistance in essential hypertension*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(6): p. 350-7.
102. Anderson, E.A., et al., *Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(6): p. 2246-52.
103. Egan, B.M., *Insulin resistance and the sympathetic nervous system*. *Curr Hypertens Rep*, 2003. **5**(3): p. 247-54.
104. Cline, G.W., et al., *Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(4): p. 240-6.
105. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E1130-41.
106. Virkamaki, A., et al., *Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle*. *Diabetes*, 2001. **50**(10): p. 2337-43.

107. Babio, N., et al., *Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(8): p. 563-70.
108. Estruch, R., et al., *Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial*. Ann Intern Med, 2006. **145**(1): p. 1-11.
109. Csiszar, A., et al., *Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1694-9.
110. Lagouge, M., et al., *Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-22.
111. Chi, T.C., et al., *Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats*. Life Sci, 2007. **80**(18): p. 1713-20.
112. Deng, J.Y., et al., *Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways*. Diabetes, 2008. **57**(7): p. 1814-23.
113. Park, C.E., et al., *Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase*. Exp Mol Med, 2007. **39**(2): p. 222-9.
114. Timmers, S., et al., *Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans*. Cell Metab, 2011. **14**(5): p. 612-22.
115. Heilbronn, L.K. and E. Ravussin, *Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(3): p. 361-9.
116. Henriksson, J., *Training induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise*. J Physiol, 1977. **270**(3): p. 661-75.
117. Henriksen, E.J., *Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance*. J Appl Physiol, 2002. **93**(2): p. 788-96.
118. de Lange, P., et al., *Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2579-81.
119. Kelly, D.P. and R.C. Scarpulla, *Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 357-68.
120. Storlien, L., N.D. Oakes, and D.E. Kelley, *Metabolic flexibility*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 363-8.
121. Cahill, G.F., Jr., et al., *Hormone-fuel interrelationships during fasting*. J Clin Invest, 1966. **45**(11): p. 1751-69.
122. Sugden, M.C., et al., *Mechanisms involved in the coordinate regulation of strategic enzymes of glucose metabolism*. Adv Enzyme Regul, 1993. **33**: p. 71-95.
123. Wende, A.R., et al., *PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 10684-94.
124. Wu, Z., et al., *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. Cell, 1999. **98**(1): p. 115-24.

125. Koves, T.R., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33588-98.
126. Gerhart-Hines, Z., et al., *Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1913-23.
127. Brunet, A., et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2011-5.
128. Rodgers, J.T., et al., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 113-8.
129. Feige, J.N., et al., *Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation*. Cell Metab, 2008. **8**(5): p. 347-58.
130. Amat, R., et al., *SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 21872-80.
131. Blander, G. and L. Guarente, *The Sir2 family of protein deacetylases*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 417-35.
132. Sinclair, D.A., *Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 987-1002.
133. Cohen, H.Y., et al., *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **305**(5682): p. 390-2.
134. Civitarese, A.E., et al., *Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans*. PLoS Med, 2007. **4**(3): p. e76.
135. Picard, F., et al., *Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma*. Nature, 2004. **429**(6993): p. 771-6.
136. Bordone, L., et al., *Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells*. PLoS Biol, 2006. **4**(2): p. e31.
137. Fulco, M. and V. Sartorelli, *Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues*. Cell Cycle, 2008. **7**(23): p. 3669-79.
138. Heigenhauser, G.J. and M.L. Parolin, *Role of pyruvate dehydrogenase in lactate production in exercising human skeletal muscle*. Adv Exp Med Biol, 1999. **474**: p. 205-18.
139. Fulco, M., et al., *Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt*. Dev Cell, 2008. **14**(5): p. 661-73.
140. Schenk, S., et al., *Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction*. J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4281-8.
141. McCarty, M.F., *Chronic activation of AMP-activated kinase as a strategy for slowing aging*. Med Hypotheses, 2004. **63**(2): p. 334-9.
142. Apfeld, J., et al., *The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3004-9.

143. Ruderman, N.B., et al., *AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(4): p. E751-60.
144. Price, N.L., et al., *SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function.* Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 675-90.
145. Wang, Y., Y. Liang, and P.M. Vanhoutte, *SIRT1 and AMPK in regulating mammalian senescence: a critical review and a working model.* FEBS Lett, 2011. **585**(7): p. 986-94.
146. Hou, X., et al., *SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase.* J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20015-26.
147. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade.* Curr Biol, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
148. Lan, F., et al., *SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation.* J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27628-35.
149. Canto, C., et al., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity.* Nature, 2009. **458**(7241): p. 1056-60.
150. Canto, C., et al., *Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle.* Cell Metab, 2010. **11**(3): p. 213-9.
151. Costford, S.R., et al., *Increased susceptibility to oxidative damage in post-diabetic human myotubes.* Diabetologia, 2009. **52**(11): p. 2405-15.
152. Costford, S.R., et al., *Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(1): p. E117-26.
153. Jager, S., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 12017-22.
154. Lira, V.A., et al., *Nitric oxide and AMPK cooperatively regulate PGC-1 in skeletal muscle cells.* J Physiol, 2010. **588**(Pt 18): p. 3551-66.
155. Irrcher, I., et al., *AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells.* PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3614.
156. Suwa, M., H. Nakano, and S. Kumagai, *Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles.* J Appl Physiol, 2003. **95**(3): p. 960-8.
157. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance.* Science, 2003. **300**(5622): p. 1140-2.
158. Petersen, K.F., et al., *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes.* N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 664-71.
159. Patti, M.E., et al., *Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8466-71.
160. Mootha, V.K., et al., *PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.* Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 267-73.

161. Sparks, L.M., et al., *A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle*. *Diabetes*, 2005. **54**(7): p. 1926-33.
162. Wisloff, U., et al., *Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity*. *Science*, 2005. **307**(5708): p. 418-20.
163. Van Remmen, H. and D.P. Jones, *Current thoughts on the role of mitochondria and free radicals in the biology of aging*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009. **64**(2): p. 171-4.
164. Bevilacqua, L., et al., *Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **286**(5): p. E852-61.
165. Ryan, M.J., et al., *Suppression of oxidative stress by resveratrol after isometric contractions in gastrocnemius muscles of aged mice*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010. **65**(8): p. 815-31.
166. Lass, A., et al., *Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **25**(9): p. 1089-97.
167. Vaquero, A., et al., *Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin*. *Mol Cell*, 2004. **16**(1): p. 93-105.
168. Yang, T. and A.A. Sauve, *NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity*. *AAPS J*, 2006. **8**(4): p. E632-43.
169. Vaquero, A., R. Sternglanz, and D. Reinberg, *NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs*. *Oncogene*, 2007. **26**(37): p. 5505-20.
170. Hansen, J.C., *Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002. **31**: p. 361-92.
171. Kuzmichev, A., et al., *Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3*. *Mol Cell*, 2004. **14**(2): p. 183-93.
172. Kuzmichev, A., et al., *Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(6): p. 1859-64.
173. Daujat, S., et al., *HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(45): p. 38090-5.
174. Nielsen, A.L., et al., *Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins*. *Mol Cell*, 2001. **7**(4): p. 729-39.
175. Trojer, P. and D. Reinberg, *Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?* *Mol Cell*, 2007. **28**(1): p. 1-13.
176. Vaquero, A., et al., *SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation*. *Nature*, 2007. **450**(7168): p. 440-4.
177. Vaquero, A., *The conserved role of sirtuins in chromatin regulation*. *Int J Dev Biol*, 2009. **53**(2-3): p. 303-22.
178. Yaffe, D. and O. Saxel, *Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle*. *Nature*, 1977. **270**(5639): p. 725-7.

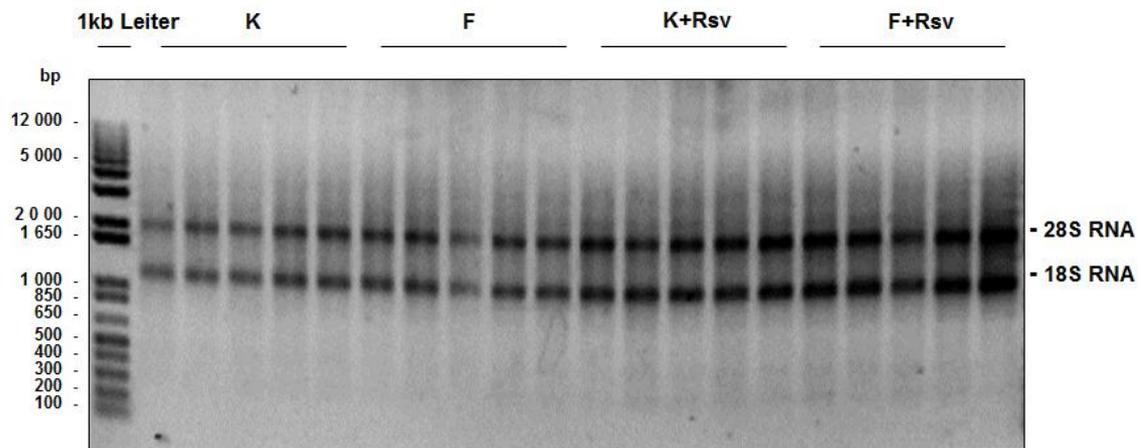
179. Blau, H.M., et al., *Plasticity of the differentiated state*. Science, 1985. **230**(4727): p. 758-66.
180. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
181. Kogan, S.C., M. Doherty, and J. Gitschier, *An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A*. N Engl J Med, 1987. **317**(16): p. 985-90.
182. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
183. 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.
184. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
185. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 313-22.
186. Ishii, T., et al., *Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16023-9.
187. McMahan, M., et al., *The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3299-307.
188. Ungvari, Z., et al., *Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): p. H18-24.
189. Kode, A., et al., *Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(3): p. L478-88.
190. Rubiolo, J.A. and F.V. Vega, *Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species*. Biomed Pharmacother, 2008. **62**(9): p. 606-12.
191. Kops, G.J., et al., *Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 316-21.
192. Furuyama, T., et al., *Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3, and 4 (FKHR, FKHL1, and AFX) in the rat skeletal muscles*. Microsc Res Tech, 2002. **59**(4): p. 331-4.
193. Nemoto, S., M.M. Fergusson, and T. Finkel, *Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2105-8.
194. Wang, X., et al., *The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 2): p. 291-300.

195. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
196. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 239-52.
197. Martindale, J.L. and N.J. Holbrook, *Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival*. J Cell Physiol, 2002. **192**(1): p. 1-15.
198. Shen, G., et al., *Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23052-60.
199. Owuor, E.D. and A.N. Kong, *Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 765-70.
200. Chaanine, A.H., et al., *JNK modulates FOXO3a for the expression of the mitochondrial death and mitophagy marker BNIP3 in pathological hypertrophy and in heart failure*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. 265.
201. Cucciolla, V., et al., *Resveratrol: from basic science to the clinic*. Cell Cycle, 2007. **6**(20): p. 2495-510.
202. Imai, S., et al., *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 795-800.
203. Grubisha, O., B.C. Smith, and J.M. Denu, *Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases*. FEBS J, 2005. **272**(18): p. 4607-16.
204. Lin, S.J., et al., *Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH*. Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 12-6.
205. Gledhill, J.R., et al., *Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13632-7.
206. Zheng, J. and V.D. Ramirez, *Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(5): p. 1115-23.
207. Barreiro, E., et al., *UCP3 overexpression neutralizes oxidative stress rather than nitrosative stress in mouse myotubes*. FEBS Lett, 2009. **583**(2): p. 350-6.
208. Walle, T., et al., *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1377-82.
209. Wenzel, E. and V. Somoza, *Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(5): p. 472-81.
210. Almeida, L., et al., *Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers*. Mol Nutr Food Res, 2009. **53 Suppl 1**: p. S7-15.
211. Boocock, D.J., et al., *Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(6): p. 1246-52.
212. Marier, J.F., et al., *Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(1): p. 369-73.

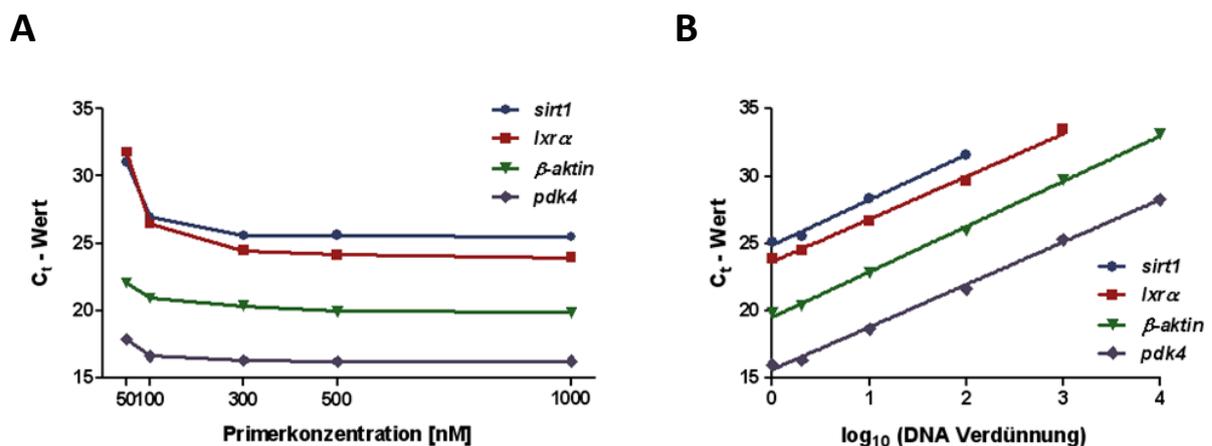
213. Meng, X., et al., *Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(4): p. 935-42.
214. Yu, C., et al., *Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol*. Pharm Res, 2002. **19**(12): p. 1907-14.
215. Asensi, M., et al., *Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(3): p. 387-98.
216. Juan, M.E., M.P. Vinardell, and J.M. Planas, *The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful*. J Nutr, 2002. **132**(2): p. 257-60.
217. Vitrac, X., et al., *Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration*. Life Sci, 2003. **72**(20): p. 2219-33.
218. Fremont, L., *Biological effects of resveratrol*. Life Sci, 2000. **66**(8): p. 663-73.
219. Andlauer, W., et al., *Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat*. Drugs Exp Clin Res, 2000. **26**(2): p. 47-55.
220. 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.
221. De Santi, C., et al., *Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum*. Xenobiotica, 2000. **30**(6): p. 609-17.
222. Wang, L.X., et al., *Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity*. J Pharm Sci, 2004. **93**(10): p. 2448-57.
223. 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.
224. De Santi, C., et al., *Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids*. Xenobiotica, 2000. **30**(9): p. 857-66.
225. de Santi, C., et al., *Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver*. Xenobiotica, 2000. **30**(11): p. 1047-54.
226. Matsumoto, H., et al., *Enhanced absorption of anthocyanins after oral administration of phytic acid in rats and humans*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(6): p. 2489-96.
227. Minor, R.K., et al., *SRT1720 improves survival and healthspan of obese mice*. Sci Rep, 2011. **1**: p. 70.
228. Rinnankoski-Tuikka, R., et al., *Effects of high-fat diet and physical activity on pyruvate dehydrogenase kinase-4 in mouse skeletal muscle*. Nutr Metab (Lond), 2012. **9**(1): p. 53.
229. Jeoung, N.H. and R.A. Harris, *Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(1): p. E46-54.
230. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.

- 
231. Bandyopadhyay, G.K., et al., *Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle*. *Diabetes*, 2005. **54**(8): p. 2351-9.
232. Todd, M.K., et al., *Thiazolidinediones enhance skeletal muscle triacylglycerol synthesis while protecting against fatty acid-induced inflammation and insulin resistance*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(2): p. E485-93.
233. Ghosh, H.S., *The anti-aging, metabolism potential of SIRT1*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008. **9**(10): p. 1095-102.
234. Long, L.H., M.V. Clement, and B. Halliwell, *Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **273**(1): p. 50-3.
235. Long, L.H., A. Hoi, and B. Halliwell, *Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media*. *Arch Biochem Biophys*, 2010. **501**(1): p. 162-9.
236. Halliwell, B., et al., *Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo?* *IUBMB Life*, 2000. **50**(4-5): p. 251-7.
237. Dulloo, A.G. and S. Samec, *Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered*. *Br J Nutr*, 2001. **86**(2): p. 123-39.
238. Fisler, J.S. and C.H. Warden, *Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome*. *Nutr Metab (Lond)*, 2006. **3**: p. 38.
239. Kase, E.T., et al., *Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway*. *Diabetes*, 2005. **54**(4): p. 1108-15.
240. Muscat, G.E., et al., *Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(43): p. 40722-8.
241. Verma, N.K., J. Singh, and C.S. Dey, *PPAR-gamma expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells*. *Br J Pharmacol*, 2004. **143**(8): p. 1006-13.
242. Pezzuto, J.M., *Plant-derived anticancer agents*. *Biochem Pharmacol*, 1997. **53**(2): p. 121-33.
243. Kumar, A. and S.S. Sharma, *NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **394**(2): p. 360-5.
244. 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.
245. 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.
246. de la Lastra, C.A. and I. Villegas, *Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications*. *Mol Nutr Food Res*, 2005. **49**(5): p. 405-30.

## 7 ANHANG



**Abbildung 29.** Aus dem Skelettmuskelgewebe extrahierte, im Agarosegel aufgetrennte RNA. Um die Integrität der RNA nach der Extraktion und Aufreinigung zu überprüfen, wurde diese im Agarosegel aufgetrennt. Zu sehen sind die 28 und 18 S RNA der Ribosomen, die in distinkten Banden erscheinen, also noch nicht abgebaut sind. Es kann somit von der Intaktheit des Transkriptoms der gezeigten Proben ausgegangen werden.



**Abbildung 30. A** Analyse der optimalen Primerkonzentration für die untersuchten Transkripte. Repräsentativ sind die  $C_t$ -Werte von *sirt1*, *Ixrα*,  $\beta$ -aktin und *pdk4* dargestellt. Je nach eingesetzter Menge an Primerpaaren variieren die  $C_t$ -Werte bei gleichem mRNA-Gehalt. Für alle untersuchten RNAs ergab sich eine Erniedrigung der Werte mit steigender Primerkonzentration bis zu 300 nM. Um eine optimale Amplifikation zu gewährleisten, sollte keine Limitierung des Prozesses durch eine zu geringe Primermenge stattfinden, noch sollten zu hohe Konzentrationen an Primern zu unspezifischen Amplifikationen führen. Für die untersuchten Transkripte ergab sich somit eine optimale Primerkonzentration von 300 nM. **B** Ein Primereffizienztest sollte Aufschluss über die Amplifikationseffizienz jeder mRNA liefern. Dafür wurden Verdünnungen der Transkripte über fünf Zehnerpotenzen analysiert. Repräsentativ sind die Ergebnisse für *sirt1*, *Ixrα*,  $\beta$ -aktin und *pdk4* dargestellt. Der Anstieg der ermittelten Geraden beträgt nahezu 3.32 ( $1/\log_{10}(2)$ ), was einer exakten Verdopplung der Nukleinsäuren pro Zyklus entspricht und damit eine optimale Analyse gewährleistet.

**Tabelle 4.** Ermittelte Primereffizienzen für aus dem Skelettmuskel von Mäusen isolierte RNA und DNA. Für jedes eingesetzte Primerpaar wurde deren Effizienz ermittelt, um eine korrekte Berechnung der Nukleinsäuremengen in der qPCR-Analyse zu erreichen. Die Effizienz wurde über den Anstieg der Verdünnungsreihen der Transkripte berechnet (siehe Abbildung 30B).

Primer	DNA-Vervielfachung/ Zyklus	Anstieg	Effizienz	Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup>
<i>sirt1</i>	2,047	3,214	102%	0,9927
<i>lxra</i>	2,053	3,201	103%	0,9947
<i>β-aktin</i>	1,976	3,381	99%	0,9978
<i>pdk4</i>	2,054	3,198	103%	0,9970
<i>ucp3</i>	1,932	3,497	97%	0,9895
<i>ppary</i>	2,282	2,791	114%	0,9917
<i>pgc1a</i>	2,102	3,099	105%	0,9948
<i>sod1</i>	2,011	3,297	101%	0,9968
<i>nrf2</i>	2,216	2,894	111%	0,9920
<i>foxo3a</i>	2,156	2,998	108%	0,9976
<i>mSIRT1_e4</i>	1,885	3,633	94%	0,9921
<i>mSIRT1_e5f</i>	2,104	3,095	105%	0,9890
<i>mSIRT1_e8b</i>	2,098	3,107	105%	0,9994
<i>mPPARG_e5b</i>	2,003	3,315	100%	0,9939
<i>mLXRA_e8</i>	1,625	4,745	81%	0,9976