

Antileishmanielle Aktivität und zytotoxisches Potential von Resveratrol

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ina Katharina Lucas

Berlin 2013

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2009 bis August 2013 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Herbert Kolodziej am Institut für Pharmazie an der Freien Universität Berlin. Die praktischen Arbeiten wurden in einer Kooperation mit dem Robert Koch-Institut, Berlin, durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Kolodziej

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. H. Pertz

Tag der Disputation: 18. Oktober 2013

Danksagung

Bei aller Freude über die Erlangung des Doktorgrades möchte ich nicht versäumen, mich bei einigen wichtigen Personen zu bedanken, die mich auf meinem Weg in den vergangenen Jahren begleitet haben.

Ich danke meinem Doktorvater Professor Herbert Kolodziej, der mir mit seinem umfassenden Fachwissen stets zur Seite stand und mir nicht zuletzt auch durch private Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde. Ebenso verdanke ich ihm die Möglichkeit, wichtige praktische Arbeiten meiner Forschung am Robert Koch-Institut in Berlin durchgeführt haben zu können.

Ich danke Dr. Albrecht Kiderlen sowie seinen Mitarbeiterinnen Elke Radam und Ulrike Laube vom Robert Koch-Institut in Berlin, die mir stets als Ansprechpartner dienten und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen und Anregungen, ihre konstruktive Kritik und ihre Hilfsbereitschaft bereicherten.

Ich danke meinen Kolleginnen und Freundinnen Juliane Hahn, Stefanie Marek, Nora Frohnecke und Aurica-Maria Kaufeld für den regen wissenschaftlichen Austausch und ihre Bereitschaft, mich auch in angespannter und gestresster Laune zu „ertragen“. Durch sie war mancher Rückschlag im Forschungsalltag zu verkraften.

Meiner Freundin Maria Zoschke danke ich für ihre fröhliche Art, ihr offenes Ohr und für die wunderbare Zeit, wenn es sich zur Abwechslung mal nicht um die Doktorarbeit drehte.

Besonders danke ich meinem Mann Max, der mir stets Mut zugesprochen und mich bestärkt hat. Hätte er mir nicht den Rücken freigehalten, wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Sein immerwährender Optimismus und sein pragmatisches Verständnis für Zusammenhänge motivierten mich sehr.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in vielerlei Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. Ohne sie wäre ich heute nicht der Mensch, der ich bin.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung	14
1.1 Resveratrol – ein Überblick	14
1.2 Resveratrol als Nahrungsergänzungsmittel	15
1.3 Resveratrol in der Medizin.....	16
1.4 Resveratrol als antileishmaniellles Agens.....	20
1.4.1 Die Leishmaniose – Verbreitung und Übertragungswege.....	20
1.4.2 Pathologie und Kontrolle der Leishmanien-Infektion.....	23
1.4.3 Therapeutische Ansätze	25
1.5 Zellinduzierte Abwehrmechanismen gegenüber Leishmanien	26
1.5.1 NO als mikrobizides Effektormolekül bei Infektionen.....	26
1.5.2 ROS in der zellulären Immunantwort.....	28
1.5.3 ROS und RNS in der Leishmanienabwehr	32
1.5.4 Einfluss von Resveratrol auf die zellinduzierte Immunabwehr	32
1.5.5 Einfluss von Resveratrol auf ROS und Apoptose	33
1.5.6 Rolle der Apoptose in Immunabwehr und Homöostase	34
1.6 Resveratrol im Krebsgeschehen	34
1.6.1 Apoptose.....	35
1.6.2 Abgrenzung zwischen Apoptose und Nekrose.....	36
1.6.3 Extrinsische und intrinsische Signalkaskade der Apoptose	37
1.6.4 Resveratrol und Apoptose	39
1.7 Zielsetzung der Arbeit	40
2. Material und Methoden	42
2.1 Geräte	42
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	44
2.3 Test- und Referenzsubstanzen.....	46

2.4	Materialien in der Zellkultur	47
2.5	Versuchstiere, eukaryotische Zellen und Parasiten.....	47
2.5.1	C57BL/6 Wildtyp-Mäuse.....	47
2.5.2	J774-G8-Makrophagen Zelllinie	48
2.5.3	L929(CSF)-Zellen	48
2.5.4	A549-Zellen	48
2.5.5	Caco-2-Zellen	48
2.5.6	BMM Φ -Makrophagen aus murinem Knochenmark.....	49
2.5.7	Leishmanien.....	49
2.6	Kulturmedien	51
2.7	Wasser und Puffer	53
2.8	Lösungen.....	54
2.9	Stabilitätsuntersuchungen.....	57
2.9.1	HPLC-Untersuchungen.....	57
2.9.2	Massenspektrometrische Untersuchungen von Resveratrol	57
2.10	Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff.....	58
2.11	Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff	58
2.12	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	59
2.13	Makrophagen-Infektion mit <i>Leishmania major</i> -GFP	60
2.14	Zytotoxizitäts-Assays	61
2.14.1	MTT-Assay	61
2.14.2	Kristallviolett-Assay	61
2.15	Durchflusszytometrie (FACS).....	62
2.15.1	Lebend-Tot-Diskriminierung von Makrophagen.....	63
2.15.2	Lebend-Tot-Diskriminierung von <i>Leishmania major</i> -GFP	63
2.15.3	Nachweis von <i>Leishmania major</i> -GFP in infizierten Makrophagen.....	64
2.16	Bestimmung der Nitritkonzentration (Griess Assay).....	65
2.16.1	NO-Modulation durch Resveratrol	65
2.16.2	Kinetik der NO-Freisetzung in Caco-2-Zellen	66
2.17	Antioxidative Aktivität von Resveratrol im zellfreien Versuch.....	66
2.17.1	DPPH-Assay	66
2.17.2	SNP-Assay	67

2.18 Caspase 3- und Caspase 8-Enzymaktivität in A549-Zellen	67
2.19 Histologische und zytologische Untersuchungen	68
2.19.1 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd (PFA)	68
2.19.2 Herstellung von Zytospinpräparaten aus Zellsuspensionen	68
2.19.3 Herstellung von Deckgläschenpräparaten	69
2.19.4 Anfärbung von Deckgläschenpräparaten.....	69
2.20 Mikroskopie und fotografische Dokumentation von Zellpräparaten	71
2.21 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies	72
2.21.1 Mikroskopische Untersuchung zur ROS-Bildung.....	72
2.21.2 Durchflusszytometrische Untersuchung zur ROS-Bildung.....	72
2.22 Blockade der Atmungskette am Komplex I im Mitochondrium	73
2.23 Western Blot-Analyse	74
2.23.1 Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels BCA-Methode	74
2.23.2 Zellysat-Herstellung für iNOS-Expression	75
2.23.3 Zellysat-Herstellung für Caspase 3-Expression	75
2.23.4 Probenvorbereitung für Gelelektrophorese	76
2.23.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	76
2.23.6 Nachweis fixierter Proteine auf Nitrocellulose-Membranen.....	77
2.23.7 Ablösen von Antikörpern von Nitrocellulose-Membranen.....	78
2.24 Nachweis von Mycoplasma-Kontamination in Zelllinien.....	79
2.25 Statistik	80
3. Ergebnisse.....	81
3.1 Stabilität von <i>trans</i> -Resveratrol in Lösung.....	81
3.1.1 Verfärbung von Resveratrol in Lösung nach UV-Licht-Bestrahlung ..	81
3.1.2 HPLC-Untersuchung von <i>trans</i> -Resveratrol-Stocklösungen	82
3.1.3 Strukturanalyse der bestrahlten Resveratrol-Lösungen.....	86
3.2 Leishmanien und Infektion von Makrophagen	88
3.2.1 <i>In vitro</i> -Studien zur antileishmaniellen Aktivität von Resveratrol	89
3.2.2 Transfektion und Morphologie von <i>Leishmania major</i> -Parasiten.....	90
3.3 Antileishmaniellles Potential von Resveratrol	92
3.3.1 Aufbau und Prinzip der Durchflusszytometrie.....	92
3.3.2 FACS-Analyse promastigoter <i>Leishmania major</i> -GFP.....	93
3.3.3 FACS-Analyse infizierter BMM Φ	94

3.4	Zytotoxisches Potential von Resveratrol bei BMM Φ	96
3.4.1	Bestimmung der Zellviabilität via MTT-Assay.....	96
3.4.2	Bestimmung der Zellviabilität via FACS-Assay	98
3.4.3	Mikroskopische Untersuchung der Zellviabilität	99
3.5	Antileishmanielles und zytotoxisches Potential von Resveratrol bei J774-G8....	101
3.5.1	Bestimmung der Zellviabilität via MTT-Assay.....	101
3.5.2	FACS-Bestimmung infizierter und nicht-infizierter J774-G8.....	102
3.5.3	Mikroskopische Untersuchung der Zellviabilität	104
3.5.4	Selektivitätsindex (SI)	105
3.6	Nachweis der NO-Bildung in Makrophagen	105
3.6.1	NO-Scavenging-Aktivität von Resveratrol im zellfreien System.....	106
3.6.2	NO-Scavenging-Aktivität von Resveratrol im zellbasierten System.....	107
3.6.3	NO-Bildung bei Vorinkubation mit Resveratrol	110
3.6.4	Einfluss von Resveratrol auf die iNOS-Expression.....	112
3.7	Zytotoxizität von Resveratrol auf Fibroblastenzelllinie L929(CSF)	113
3.8	Antioxidative Effekte von Resveratrol: DPPH-Assay	115
3.8.1	Prinzip des DPPH-Assays.....	116
3.8.2	DPPH-Radikal-Scavenging von Resveratrol.....	117
3.8.3	Ergebnisse des DPPH-Assays.....	118
3.9	Zytotoxisches und pro-apoptotisches Potential von Resveratrol.....	119
3.9.1	Apoptose-Induktion in J774-G8-Makrophagen	119
3.10	Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur ROS-Bildung	123
3.10.1	Prinzip der ROS-Färbung mit H ₂ -DCF-DA	123
3.10.2	ROS-Bildung in J774-G8-Makrophagen.....	124
3.10.3	ROS-Bildung in A549-Zellen	127
3.11	Durchflusszytometrische Untersuchung zur ROS-Bildung	131
3.11.1	Titration des Farbstoffs H ₂ -DCF-DA im FACS-Gerät BD™ LSR II	131
3.11.2	ROS-Bildung in A549-Zellen durch Resveratrol	132
3.12	Apoptose-Induktion in A549-Zellen	133
3.13	Zytotoxizität von Resveratrol in A549-Zellen (MTT-Test).....	137
3.14	Caspase-Induktion in A549-Zellen durch Resveratrol	137
3.14.1	Caspase 3-Aktivierung (Kolorimetrie).....	137
3.14.2	Caspase 8-Aktivierung (Kolorimetrie).....	139

3.14.3 Caspase 3-Aktivierung (Western Blot).....	141
3.15 Resveratrol im intrinsischen Apoptose-Signalweg.....	142
3.15.1 Toxizität von Rotenon auf A549-Zellen und J774-G8-Makrophagen....	144
3.15.2 Resveratrol-induzierte ROS-Bildung in Gegenwart von Rotenon (I).....	144
3.15.3 Resveratrol-induzierte ROS-Bildung in Gegenwart von Rotenon (II) ...	148
3.16 Exkurs: Caco-2-Zellen.....	152
3.16.1 NO-Modulation in Caco-2-Zellen durch Resveratrol	152
3.16.2 Nachweis der Differenzierung der Caco-2-Zellen	154
4. Diskussion.....	156
4.1 Resveratrol: Korrelation von Aktivität und zytotoxischem Potential	158
4.2 Sicherheit von Resveratrol.....	163
4.2.1 Bioverfügbarkeit von Resveratrol.....	165
4.3 Nahrungsergänzung mit Resveratrol.....	169
4.4 Einfluss von Resveratrol auf NO- bzw. ROS-Bildung in Makrophagen...	171
4.4.1 Einfluss auf die induzierbare NO-Synthase und NO-Produktion.....	171
4.4.2 Einfluss auf die ROS-Bildung.....	174
4.5 Einfluss auf die Apoptose-Induktion <i>in vitro</i>	176
4.5.1 ROS-Bildung in A549-Zellen nach Blockade der Atmungskette.....	178
4.5.2 ROS-Bildung in Makrophagen nach Blockade der Atmungskette	179
4.6 Resveratrol und Krebs: <i>in vivo</i> -Studien	181
4.7 Resveratrol und Anti-Aging	181
4.8 Fazit und Ausblick.....	182
5. Zusammenfassung.....	184
6. Summary.....	188
7. Literaturverzeichnis.....	191
8. Publikationsverzeichnis	212
9. Anhang.....	213
10. Selbstständigkeitserklärung.....	214

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Übertragungszyklus der <i>Leishmania</i> -Parasiten.....	21
Abb. 1-2: Klinisches Erscheinungsbild der Leishmaniose	22
Abb. 1-3: Weltweite Ausbreitung der viszeralen Leishmaniose.....	23
Abb. 1-4: Immunantwort in <i>Leishmania</i> -infizierten Makrophagen.....	24
Abb. 1-5: Aktivierungsprozesse zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.....	29
Abb. 1-6: Komponenten der mitochondrialen Atmungskette	31
Abb. 1-7: Caspase-abhängige Apoptose.....	38
Abb. 2-1: Berechnung der Zellzahl in einer Suspension	60
Abb. 3-1: Umwandlung von <i>trans</i> - zu <i>cis</i> -Resveratrol.....	81
Abb. 3-2: HPLC-Chromatogramme von <i>trans</i> -Resveratrol in MeOH.....	85
Abb. 3-3: ESI-Massenspektrum von <i>trans</i> -Resveratrol.....	86
Abb. 3-4: Massenspektrum des 3,4',5-Trihydroxydiphenylacetylen.....	87
Abb. 3-5: Chemische Struktur von 3,4',5-Trihydroxydiphenylacetylen.....	88
Abb. 3-6: Zytospinpräparate von <i>L. major</i> -GFP	91
Abb. 3-7: Zytospinpräparate von infizierten BMM Φ	92
Abb. 3-8: Schematische Darstellung eines FACSCalibur™.....	93
Abb. 3-9: Antileishmanieller Effekt von Resveratrol auf <i>L. major</i> -GFP	94
Abb. 3-10: Antileishmanielle Aktivität von Resveratrol bei infizierten BMM Φ	95
Abb. 3-11: Nachweis der Zellvitalität via MTT-Test	97
Abb. 3-12: Abnahme der Zellviabilität bei BMM Φ	98
Abb. 3-13: Zytotoxische Wirkung von Resveratrol auf nicht-infizierte BMM Φ	99
Abb. 3-14: Veränderungen der Zellmorphologie von BMM Φ	100
Abb. 3-15: Reduktion der Zellviabilität (MTT-Assay).....	102
Abb. 3-16: FACS-Untersuchung von J774-G8 nach Resveratrol-Exposition.....	103
Abb. 3-17: Induktion von Apoptose in J774-G8-Makrophagen	104
Abb. 3-18: Griess-Reaktion zur Bestimmung von Nitrit.....	106
Abb. 3-19: NO-Scavenging Effekt von Resveratrol (Griess-Assay).....	107
Abb. 3-20: Kinetik der NO-Bildung in J774-G8-Makrophagen.....	108
Abb. 3-21: NO-Bildung von Resveratrol bei J774-G8-Makrophagen.....	109
Abb. 3-22: NO-Scavenging von Resveratrol bei J774-G8-Makrophagen.....	110
Abb. 3-23: Abnahme der Nitritspiegel im Zellkulturüberstand	111
Abb. 3-24: Effekt von Resveratrol auf die iNOS-Expression.....	112
Abb. 3-25: Toxizität von Resveratrol auf die Fibroblastenzelllinie L929(CSF)	114
Abb. 3-26: Reduktion des DPPH-Radikals durch Antioxidantien (RH).....	116

Abb. 3-27: Mechanismus des DPPH-Radikal-Scavengings von Resveratrol.....	117
Abb. 3-28: Frühe Apoptose bei J774-G8-Makrophagen (Kontrollen).....	121
Abb. 3-29: Frühe Apoptose bei J774-G8-Makrophagen (Resveratrol)	122
Abb. 3-30: Prinzip der ROS-Färbung	124
Abb. 3-31: ROS-Induktion in J774-G8-Makrophagen (Kontrollen).....	125
Abb. 3-32: ROS-Induktion in J774-G8-Makrophagen (Resveratrol).....	127
Abb. 3-33: ROS-Induktion in A549-Zellen (Kontrollen)	128
Abb. 3-34: ROS-Bildung in A549-Zellen (Resveratrol).....	130
Abb. 3-35: Titration des H ₂ -DCF-DA im FACS BD™ LSR II.....	131
Abb. 3-36: ROS-Bildung durch Camptothecin und Resveratrol.....	132
Abb. 3-37: ROS-Bildung in A549-Zellen.....	133
Abb. 3-38: Apoptose-Induktion in A549-Zellen (Kontrollen)	135
Abb. 3-39: Apoptose-Induktion in A549-Zellen (Resveratrol).....	136
Abb. 3-40: Abnahme der Zellviabilität in A549-Zellen	137
Abb. 3-41: Caspase 3-Aktivität in A549-Zellen	138
Abb. 3-42: Caspase 8-Aktivität in A549-Zellen	140
Abb. 3-43: Proteinexpression für Caspase 3 und Cleaved-Caspase 3.....	141
Abb. 3-44: Expressionsmuster der Caspase 3 und der Cleaved-Caspase 3.....	142
Abb. 3-45: Einfluss von Rotenon auf die Zellviabilität	144
Abb. 3-46: Übersicht ROS-Produktion in A549-Zellen.....	146
Abb. 3-47: Übersicht Apoptose-Induktion in A549-Zellen.....	147
Abb. 3-48: Übersicht ROS-Produktion in J774-G8-Makrophagen	150
Abb. 3-49: Übersicht Apoptose-Induktion in J774-G8-Makrophagen	151
Abb. 3-50: Nitritproduktion in stimulierten Caco-2-Zellen.....	153
Abb. 3-51: Nachweis der Differenzierung von Caco-2-Zellen	155
Abb. 4-1: Metabolisierung von Resveratrol	166

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Biologische Aktivitäten von Resveratrol - Teil 1.....	18
Tab. 1-2: Biologische Aktivitäten von Resveratrol - Teil 2.....	19
Tab. 1-3: Therapieoptionen für die kutane Leishmaniose in der Alten Welt.....	26
Tab. 1-4: Vertreter von ROS und RNS	29
Tab. 2-1: Auflistung der verwendeten Geräte	42
Tab. 2-2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	44
Tab. 2-3: Auflistung der verwendeten Test- und Referenzsubstanzen	46
Tab. 2-4: Auflistung der verwendeten Zellkulturmaterialien.....	47
Tab. 2-5: Bedingungen der HPLC-Analyse für Resveratrol	57
Tab. 2-6: Antikörper und Inkubationslösungen.....	78
Tab. 3-1: Verfärbung von <i>trans</i> -Resveratrol in Lösung	82
Tab. 3-2: Bestrahlung einer Lösung von <i>trans</i> -Resveratrol in MeOH	83
Tab. 3-3: Bestrahlung einer Lösung von <i>trans</i> -Resveratrol in DMSO	84
Tab. 3-4: Lagerung und Handhabung von <i>trans</i> -Resveratrol in Lösung.....	88
Tab. 3-5: <i>In vitro</i> -Assays zum Nachweis antioxidativer Eigenschaften.....	115
Tab. 3-6: Übersicht der IC ₅₀ -Werte aus dem DPPH-Assay	118
Tab. 3-7: Korrelation zwischen Vitalitätsstadium und Fluoreszenzsignal.....	120
Tab. 4-1: Bioverfügbarkeit von Resveratrol	168

Abkürzungsverzeichnis

A549	humane Lungenkarzinomzelllinie
Balb BMM Φ	B: Halsey J. Bagg, alb: albino bone marrow derived macrophages (Knochenmarkkulturmakrophagen)
C COX C57Bl/6	Camptothecin Cyclooxygenase C: Clarence C. Little, bl: black
DCs DEVD-pNA	Dendritische Zellen Ac-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (Substratsequenz an p-Nitroanilin gebunden)
DMSO DPPH DSMZ	Dimethylsulfoxid 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ER	Estrogen-Rezeptor
FACS FITC FKS FSC	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie) Fluoresceinisothiocyanat fötales Kälberserum forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g GFP	relative Zentrifugalbeschleunigung grün fluoreszierendes Protein
h HEK HEPES	Stunde humane den TLR-2 exprimierende HEK 293 Zelllinie Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
IL-1 β IL-4 IL-6 IL-10 iNO iNOS	Interleukin-1 β Interleukin-4 Interleukin-6 Interleukin-10 induzierbares Stickstoffmonoxid induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
J774-G8	murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie
Ktrl	Kontrolle
<i>L. major</i> L-NMMA LM LPS	<i>Leishmania major</i> L-N ^G -monomethylarginin Lösungsmittel Lipopolysaccharid

LOX	Lipoxygenase
min	Minute
MP	Magermilchpulver
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid
NAC	N-Acetylcystein
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid-Radikal
NOX	NADPH-Oxidase
ODC	Ornithin-Decarboxylase
OPC	oligomere Proanthocyanidine
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
p53	Protein p53 (Regulation von DNA-Reparatur u.a.)
q.s.	quantum satis
<i>r</i> IFN- γ	murines rekombinantes Interferon gamma
<i>r</i> IFN- γ (hu)	humanes rekombinantes Interferon gamma
RKI	Robert Koch-Institut, Berlin
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SNP	Nitroprussid-Natrium (Sodium nitroprusside)
SOD	Superoxiddismutase
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
STS	Staurosporin
TLR-2	Toll-like-Rezeptor 2
TNF- α	Tumornekrose-Faktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U/mL	units/milliliter (Einheiten/Milliliter)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZVZ	Zentrale Versuchstierzucht
1x	einfach konzentriert
5x	fünffach konzentriert
10x	zehnfach konzentriert

1. Einleitung

Seit Anfang der 1990er Jahre wurde eine Vielzahl von sekundären Pflanzenstoffen isoliert und charakterisiert, die positive Wirkungen auf den Gesundheitszustand des Menschen zeigen. So gehören beispielsweise Carotinoide und Flavonoide mit ihren antioxidativen Effekten, Catechine mit ihren spezifisch chemopräventiven Eigenschaften oder Isoflavone mit ihrem Einfluss auf den Hormon-Haushalt zum Portfolio gesundheitsfördernder Naturstoffe (Kleine-Gunk, 2006). Ein weiterer sekundärer Pflanzenstoff, der aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen vor allem in den letzten zwanzig Jahren für großes Interesse gesorgt hat, ist Resveratrol. Das Stilbenderivat besitzt antioxidative, antiinflammatorische, antikarzinogene und antidiabetische Wirkungen. Zudem ist es eine der wenigen Substanzen, für die eine Verlängerung der Lebensdauer bestimmter Organismen (z. B. Fadenwürmer, Hefen, Mäuse) *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Dieser positive Einfluss auf Prozesse der Alterung erweckte die Hoffnung, auch beim Menschen mit Resveratrol ähnliche „Anti-Aging“-Effekte zu erreichen. Viele der Effekte und Wirkungen sind jedoch noch größtenteils unverstanden: Signalwege und Mechanismen weisen eine hohe Komplexität auf und sind von verschiedenen Faktoren und Steuerungen abhängig. Nur selten aber wurden für eine Substanz in kurzer Zeit so vielfältige positive Wirkungen auf die Gesundheit des Menschen beschrieben wie für Resveratrol.

1.1 Resveratrol – ein Überblick

Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-*trans*-stilben) wurde erstmals im Jahr 1940 aus den Wurzeln der weißen Nieswurz (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil., Melanthiaceae) isoliert. 1963 gelang die Isolierung aus den Wurzeln des japanischen Staudenknöterichs (*Polygonum cuspidatum* (Houtt.) Ronse Decr., Polygonaceae), einer Pflanze, die in der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin gegen entzündliche Erkrankungen, Hepatitis und Diarrhöe Anwendung findet (Takaoka, 1940, Sukala, 2005).

Resveratrol kommt als sekundärer Pflanzeninhaltsstoff auch in einigen Nahrungsmitteln vor, wie zum Beispiel in Maulbeeren und Erdnüssen. Der höchste Gehalt an *trans*-Resveratrol ist in der Weintraubenhülse zu finden. Während Weißwein nur sehr geringe Mengen an Resveratrol enthält, findet man in Rotwein höhere Gehalte von *cis*- und *trans*-Resveratrol, was mit der Dauer der

Fermentation und der Extraktion aus den Schalen zusammenhängt (Schmandke, 2002).

Die Substanz zählt zu den sogenannten Phytoalexinen (Langcake und Pryce, 1977) und ist folglich ein Stressmetabolit, dessen Biosynthese bei UV-Strahlung, Mikrobenbefall und Gewebezerstörung (z. B. durch Herbivore) sowie bei Ozoneinwirkung induziert wird. In einer Untersuchung aus dem Jahr 1991 konnte nach Stressinduktion mit UV-Bestrahlung gezeigt werden, dass die Resveratrol-Biosynthese in der Weintraubenhülse zum Schutz vor Pilzbefall durch *Botrytis cinerea* verstärkt angeregt wird. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Produktion und Menge an Resveratrol in der Pflanze bis zur Traubenreife - also mit zunehmender Glukosekonzentration - abnimmt (Jeandet *et al.*, 1991).

Biogenetisch entsteht Resveratrol in der Pflanze mithilfe der Stilben-Synthase aus 4-Coumaryl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA (Rupprich und Kindl, 1978, Austin *et al.*, 2004). Diesem mit der Ernährung leicht zugänglichen, diätetischen Phytopharmakon wird eine Vielzahl gesundheitsfördernder Wirkungen zugeschrieben (Baur und Sinclair, 2006).

Um die Lesbarkeit zu verbessern, wird *trans*-Resveratrol im Folgenden nur als Resveratrol bezeichnet. Sind Derivate oder das Stereoisomere gemeint, werden sie explizit benannt. Eine Ausnahme bildet der Abschnitt zu den Stabilitätsuntersuchungen von Resveratrol (vgl. Abschnitt 3.1).

1.2 Resveratrol als Nahrungsergänzungsmittel

Resveratrol ist neben einigen anderen Polyphenolen seit einiger Zeit als Nahrungsergänzungsmittel erhältlich. Neben Monopräparaten wie Resol® (125 mg pro Kapsel) und resVida® (50 mg pro Weichkapsel) gibt es diverse Kombinationspräparate, in denen Resveratrol im Komplex, z. B. mit OPC und Vitamin B1 und anderen Zusätzen, wie Zink oder Vitamin C, angeboten wird. Dabei variieren die Zusammensetzungen und Resveratrol-Konzentrationen innerhalb der Präparatepalette beträchtlich.

Nahrungsergänzungsmittel sind nach der Europäischen Richtlinie 2002/46 als „Konzentrate von Nährstoffen oder anderer Substanzen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung“ definiert, die „alleine oder in Kombination, welche die normale Nahrung ergänzen sollen und in dosierter Form (Kapseln, Tabletten, Pulverbeutel, usw.) vermarktet werden“ können. Im Zuge neuerer EU-Gesetzgebung (EG Verordnung Nr. 1924/2006 Health Claims)

darf für die gesundheitliche Wirkung von Lebensmitteln und damit auch von Nahrungsergänzungsmitteln jedoch nicht bzw. nur noch sehr eingeschränkt geworben werden. Im Sinne des Verbraucherschutzes sollen damit falsche Produktaussagen (zu Nährwertangaben oder gesundheitsbezogenen Hinweisen) und irreführende Werbung verhindert werden. In Deutschland unterliegen die Nahrungsergänzungsmittel einer Anzeigepflicht beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Der Umgang, das Inverkehrbringen sowie ihre Kennzeichnung werden in der Verordnung über Nahrungsergänzungsmittel (NemV) gesetzlich geregelt.

Bei aller Euphorie über die positiven Eigenschaften von Resveratrol zeigen zahlreiche Studien von pharmazeutischen Unternehmen aus den letzten drei Jahren (u. a. Pfizer und Amgen), dass *in vitro* nachgewiesene positive und protektive Effekte von Resveratrol und anderen Polyphenolen nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragen werden können. Fehlende Angaben über tolerierbare tägliche Aufnahmemengen lassen Verbraucher und Patienten zudem im Unklaren. Außerdem sind die unabsehbaren Folgen bei Überdosierungen oder bei falscher Anwendung ein Risikofaktor. Ob für Mono- bzw. Kombinationspräparate mit Resveratrol weitere negative Wirkungen *in vivo* zu erwarten sind, ist bisher nicht klar zu beantworten. Unerwünschte Effekte bei einer Überdosierung sind jedenfalls nicht sicher auszuschließen.

1.3 Resveratrol in der Medizin

Eine Auswertung epidemiologischer Studien aus den 1990er Jahren in Frankreich beschreibt einen beachtlichen Effekt. Demnach gibt es bei Franzosen eine relativ niedrige Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z. B. der koronaren Herzkrankheit (KHK). Obwohl Franzosen sich den Studien zufolge fettreich ernähren, lag die Herzinfarkttrate in Frankreich ca. 30-40% niedriger als in anderen Industrie-Nationen (Renaud und Lorgeril, 1992). Als Grund für dieses als „Französisches Paradoxon“ bekannt gewordene Phänomen glaubte man, einen hohen Rotweinkonsum unter Franzosen verantwortlich machen zu können (Richard 1987). Die Annahme, dass insbesondere die im Rotwein in hoher Konzentration vorliegenden Polyphenole, einschließlich Resveratrol, kardioprotektiv wirken, war Anlass für zahlreiche Studien auf der ganzen Welt, die sich mit den vielversprechenden Wirkungen des Moleküls beschäftigten.

Doch nicht nur kardioprotektive Effekte, sondern eine ganze Reihe gesundheitsfördernder Eigenschaften und Wirkungen wurde Resveratrol im

Laufe der Jahre zugeschrieben (siehe **Tab. 1-1 und 1-2**). Demnach weist das Hydroxystilbenderivat sowohl *in vitro* also auch *in vivo* tumorsuppressive, neuro- und kardioprotektive, sowie antiinflammatorische Eigenschaften auf (Wallerath *et al.*, 2002, Ulrich *et al.*, 2005, Gatson *et al.*, 2013). Resveratrol besitzt eine inhibitorische Wirkung auf alle drei Stadien der Karzinogenese – Initiation, Promotion und Progression (Jang *et al.*, 1997) –, eine antiinflammatorische Wirkung mit direkter Inhibition der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) (Tsai *et al.*, 1999) und eine antioxidative Wirksamkeit gegen reaktive Sauerstoffspezies (Leonard *et al.*, 2003). Resveratrol zeigt zudem *in vitro* eine leishmanizide Wirkung gegen promastigote und intrazellulär amastigote Parasiten (Kedzierski *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit sollen vor allem die Wirkung von Resveratrol gegenüber Leishmanien-infizierten Makrophagen, die antioxidative Kapazität und die proapoptische Wirkung des Hydroxystilbens auf Krebszellen untersucht werden.

In **Tab. 1-1 und 1-2** sind die verschiedenen Effekte zusammengefasst, die durch Resveratrol ausgelöst oder vermittelt werden können. Die drei wesentlichen Reviews von Bhat *et al.* (2001a), Baur und Sinclair (2006) und Nakata *et al.* (2012) sind um weitere aktuelle Informationen ergänzt worden. Die biologischen Aktivitäten von Resveratrol sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufgrund der Vielfältigkeit der Effekte von großem Interesse.

Tab. 1-1: Biologische Aktivitäten von Resveratrol - Teil 1

Effekt	<i>In vitro</i>	Referenz	<i>In vivo</i>	Referenz
Antiinfektives Potential	Antileishmanielle Aktivität	Kedzierski et al., 2007	Antimikrobielle Substanz (Phytoalexin)	Langcake und Price, 1977
	Antimikrobielle Aktivität gegen Hefen und Essigsäurebakterien	Pastorkova et al., 2013		
Einfluss auf metabolische Schlüsselenzyme wie COX, LOX und ODC	Inhibition des Arachidonsäure-Metabolismus durch Interaktion mit 5-LOX und COX in Leukozyten	Kimura et al., 1995	Beeinflussung des COX/LOX-Verhältnisses im gesunden Menschen	Pace-Asciak et al., 1996
	Inhibition der COX-2-Transkription und -Aktivität	Subbaramaiah et al., 1998	Inhibition der ODC- und COX-Aktivität in Mäusen	Khanduja et al., 2004
Chemoprävention und krebstherapeutisches Potential	Induktion von Apoptose: CD95/CD95L-abhängig in HL-60-Zellen	Surh et al., 1999	Reduktion des metastasierenden Wachstums von Lungenkrebs in Mäusen	Busquets et al., 2007
	Induktion von Apoptose: CD95/CD95L-unabhängig in lymphatischer Leukämie-Zelllinie	Tsan et al., 2000		
	Hemmung der Aktivierung von NFκB in humanen Keratinozyten nach Einwirken von UV-B-Strahlung	Adhami et al., 2003		
Anti-Aging	Aktivierung von Sirtuin-Deacetylasen und Lebensverlängerung von <i>S. Cerevisiae</i>	Howitz et al., 2003	Verlängerung der Lebensdauer und Verzögerung der Neurodegeneration bei Wirbeltieren (ohne Beteiligung von Sirtuinen)	Valenzano et al., 2006
	Sirt1-Aktivierung ist substratsequenz-selektiv	Lakshminarasimhan et al., 2013		

Tab. 1-2: Biologische Aktivitäten von Resveratrol - Teil 2

Effekt	<i>In vitro</i>	Referenz	<i>In vivo</i>	Referenz
Antioxidative Eigenschaften	Radikalfänger-Eigenschaften:	Burkitt and Duncan, 2000¹	Erhöhung der antioxidativen Gesamtkapazität im Plasma ¹ und Erniedrigung der Lipidperoxidation ² in Ratten	Wenzel et al., 2005¹ Miura et al., 2003²
	Hydroxyl-Radikal ¹	Leonard et al., 2003²		
	ROS ²	Sueishi und Hori, 2013³		
	NO-Radikal ³	Tadolini et al., 2000⁴		
Estrogenrezeptor-Modulation	ER-Antagonismus	Gehm et al., 1997	ER-Modulation in hypertensiven Ratten	Mizutani et al., 2000
	konzentrationsabhängige estrogen- und antiestrogene Wirkung	Basly et al., 2000 Yoon et al., 2000	keine estrogenen Effekte in Ratten bei subkutaner Applikation	Ashby et al., 1999
	gemischter ER-Agonismus und Antagonismus	Bowers et al., 2000		
Kardioprotektive Effekte	Vasorelaxation an isolierten menschlichen Vena saphena- und Brustwandarterienringen	Rakici et al., 2005	Verbesserung der Serumcholesterol- und Triglyzeridspiegel im menschlichen Plasma	Frankel et al., 1993 Zern et al., 2003
	schnelle Erhöhung der NO-Produktion in humanen ¹ und Rinder-Endothelzellen ²	Wallerath et al., 2002¹ Wang et al., 2011²		
Weitere Effekte	pro-oxidative Eigenschaften (oxidative DNA-Strangbrüche in Gegenwart von Metallionen, z. B. Kupfer)	de la Lastra und Villegas, 2007	dosisabhängige Antinozizeption in Ratten durch COX-Hemmung ¹ und Aktivierung von Kaliumkanälen ²	Torres-López et al., 2002¹ ; Granados-Soto et al., 2002²

1.4 Resveratrol als antileishmaniellles Agens

Eine der in **Tab. 1-1** aufgeführten Eigenschaften von Resveratrol ist seine Einsatzmöglichkeit im Bereich von Infektionskrankheiten. Resveratrol besitzt neben einer antimikrobiellen Aktivität, z. B. gegen Hefen und Essigsäurebakterien (Pastorkova *et al.*, 2013), auch eine Wirkung gegen Parasiten der Gattung *Leishmania* (Kedzierski *et al.*, 2007). Das durch diese Protozoen ausgelöste Krankheitsbild wird als Leishmaniose bezeichnet. Lange Zeit war die Erkrankung auf tropische Gebiete begrenzt. Wegen des Klimawandels und der damit einhergehenden Erderwärmung breitet sich die Leishmaniose jedoch zusehends auch in andere Länder jenseits der Tropen aus. Auch die Globalisierung des Tier- und Warenhandels ist ein weiterer Faktor für die Ausbreitung von Parasiten und deren Reservoir-Wirten. Im Folgenden werden die Verbreitung, die möglichen Übertragungswege, die Manifestation der Krankheit und die therapeutischen Ansätze näher beschrieben.

1.4.1 Die Leishmaniose – Verbreitung und Übertragungswege

Die Leishmaniose ist eine Infektionskrankheit, die vor allem in tropischen Regionen weit verbreitet ist. Auch in subtropischen und gemäßigten Gebieten, wie z. B. dem Mittelmeerraum und Asien, steigt die Zahl der Erkrankungen zunehmend an. Mittlerweile sind nach einem Bericht der WHO mehr als 90 Länder von der endemischen Ausbreitung betroffen (WHO, 2010). Die Leishmaniose zählt der WHO-Definition zufolge zu den Zoonosen. Diese Infektionen und Krankheiten werden auf natürlichem Wege auf den Menschen und auf Wirbeltiere übertragen. Die Leishmaniosen können in zwei Kategorien unterteilt werden: die zoonotische Leishmaniose, in der die Reservoir-Wirte wilde Tiere, Kommensalen oder Haustiere sind (v. a. Hunde und Schafe) sowie die anthroponotische Leishmaniose, die den Menschen als Reservoir-Wirt klassifiziert. Zur Übertragung der *Leishmania*-Protozoen auf Mensch oder Tier dienen Vektoren aus den Familien der Sand- bzw. Schmetterlingsmücken (Alte Welt, i.e. Europa, Afrika, Asien: aus der Gattung *Phlebotomus*; Neue Welt, i.e. Zentral- und Südamerika: aus der Gattung *Lutzomyia*). Neben ihrer Vektorfunktion für Leishmanien fungieren Sandmücken als Hauptüberträger für das Bakterium *Bartonella bacilliformis* (Oroya-Fieber, Peru-Warzen) und für eine Virusinfektion, das Phlebotomusfieber.

Abb. 1-1 zeigt den Übertragungsweg und die Vermehrung der *Leishmania*-Parasiten durch den Biss der Sandmücke.

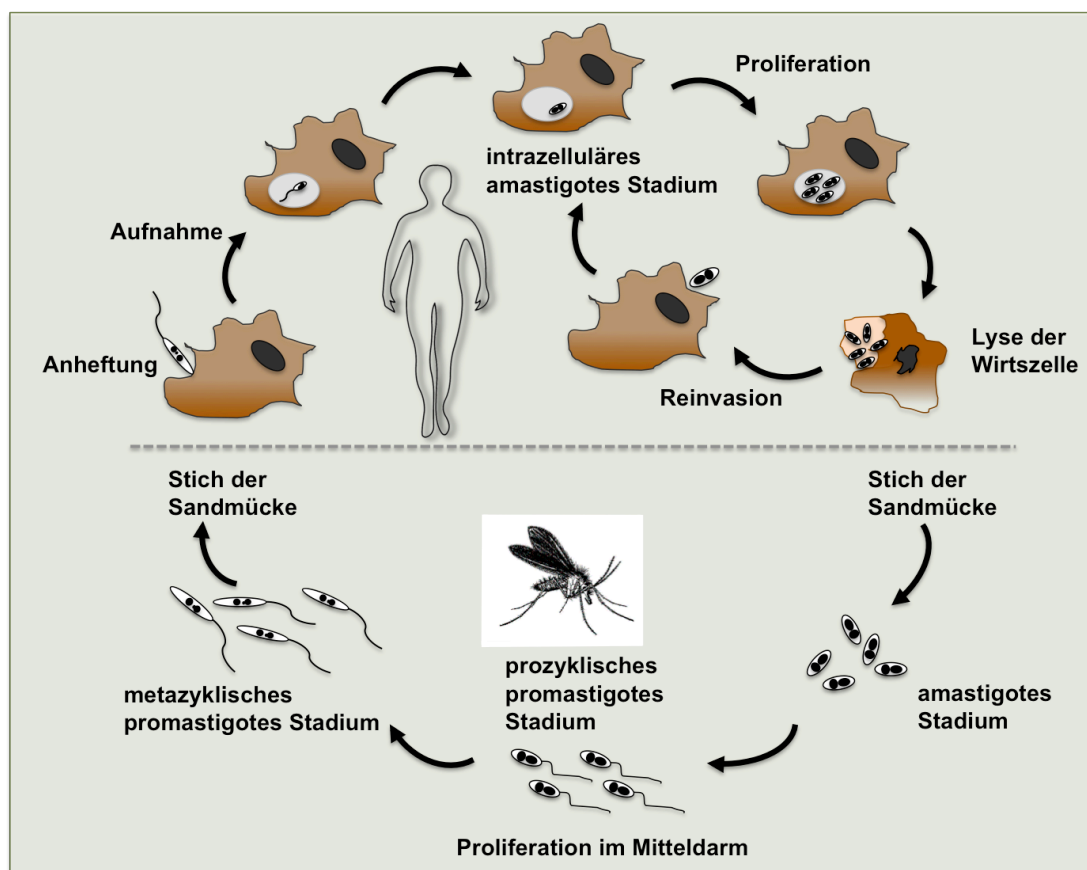


Abb. 1-1: Übertragungszyklus der *Leishmania*-Parasiten

Schematik des biphasischen Lebenszyklus modifiziert nach Handman 2001. Die Überträgermücken injizieren die infektiösen, beweglichen promastigoten Parasiten während der Blutmahlzeit in die Haut des Menschen. Die übertragenen promastigoten Parasiten heften sich an die Makrophagen, werden phagozytiert und transformieren sich intrazellulär in die amastigote Form. Diese vermehren sich zunächst in den befallenen Zellen, was die Ruptur der Makrophagen zur Folge hat. Nach Lyse der Zellen reinfizieren die Parasiten verschiedene andere Zellen oder Gewebe, die sich je nach *Leishmania*-Art unterscheiden und die spezifische klinische Manifestation der Erkrankung bedingen. Die Überträgermücken infizieren sich durch eine Blutmahlzeit an einem infizierten Menschen erneut durch Aufnahme infizierter Makrophagen. Im Mitteldarm der Mücke verwandeln sich die Parasiten in die promastigote Form zurück, vermehren sich und wandern schließlich in den Stechrüssel (Proboscis) der Mücke.

Die Manifestation der Leishmaniose äußert sich in drei unterschiedlichen Formen: der kutanen (Orient- oder Aleppobeule), der mukokutanen (Espundia) und der viszeralen Form (Kala Azar). Laut WHO-Bericht (2010) werden die unterschiedlichen Erkrankungsformen durch verschiedene *Leishmania*-Arten ausgelöst. Die beschriebenen Arten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer

Pathogenität beim Menschen. So wird die kutane Leishmaniose meist durch *L. infantum*, *L. tropica* und *L. major* ausgelöst. Eine Sonderform der kutanen Leishmaniose ist die mukokutane Form (Schleimhaut-Leishmaniose, s. **Abb. 1-2**). Sie wird durch die Erregerarten *L. braziliensis* und *L. panamensis* ausgelöst und kommt vorrangig in Bolivien, Brasilien, Mexiko und Peru vor.



Abb. 1-2: Klinisches Erscheinungsbild der Leishmaniose

Linkes Bild: Manifestation einer kutanen Leishmaniose

(Quelle: Dr. Rosemarie Moser, Hautärztin, Eisenstadt (A); www.drmoser.at)

Rechtes Bild: Deformierender Prozess im Mund-Nasenbereich bei mukokutaner Leishmaniose, Mexiko

(Quelle: Prof. Dr. Wolfgang Bommer, Klinikum der Universität Göttingen)

Im Gegensatz zur kutanen bzw. mukokutanen Form ist die viszerale Leishmaniose eine Infektion der inneren Organe mit *L. donovani* oder *L. infantum*, die sich mit der Ausbildung von Hyperplasien auf die Milz, die Leber, die Schleimhaut des Dünndarms, das Knochenmark, die Lymphknoten und andere lymphatische Gewebe auswirkt. Alle Formen der Erkrankung gehen mit schweren gesundheitlichen Risiken einher, die unbehandelt tödlich enden können. **Abb. 1-3** zeigt die weltweite Verbreitung der viszeralen Leishmaniose.

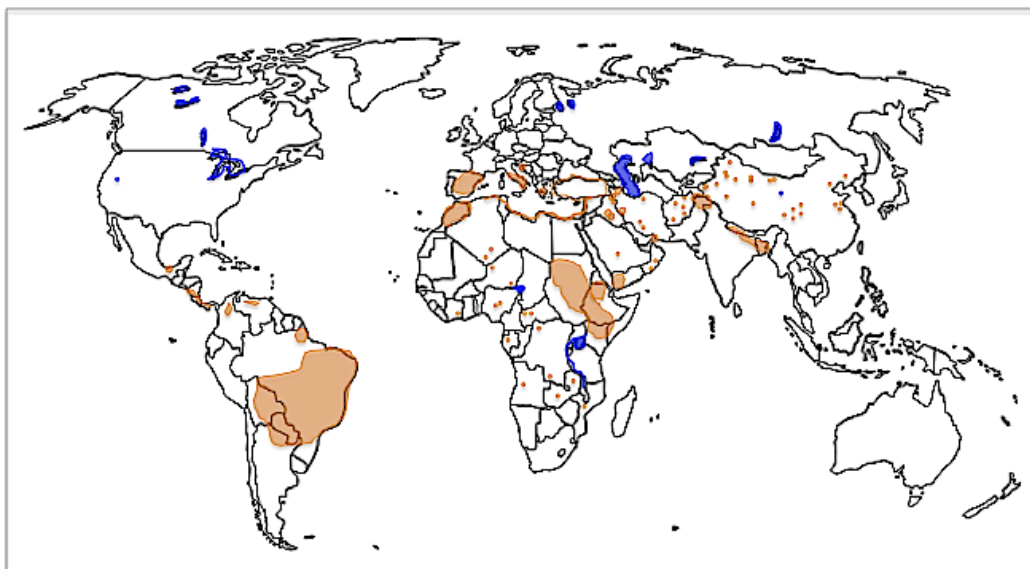


Abb. 1-3: Weltweite Ausbreitung der viszeralen Leishmaniose

Dargestellt ist die Verbreitung der viszeralen Leishmaniose in der Alten und der Neuen Welt. Grafik modifiziert nach <http://www.who.int/leishmaniasis>; Oktober 2010.

1.4.2 Pathologie und Kontrolle der Leishmanien-Infektion

Bei einer Leishmanien-Infektion interagieren verschiedene Zelltypen des angeborenen Immunsystems mit dem Parasiten. Die großen Makrophagen sind dabei die typischen Wirtszellen für Leishmanien.

Die Entwicklung einer schützenden Immunantwort auf intrazelluläre Pathogene wie Leishmanien erfordert die koordinierte Aktion von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität. Die Differenzierung von $CD4^+$ -T-Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen bestimmt den Phänotyp der Immunantwort: Th1-Zellen rufen vor allem eine zelluläre Immunreaktion hervor, Th2-Zellen lösen primär eine humorale Immunantwort aus.

Die T-Helferzellen differenzieren vor allem unter dem Einfluss von Zytokinen: Das durch Th1-Zellen sezernierte $IFN-\gamma$ unterdrückt die Bildung von Th2-Zellen. Demgegenüber sorgt der Einfluss von IL-4 für die Differenzierung zu Th2-Zellen. Und die Anwesenheit von IL-10 führt zur Unterdrückung der Bildung von Th1-Zellen (Miralles *et al.*, 1994).

Wie für T-Zellen ist auch für Makrophagen ein wechselseitiger Einfluss auf die Kontrolle der Infektion mit Leishmanien bekannt. Die auf klassische Weise (durch Th1-Zellen) aktivierten Makrophagen sezernieren IL-12 und produzieren reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Dies führt zur Abtötung intrazellulärer

Parasiten. Alternativ, also durch Th2-Zellen regulierte Makrophagen können das intrazelluläre Parasitenwachstum hingegen sogar tolerieren (Martinez *et al.*, 2009). So führt die vorwiegend über Th2-Zellen ablaufende Immunantwort zu einer deutlichen Verschlechterung des Krankheitsbildes. Die dabei gebildeten Zytokine IL-4 und IL-10 hemmen zudem die Beteiligung der Th1-Immunantwort und führen zu einer abnehmenden Lymphozyten-Proliferation und einer reduzierten IFN- γ -Produktion (Carvalho *et al.*, 1994).

Die erfolgreiche Kontrolle einer *Leishmania*-Infektion hängt also von der Entwicklung einer Th1-Antwort ab. Die Beteiligung von Immunabwehrzellen bei der Bekämpfung der intrazellulären Parasiten und ihre regulativen Abwehrmechanismen bieten eine Reihe von Ansatzpunkten, die für die Therapie der Leishmaniose beeinflusst oder gesteuert werden können. Ein wesentlicher Ansatz besteht darin, die Aktivierung von Makrophagen zu fördern und dadurch die NO-Bildung zu erhöhen und folglich die Leishmanien abzutöten. **Abb. 1-4** zeigt die Makrophagen-Aktivierung bei einer Leishmanien-Infektion im Wirtsorganismus.

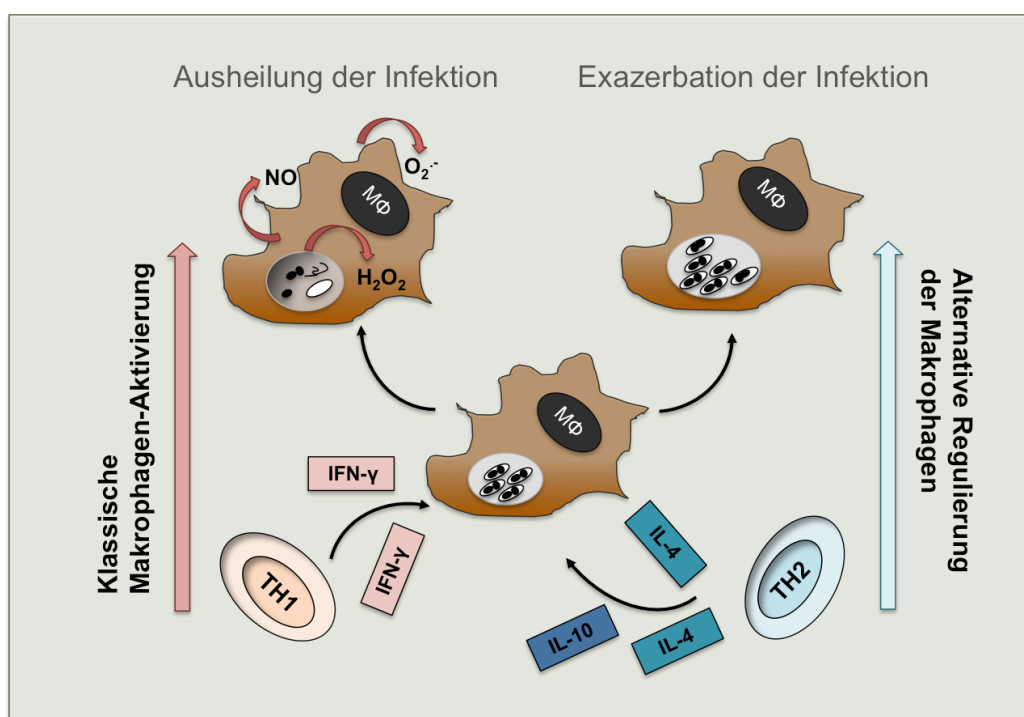


Abb. 1-4: Immunantwort in *Leishmania*-infizierten Makrophagen

Dargestellt ist das Schema einer klassischen und alternativen Regulation der Immunantwort in Makrophagen bei einer Leishmanien-Infektion. Die mit Leishmanien infizierten Makrophagen können auf klassische Weise durch Th1-Zellen mittels IFN- γ zur Bildung der antimikrobiellen ROS und zur NO-Produktion aktiviert werden. Diese stimulierten Makrophagen sind damit in der Lage, die intrazellulären Parasiten abzutöten. Alternativ regulierte Makrophagen werden unter dem Einfluss der Th2-Immunantwort hauptsächlich durch IL-4 und

IL-10 in ihrer Funktion gehemmt. Dies führt zu einer antiinflammatorischen Reaktion, bei der die Produktion von Th1-Zellen und IFN- γ vermindert wird. In der Folge können sich die Leishmanien vermehren und die Infektion breitet sich aus (Abbildung modifiziert nach Kram, 2008).

1.4.3 Therapeutische Ansätze

Zur Behandlung der kutanen Leishmaniose stehen lokale und systemische Therapeutika zur Verfügung. Jedoch besitzt keines der derzeit verfügbaren Medikamente ein optimales Profil im Hinblick auf Wirksamkeit und Nebenwirkungen (S1 Leitlinie 042/007, 2010). Für die Auswahl der Therapeutika sollte aufgrund der Toxizität und der speziesabhängigen Wirksamkeit eine Speziesdifferenzierung der Leishmaniose-Erreger erfolgen. Zwar sind die verschiedenen Arten der Gattung *Leishmania* morphologisch kaum zu differenzieren, die Unterscheidung ist jedoch durch Isoenzymanalyse, molekulare Methoden oder monoklonale Antikörper möglich.

Für die Therapie der verschiedenen Formen der Leishmaniose sind seit langer Zeit Präparate mit fünfwertigem Antimon (z. B. Glucantime®) Mittel der Wahl. Vor allem bei der Behandlung der kutanen und der mukokutanen Leishmaniose sind die Antimonpräparate nach wie vor Standard- und Referenz-Präparate (S1 Leitlinie 042/007, 2010). Weitere Therapieoptionen sind Antimon-Zubereitungen in Kombination mit Pentoxifyllin oder Allopurinol, Miltefosin (ein Phospholipid), Ketoconazol sowie einige Vertreter der Triazol-Antimykotika (Itraconazol und Fluconazol, s. **Tab. 1-3**). Die Therapie der viszeralen Leishmaniose wird systemisch mit liposomalem Amphotericin B (AmBisome®) durchgeführt. Miltefosin, fünfwertige Antimonverbindungen und in besonderen Fällen auch Interferon- γ werden alternativ bzw. zusätzlich verabreicht (S1 Leitlinie 042/004, 2012).

Die Verwendung der antimonhaltigen Arzneistoffe hat sich zunehmend als problematisch herausgestellt, weil neben der Entstehung von Resistenzen auch der Verlust der Wirksamkeit festgestellt werden musste. Davis und Kedzierski (2005) zufolge gibt es nur wenige Substanzen, die bezüglich gleichwertiger Kosten-, Wirk- und Toxizitätsprofile als Alternative zur Verfügung stehen. Auf dieser Grundlage haben sich einige Arbeitsgruppen mit der Erforschung und Entwicklung neuer, auch pflanzlicher Therapieansätze beschäftigt. Die durch *in vitro*-Versuche ermittelte antileishmanielle Potenz von Polyphenolen (Kiderlen *et al.*, 2001) war hierbei eine vielversprechende Möglichkeit zur Erweiterung des Spektrums antileishmanieller Naturstoffe und Extrakte.

Tab. 1-3: Therapieoptionen für die kutane Leishmaniose in der Alten Welt

(042/007 – Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland, 2010)

Abkürzungen: pIA = periläsionales Antimon, MBCL = Methylbenzethoniumchlorid, LAmB = liposomales Amphotericin B

Läsion	Wahl	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. infantum</i>
A. einfach	1.	1. pIA + Kryotherapie 2. Paromomycin/MBCL 3. Thermotheapie	1. pIA + Kryotherapie 2. Thermotheapie	1. pIA + Kryotherapie
B. komplex	1.	1. Miltefosin 2. Fluconazol 3. Ketoconazol	1. Itraconazol 2. Ketoconazol 3. Fluconazol	1. Antimon i.v. + Pentoxifyllin 2. Miltefosin
	2.	1. Antimon i.v. + Allopurinol 2. Antimon i.v. + Pentoxifyllin	1. Antimon i.v. + Allopurinol	1. LAmB

1.5 Zellinduzierte Abwehrmechanismen gegenüber Leishmanien

Bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen spielen sowohl NO als auch ROS eine wesentliche Rolle. Die zytotoxischen Abwehrmechanismen lassen sich durch bestimmte Substanzen, einschließlich einiger Naturstoffe, induzieren. Daher ergab sich für diese Arbeit die Fragestellung, inwieweit Resveratrol die induzierte Immunantwort zu modifizieren vermag. Im Folgenden werden die zytotoxischen Abwehrstrategien näher erläutert.

1.5.1 NO als mikrobizides Effektormolekül bei Infektionen

Die Synthese von Stickstoffmonoxid-Radikal (NO) ist ein Mechanismus der unspezifischen Immunabwehr. Sie erfolgt nach Induktion der Genexpression durch inflammatorische Agentien als Reaktion auf eine Infektion.

Makrophagen sind wie bereits beschrieben wesentliche Zellen bei der Immunabwehr und haben neben unterschiedlichen gewebespezifischen Funktionen in erster Linie die Aufgabe, Pathogene zu erkennen und zu beseitigen. Mit der Aktivierung der Makrophagen durch Signalmoleküle werden verschiedene zytotoxische Abwehrmechanismen ausgelöst. Im aktivierten Zustand verstoffwechseln diese Immunzellen große Mengen an L-Arginin. Currie und Basham (1978) beobachteten, dass die zytotoxische Wirkung von aktivierten Makrophagen mit der Verfügbarkeit und dem Metabolismus von L-Arginin in

engem Zusammenhang steht. L-Arginin zählt aufgrund seiner Guanidinstruktur zu den basischen Aminosäuren und dient als Quelle für energiereiche Stickstoff-Phosphat-Verbindungen in Organismen. Aktivierte Mausmakrophagen und dendritische Zellen metabolisieren L-Arginin auf zwei unterschiedlichen Signalwegen, bei denen einerseits die iNOS und andererseits die Arginase 4 beteiligt ist (Munder *et al.*, 1998). Die iNOS katalysiert die Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin und NO in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird L-Arginin zu N-Hydroxy-L-Arginin metabolisiert. Im zweiten Schritt wird das hydroxylierte L-Arginin zu Citrullin und NO oxidiert (Stuehr *et al.*, 1991).

Es sind heute drei Klassen von Stickstoffmonoxidsynthasen identifiziert. Während die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) konstitutiv exprimiert werden, kann die induzierbare NOS (iNOS) auf transkriptioneller Ebene aktiviert werden. Das über diese drei Wege gebildete NO hat unterschiedliche physiologische Funktionen. NO, das durch die eNOS gebildet wird, bewirkt die Relaxation der glatten Muskulatur. Das von der nNOS produzierte NO wirkt als Neurotransmitter und -modulator. Das durch die iNOS gebildete NO dient der Immunabwehr und wird Untersuchungen zufolge sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ausschließlich nach Stimulation exprimiert (Buttery *et al.*, 1994, Yu *et al.*, 1997).

Die zweite Möglichkeit der Argininmetabolisierung verläuft über die Arginase. Sie hydrolysiert L-Arginin zu Citrullin und Harnstoff. Die Balance und Steuerung dieser Enzymreaktionen, also der iNOS auf der einen Seite und der Arginase auf der anderen, ist stark von der Zytokinsekretion von Th1- und Th2-Zellen abhängig. Die Th1-Immunantwort induziert die iNOS, während die Th2-Zellen die Umsetzung durch die Arginase fördern. Darüber hinaus ist die Induktion des einen Enzyms mit der gleichzeitigen Unterdrückung des anderen verbunden. Dies deutet auf einen konkurrierenden Zustand in murinen Makrophagen hin (Modolell *et al.*, 1995), durch den die Infektion mit intrazellulären Pathogenen stark beeinflusst werden kann.

Wie bereits in Abschnitt 1.4.2 beschrieben, hängt die Kontrolle einer *Leishmania*-Infektion von der Entwicklung einer Th1-Antwort ab. Diese Th1-Antwort ist darüber hinaus die Hauptquelle des Makrophagen-aktivierenden IFN- γ . IFN- γ -aktivierte Makrophagen töten intrazelluläre Parasiten in Abhängigkeit der NO-Produktion ab. Neben L-Arginin wird der Mechanismus zudem über die Bildung von TNF- α reguliert.

Die Erhöhung der NO-Produktion in Makrophagen zur intrazellulären Parasitenabtötung wird insbesondere mit einer Mischung aus LPS und IFN- γ erreicht. Dies gelingt über das CD14-Glykoprotein, ein Oberflächenprotein auf Monozyten und Makrophagen, als Rezeptor mit hoher Affinität für Lipopolysaccharid (LPS) und LPS-bindendes Protein (Wright *et al.*, 1990). CD14 bindet Polysaccharide mit Rhamnose als endständigem Zucker (Soell *et al.*, 1995) und induziert so TNF- α und darüber die NO-Produktion. Kram *et al.* (2008) zeigten, dass die Kombination dieser Stimuli für die Aktivierung von Makrophagen zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären Parasitenlast führte. Als Strategie zur therapeutischen Behandlung der Leishmaniose wäre eine Arzneimittel-induzierte NO-Produktion demnach gut geeignet und wird bereits angewendet. Zum Beispiel erhöht Megluminantimonat indirekt die NO-Produktion durch eine erhöhte TNF- α -Produktion (Muniz-Junqueira und de Paula-Coelho, 2008). Zudem wird die NO-Freisetzung in *L. donovani*-infizierten Makrophagen nach Behandlung mit Paromomycin oder Sitamaquin gefördert (Kulshrestha *et al.*, 2011).

1.5.2 ROS in der zellulären Immunantwort

Aktiviert Makrophagen halten neben NO auch Sauerstoffradikale für die Immunabwehr bereit. Die sogenannten „Reaktiven Sauerstoffspezies“ (ROS) umfassen eine Gruppe von Molekülen und Radikalen, die von Makrophagen zum Schutz vor Pathogenen gebildet werden können (Sherman und Lehrer, 1985). Die zur Familie der ROS gehörenden Radikale sind das Superoxidanionradikal, das Hydroxylradikal, das Hydroperoxyradikal sowie Peroxyl- und Alkoxyradikale (bei Lipiden). Wasserstoffperoxid und das Hypochloritanion werden meist ebenfalls zu den ROS gerechnet, sind aber selbst keine freien Radikale. Wie das Peroxynitritanion (ONOO⁻) ist NO stickstoffhaltig und letztere zählen daher zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS, **Tab. 1-4**).

Reaktive Sauerstoffspezies sind nicht nur ein wichtiger Bestandteil der zellulären Abwehrstrategie, sie spielen auch eine Rolle bei entzündlichen Prozessen und im Krebsgeschehen (vgl. Abschnitt 3.10 ff.).

Tab. 1-4: Vertreter von ROS und RNS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	
Superoxidationradikal	$O_2^{\cdot-}$
Hydroxylradikal	OH^{\cdot}
Hydroperoxyradikal	HOO^{\cdot}
Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Hypochloritanion	ClO^-
Peroxlradikal	ROO^{\cdot}
Alkoxyradikal	RO^{\cdot}
Reaktive Stickstoffspezies (RNS)	
Stickstoffmonoxid	NO
Peroxynitritanion	$ONOO^-$

Das im Aktivierungsprozess gebildete Superoxidationradikal (s. **Abb. 1-5**) kann durch verschiedene Kettenreaktionen andere Arten von ROS erzeugen (Cai und Harrison, 2000). Hierbei entsteht über die Zwischenstufe Wasserstoffperoxid das Hydroxylradikal, welches direkt mit biologischen Makromolekülen reagiert und hierdurch zytotoxische Effekte hervorruft. Übersteigt die Gesamtmenge von intrazellulärem ROS die endogenen antioxidativen Entgiftungskapazitäten der Zelle, so resultiert ein Zustand, der als oxidativer Stress bezeichnet wird.

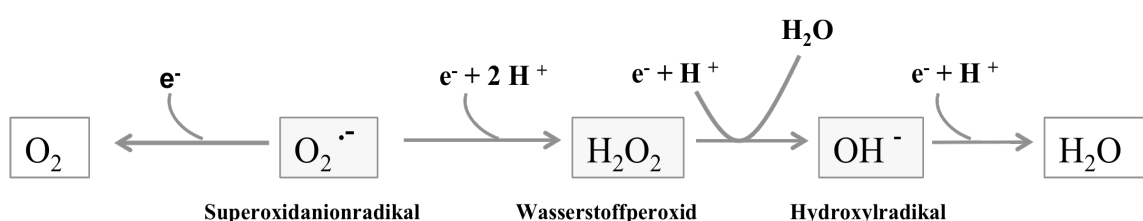


Abb. 1-5: Aktivierungsprozesse zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Durch die Anlagerung von Protonen und die Aufnahme von Elektronen entstehen aus molekularem Sauerstoff über radikalische Zwischenstufen Wasserstoffperoxid und Wasser (Abbildung modifiziert nach Mc Cord und Fridovich, 1969).

Um eine Schädigung durch ROS zu verhindern, besitzen Zellen schützende Enzyme, wie z. B. die Superoxiddismutase (SOD). Die SOD katalysiert die Disproportionierung von intrazellulärem $O_2^{\cdot-}$ zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Das entstandene Wasserstoffperoxid kann seinerseits

weiter enzymatisch umgesetzt werden (Inaktivierung durch Katalase oder durch GSH-Peroxidase).

Bildung und Entstehung von ROS

Reaktive Sauerstoffspezies können während der Photosynthese, bei der Photorespiration und als Beiprodukte des mitochondrialen Elektronentransports entstehen (Dat *et al.*, 2000).

Die in Phagozyten exprimierte NADPH-Oxidase (NOX) spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von ROS. Die NOX produziert nach einer Infektion reaktive Sauerstoffspezies, die zur gezielten Bekämpfung von Pathogenen genutzt werden. Die NOX war das erste identifizierte Beispiel für ein Enzymsystem, bei dem die Bildung von ROS nicht nur als Nebenprodukt anfällt, sondern als Hauptprodukt entsteht (Bedard und Krause, 2007). Die NOX katalysiert folgende Reaktion:



Mitochondrien als Quelle von ROS

Zwei Teilstegmente der mitochondrialen Atmungskette sind für die Entstehung von ROS verantwortlich. Zum einen die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase aus dem Komplex I. Zum anderen die Ubichinol-Cytochrom C-Oxidoreduktase im Komplex III (Ide *et al.*, 1999). Als Nebenprodukte der Zellatmung (durch Monoaminoxidasen sowie im Rahmen der Atmungskette) können aus Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Die Atmungskette ist ein Spezialfall einer Elektronentransportkette. Sie ist gemeinsam mit der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, den „Kraftwerken der Zelle“, lokalisiert. Die bei den katabolen oxidativen Stoffwechselprozessen gewonnene Energie wird in Form von Reduktionsäquivalenten (z. B. NADH) auf den Energieträger ATP übertragen. Erst durch die schrittweise Freisetzung der Energie in der Atmungskette kann die Zelle die Energie nutzen.

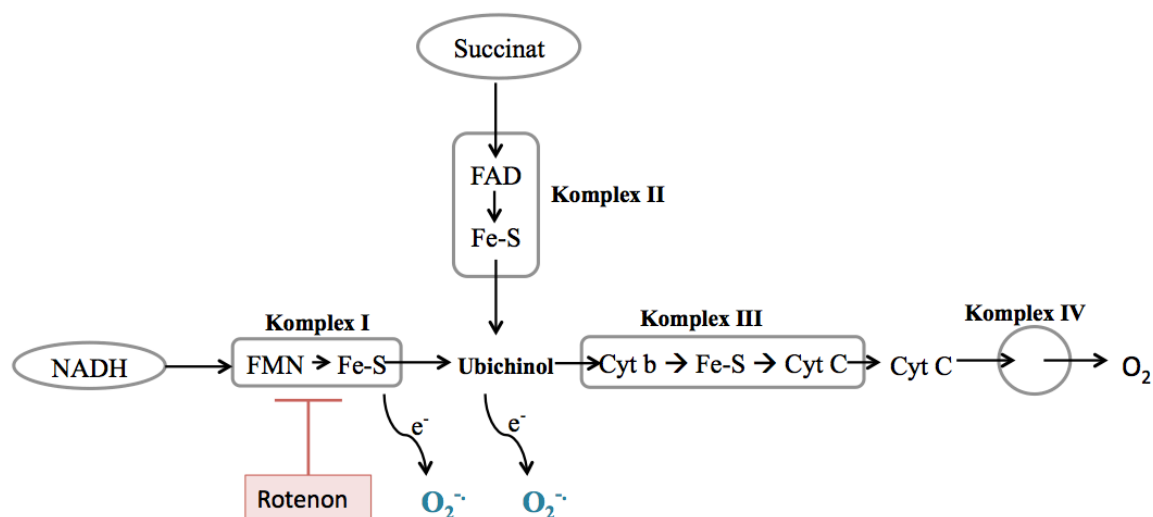


Abb. 1-6: Komponenten der mitochondrialen Atmungskette

FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid, FMN: flavinhaltige Mononukleotide, Fe-S: Eisen-Schwefel-Zentren, Cyt C: Cytochrom C. Durch das Entweichen von Elektronen zwischen den Komplexen I und III ist die Bildung von Superoxidanionradikal möglich (Abbildung modifiziert nach Ide *et al.*, 1999).

In **Abb. 1-6** sind die Komponenten der mitochondrialen Atmungskette und die Entstehung von ROS schematisch dargestellt. Die Komplexe I-IV sind neben der ATP-Synthase (auch als Komplex V bezeichnet) die Hauptkomponenten der Atmungskette und durch verschiedene Inhibitoren hemmbar, zum Beispiel durch Rotenon.

Rotenon

Das Pyranofurochromon-Derivat Rotenon ist ein potenter Komplex I-Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette. Es weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Ubichinol auf, besetzt die Ubichinolbindungsstelle und vermag, diese zu blockieren (vgl. Formelanhang). NADH kann in der Folge nicht mehr als Substrat verwendet werden. Der Elektronentransfer wird unterbrochen, die oxidative Phosphorylierung findet jedoch weiterhin statt. Rotenon wird daher in der vorliegenden Arbeit als Modellschubstanz zur Kurzblockade der Atmungskette genutzt, um den Einfluss von Resveratrol auf die Atmungskette zu untersuchen.

1.5.3 ROS und RNS in der Leishmanienabwehr

Sowohl ROS als auch RNS besitzen direkte antimikrobielle Eigenschaften gegenüber Pathogenen (Murray und Cartelli, 1983, Murray und Nathan, 1999) und stellen die wichtigsten Komponenten zellulärer Abwehrreaktionen dar.

Bei einer Leishmanien-Infektion haben die frühen Mechanismen der angeborenen Immunität, also unter anderem die Entstehung von ROS, einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheit. Die Erkennung der Infektion kann Makrophagen dazu veranlassen, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren und freizusetzen.

Die Abwehr von Mikroorganismen, z. B. durch eine schnelle Superoxidanionradikal-Produktion, hängt dabei einerseits von der Rekrutierung der NADPH-Oxidase-Untereinheiten in den Membranen der entstehenden Phagosomen ab. Andererseits kann Superoxidanion auch ohne eine vorausgegangene Aktivierung während des frühen Kontakts zwischen Parasit und Wirtszelle produziert werden (Almeida *et al.*, 2012).

Zusätzlich zur immanenten Toxizität des Superoxidanions dient das entsprechende Radikal als Ausgangspunkt für die Bildung anderer reaktiver Sauerstoffspezies. Zusammen mit NO können diese Verbindungen zur Bildung von Peroxynitritanion führen, welches einen hohen toxischen Effekt gegenüber Leishmanien aufweist (Van Assche *et al.*, 2011).

Für die Abwehr von Parasiten stehen zudem weitere Phagozyten bereit, welche die Mikroorganismen aufnehmen und anschließend die Pathogene mit mikrobiziden Effektormolekülen wie NO, OCl⁻ und O₂⁻ abtöten (Henderson und Chappell, 1996). Die Fähigkeit von Wirtszellen, eine Leishmanien-Infektion zu kontrollieren, fußt also auf der gesteigerten intrazellulären Produktion von NO und Superoxidanionradikal. Jedoch besitzen einige *Leishmania*-Spezies verschiedene Abwehrmechanismen, die die toxischen Radikale ausschalten können. Dazu zählen z. B. die aktive Verminderung der Superoxidanionradikal-Produktion, die Inhibition der NOX-Enzym-Gruppe und die Bildung antioxidativer Moleküle (Lodge und Descoteaux, 2006).

1.5.4 Einfluss von Resveratrol auf die zellinduzierte Immunabwehr

Wie bereits beschrieben, ist das bakterielle Endotoxin LPS einer der wichtigsten Impulse für die iNOS-Induktion und damit die NO-Produktion. Die Wirkung von Resveratrol auf LPS-aktivierte Makrophagen ist daher von großem Interesse und wurde bereits mehrfach untersucht. Resveratrol reduziert dosisabhängig die

de novo-Bildung der iNOS in mit LPS stimulierten Mausmakrophagen (Jang und Pezzuto, 1999). Zudem hemmt Resveratrol die Erzeugung der NO-Radikale in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen, indem es die Menge des zytosolischen iNOS Proteins insbesondere durch die Hemmung von NFκB reduziert (Tsai *et al.*, 1999). Auch Cíz *et al.*, (2008) beschrieben für Resveratrol in RAW 264.7-Makrophagen eine konzentrationsabhängige Reduktion der NO-Freisetzung, die mit einer Reduktion der iNOS-Expression einhergeht.

Wadsworth und Koop (1999) hingegen unterstützen in ihren Untersuchungen die These nicht, dass Resveratrol die LPS-induzierte Aktivierung von NFκB hemmt. Resveratrol senkt zwar die posttranskriptionale NO-Freisetzung, erhöht aber gleichzeitig den Basallevel von TNF-α. *In vivo* hingegen verbessern niedrige Dosen von Resveratrol ($\leq 6 \mu\text{M}$) die zellvermittelte Immunantwort in Mäusen. Die geringen Mengen von Resveratrol scheinen die Abwehrkräfte der Makrophagen mithilfe der Th1-modulierten Zytokin-Produktion zu fördern (Feng *et al.*, 2002).

Im Zusammenhang mit der Immunantwort beschrieben Jang *et al.* (1999) Resveratrol als einen starken Inhibitor der Produktion reaktiver Sauerstoffarten in Mausmakrophagen, humanen Monozyten und Neutrophilen. Die Aktivierung von Makrophagen und die damit verbundene Synthese und Freisetzung von Zytokinen wird jedoch entweder durch ROS, bakterielle Endotoxine wie LPS oder die Immunantwort selbst initiiert. Damit wäre Resveratrol zwar antiinflammatorisch wirksam, würde aber als direkter Aktivator der Makrophagenabwehr und damit der Förderung reaktiver Intermediate ausscheiden. Resveratrol wird zudem sehr häufig als ROS-Scavenger beschrieben (Zini *et al.*, 1999, Kohnen *et al.*, 2007).

1.5.5 Einfluss von Resveratrol auf ROS und Apoptose

Im Gegensatz zu den immunmodulatorischen Effekten basieren die tumorsuppressiven und chemopräventiven Eigenschaften von Resveratrol auf der Fähigkeit, intrazelluläre ROS-Spiegel zu erhöhen (Low *et al.*, 2010).

Die Wirkung von ROS ist demnach zelltypabhängig und von biphasischer Natur. Einerseits stehen die freien Radikale im Verdacht, wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren zu sein (Emerit, 1994, Cooke *et al.*, 2003). Sie greifen das Erbgut an und zerstören die genetische Struktur der Zelle, sodass sie entartet. Andererseits besitzen bestimmte Krebszellen eine verminderte antioxidative

Entgiftungskapazität, sodass sie auf eine erhöhte ROS-Produktion mit Apoptose reagieren (Fruehauf und Meykens, 2007).

1.5.6 Rolle der Apoptose in Immunabwehr und Homöostase

Die zelluläre, angeborene Immunantwort ist die erste Abwehrreaktion des Wirts, um Parasiten, Viren und andere Krankheitserreger zu eliminieren. Infizierte Wirts- und Krebszellen umgehen diese Immunantwort, in dem sie z. B. spezifische Antigene exprimieren und bestimmte Kontrollmechanismen des Immunsystems umgehen, um zu überleben. Um die Replikation und Ausbreitung von intrazellulären Erregern zu begrenzen oder gar auszuschalten, realisieren erkrankte Wirtszellen den vorzeitigen programmierten Zelltod (Apoptose) ohne Schädigung des Nachbargewebes. Die Apoptose ist folglich ein effektiver antiinfektiver Abwehrmechanismus, mit dem der Wirt infizierte Zellen gezielt eliminiert. Überdies ist die Induktion von Apoptose ein wesentlicher Mechanismus zur Eliminierung entarteter Zellen aus dem Organismus. Bei der Tumorgenese/Karzinogenese werden in malignen Zellen zellphysiologische regulatorische Schaltstellen blockiert, was zur Metastasierung und Tumorneubildung und damit zur Unterdrückung apoptotischer Prozesse führt. In gesunden Zellen sind Proliferation und Apoptose streng reguliert, während in Tumorzellen das Gleichgewicht zugunsten der erhöhten Proliferation und reduzierter Apoptose verschoben ist. Tumorzellen können jedoch unter bestimmten Umständen anfälliger für die Induktion des Selbstmordprogramms sein als nicht-maligne Zellen. Gesunde Zellen besitzen vielfältige Reparatur-Mechanismen, welche jedoch in sich schnell teilenden Krebszellen vermindert sind. Dadurch kann eine erhöhte Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Agentien erreicht werden.

1.6 Resveratrol im Krebsgeschehen

Die Beantwortung der Frage, inwieweit die Induktion der Apoptose in Krebszellen durch Resveratrol ROS-abhängig ist, und welcher Signalweg innerhalb der Apoptose-Modulation durch Resveratrol beeinflusst wird, ist eine zentrale Aufgabenstellung für das Verständnis des Wirkmechanismus von Resveratrol hinsichtlich antikarzinogener Effekte.

Krebs ist laut einem Bericht der WHO aus dem Jahr 2010 neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen in Europa. Dementsprechend ist das Interesse an Wirkstoffen zur Vorbeugung bzw. Bekämpfung von Krebserkrankungen enorm. Resveratrol hat in der Vergangenheit schon häufiger Aufmerksamkeit als mögliches Antitumormittel erregt, spätestens seitdem im Jahr 1997 erstmals eine hemmende Wirkung auf krebsauslösende Prozesse beobachtet worden war (Jang *et al.*, 1997). Nach Schätzungen des Robert Koch-Instituts, Berlin, erkranken jährlich mehr als 51.000 Menschen an Lungenkrebs. Hinter Darm-, Prostata- und Brustkrebs ist der Lungenkrebs damit die vierthäufigste Krebsart. Keine andere Krebserkrankung hat im Laufe der letzten Jahrzehnte derart stark zugenommen. Vor allem Frauen sind stark betroffen („Krebs in Deutschland“, Zentrum für Krebsregisterdaten, Stand: Januar 2010).

Aktuelle Forschungsergebnisse legen nahe, dass verschiedene diätetische Substanzen pflanzlichen Ursprungs ein chemopräventives oder sogar ein für die Chemotherapie adjuvantes Potenzial besitzen (Surh, 2003). Für Resveratrol haben zahlreiche *in vitro* Studien die vermutete antiproliferative Wirkung auf verschiedene Krebszellen untersucht. Für den zugrunde liegenden Wirkmechanismus werden unter anderem die Auslösung des Zellzyklusarrestes in der G1/S- oder G2/M-Phase und die Induktion von Apoptose beschrieben (Harikumar *et al.*, 2008, Fan *et al.*, 2008). Allerdings sind die mechanistischen Signalwege von Resveratrol in den antitumor- bzw. krebsprotektiven Aktivitäten bisher nur wenig verstanden.

1.6.1 Apoptose

Der Begriff Apoptose beschreibt den sogenannten programmierten Zelltod. Dieser Spezialfall der programmierten Zelldifferenzierung bildet den Abschluss einer Kaskade, die im Wesentlichen die An- und Abschaltungen bestimmter Genmuster hervorruft. Mit der Induktion von apoptotischen Prozessen sind charakteristische Veränderungen der betroffenen Zellen verbunden, wie zum Beispiel Veränderungen im Zellkern, DNA-Fragmentierung und morphologische Modifizierungen (Saraste, 1999). Man unterscheidet früh- und spätapoptotische Prozesse. Eine weitere Form des Zelltods ist die Nekrose. Sie ist durch eine flächige Entzündungsreaktion gekennzeichnet und ist im Unterschied zur Apoptose kein Einzelzell-Phänomen.

1.6.2 Abgrenzung zwischen Apoptose und Nekrose

Apoptose und Nekrose sind zwei Formen des Zelltods, die nach unterschiedlichen Mechanismen ablaufen. Die Apoptose ist ein gerichteter Prozess, die Nekrose eine Folge diffuser Zellschädigung. Zunächst zur Apoptose: Sie ist in mehrere Phasen eingeteilt. In den frühapoptotischen Phasen sind Oberflächenveränderungen zu beobachten. Dabei verändert sich der Aufbau der Zellmembran. Das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserin, das normalerweise Bestandteil der Zellmembran auf zytosolischer Seite ist, transloziert in frühen Stadien der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran (Koopman *et al.*, 1994). Der Nachweis dieses Vorgangs kann über Annexin-V geführt werden. Dieses phospholipid-bindende Protein, das Calcium-abhängig mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet, kann mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Martin *et al.*, 1995). Dazu wird Annexin-V mit dem Fluorophor FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt. Die durch Apoptose absterbenden Zellen schrumpfen und ziehen sich zusammen. In den Folgephasen ist die Bildung von Blasen an der Zellmembran „membrane blebbing“ oder von sogenannten apoptotischen Körperchen („apoptotic bodies“) zu beobachten. Diese werden schließlich von zur Phagozytose befähigten Zellen aufgenommen und vernichtet. Die späten Phasen der Apoptose sind außerdem durch die unumkehrbare Aktivierung von apoptotischen Proteasen charakterisiert.

Betrachtet man die Nekrose, handelt es sich dabei um die Folge einer diffusen Zellschädigung. Biochemische Merkmale sind ein massiver Energiemangel und die Aktivierung von nicht-apoptotischen Proteasen. Dies führt zu einem Verlust der Funktion der homöostatischen Ionen-Pumpen und ruft Schäden an Membranlipiden hervor, die zur Schwellung und zum Zerplatzen der betroffenen Zellen führen. Entzündungsreaktionen, die durch die unkontrollierte Freisetzung intrazellulärer Bestandteile hervorgerufen werden, sind die Folge der Lyse der Zellmembran. Nekrotische Zellen zeigen neben der zytoplasmatischen Schwellung typischerweise auch Vakuolisierung, eine Ausdehnung der Organellen (Mitochondrien, endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat) sowie eine moderate Chromatinkondensation (Festjens *et al.*, 2006).

Die Nekrose ist ein passiver, irreversibler Vorgang und steht damit im Gegensatz zu den aktiven Regulationsmechanismen der Apoptose-Kaskade. Nekrotische Zellen können durch die Propidiumjodid (PI)-Färbung nachgewiesen werden. PI vermag die Zellmembran intakter, lebender Zellen sowie frühapoptotischer Zellen

nicht zu durchdringen. Dadurch werden ausschließlich die Kerne toter Zellen angefärbt.

In bestimmten Fällen lassen sich Apoptose und Nekrose jedoch nicht scharf voneinander trennen. So kann Nekrose auch als Reaktion auf die Aktivierung des Todes-Rezeptors oder durch die Gabe von Chemotherapie ausgelöst werden. Dieser Mechanismus galt lange Zeit als Bedingung für den ausschließlich über Apoptose vermittelten Zelltod. Darüber hinaus kann die Hemmung spezifischer Proteine bei der Regulierung der Apoptose die Zellen veranlassen, auf Nekrose umzuschalten. Zudem tritt die sogenannte sekundäre Nekrose dann auf, wenn die Eliminations-Kapazität der Fresszellen überschritten wird und in der Folge ein Auslaufen der Zellinhalte mit der Induktion von Entzündungsreaktionen stattfindet.

1.6.3 Extrinsische und intrinsische Signalkaskade der Apoptose

Apoptose ist der Hauptsignalweg, um unerwünschte und schädliche Zellen während der embryonalen Entwicklung, der Gewebshomöostase oder bei der Immunregulation aus dem Organismus zu entfernen. Die meisten Anti-Krebs-Therapien basieren auf der Aktivierung von Apoptose-Signalwegen, um den Mechanismus gezielter Eliminierung von Einzelzellen auszunutzen. Eindeutig gerichtete Signalkaskaden, die durch verschiedene Auslöser, wie zum Beispiel spezifische Todessignale oder verschiedene chemisch-physikalische Einflüsse, induziert werden, führen zur Einleitung der Apoptose. Es können zwei Signalwege unterschieden werden: der mitochondriale (intrinsische) und der rezeptorvermittelte (extrinsische) Weg. **Abb. 1-7** zeigt schematisch den Ablauf der intrinsischen und extrinsischen Signalkaskade (modifiziert nach Roy und Nicholson, 2000).

Da sich die Veränderungen in allen Zelltypen während der Apoptose unabhängig vom Todes-Signal ähneln, folgen die biochemischen Mechanismen dieser Veränderungen auch einem vergleichbaren programmierten Ablauf. In Nematoden, Insekten und menschlichen Zellen werden die meisten morphologischen Veränderungen der Apoptose durch die Aktivierung einer evolutionär konservierten und einzigartigen Klasse von intrazellulären Proteasen vermittelt – den Caspasen.

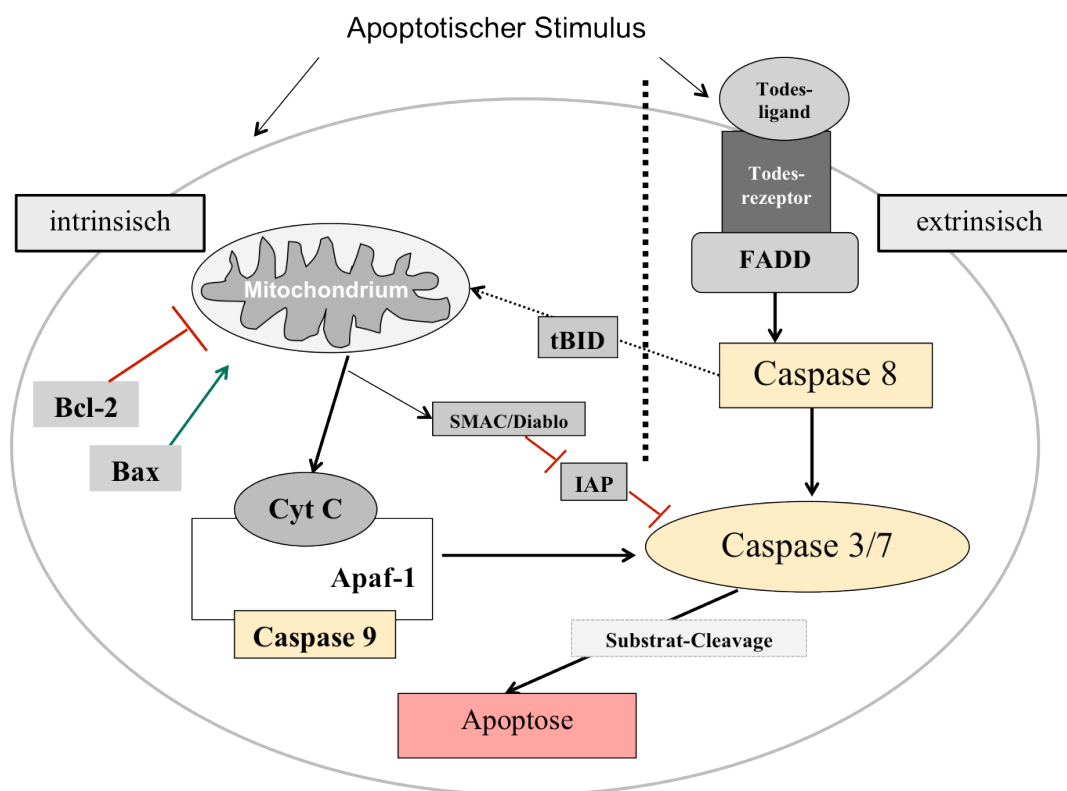


Abb. 1-7: Caspase-abhängige Apoptose

Dargestellt ist eine modifizierte, vereinfachte schematische Darstellung der Caspase-abhängigen Apoptose nach Roy und Nicholson (2000). Die Apoptose wird in die Initiatorphase und die Effektorphase eingeteilt. Die Initiatorphase wiederum kann in den extrinsischen und in den intrinsischen Signalweg unterteilt werden. Der extrinsische Weg wird durch die Ligandenbindung am Todesrezeptor (CD95) induziert. Über eine Bindung der Procaspase 8 und ihrer Aktivierung wird die Caspase-Kaskade ausgelöst. Bei der intrinsischen Kaskade führen die Freisetzung von Cytochrom C und pro-apoptischen Faktoren (Smac/Diablo) aus dem Mitochondrium zur Aktivierung von Caspase 9. Beide Wege führen schließlich zur Effektorphase, bei der die Caspasen 3 und 7 zum apoptotischen Tod der Zelle führen.

Die Mehrheit der proteolytischen Spaltungen, die die Apoptose einleiten und charakterisieren, werden durch die sogenannten Effektorcaspasen, z. B. Caspase 3 und Caspase 7, vermittelt. Diese Enzyme werden erst dann vollständig aktiviert, wenn die großen und kleinen Untereinheiten des jeweils ruhenden Proenzym durch Endoproteolyse freigesetzt werden. Dies geschieht durch vorgeschaltete Initiatorcaspasen wie Caspase 8 und Caspase 9.

Für die Mehrheit der Zelltod-Stimuli wird das intrinsische Todessignal durch das Mitochondrium eingeleitet. Dies führt in der Zellorganelle zur Aktivierung von Cytochrom C und von aus dem Mitochondrium stammenden Aktivatoren der Caspasen. Diese werden auch als SMAC bezeichnet – second mitochondria-derived activator of caspases (Roy und Nicholson, 2000). Dieser Signalweg hängt

vom Verhältnis der anti-apoptischen zu den pro-apoptischen Mitgliedern der Proteinfamilie Bcl-2 ab. Diese Proteine vermitteln u. a. die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und leiten damit den programmierten Zelltod ein. Cytochrom C induziert die Entstehung des Apoptosoms und der sich anschließenden Aktivierung der Caspase 9, während Smac/Diablo die IAP-vermittelte Inhibition der Caspasen aufheben (Yan und Shi, 2003).

Unklar ist jedoch, in welchem Maße extrinsischer und intrinsischer Weg *in vivo* voneinander abhängen. Auf molekularer Ebene scheint die Proteolyse des Proteins BID wichtig zu sein, das normalerweise eine anti-apoptische Rolle im intrinsischen Signalweg spielt. Wird BID durch Caspase 8 (extrinsisch) zu tBID verkürzt, so wird hierdurch die intrinsische Kaskade vorangetrieben (Roy und Nicholson, 2000). Die Bildung und Freisetzung von ROS aus dem Mitochondrium kann ebenfalls den intrinsischen Signalweg einleiten.

1.6.4 Resveratrol und Apoptose

Bedeutend, aber noch nicht vollständig verstanden, sind die antikanzinogenen Mechanismen von Resveratrol. Sie beinhalten die Hemmung des Aktivator-Proteins 1 (APAF-1) und eine Aktivierung von p53 (Bode und Dong, 2004, Fulda und Debatin, 2006). In Kolon- und Brustkrebszellen hat sich gezeigt, dass Resveratrol die Apoptose sowohl durch Aktivierung verschiedener Caspasen, als auch durch eine Bax-Akkumulation und durch eine Umverteilung der Todes-Rezeptoren (Delmas *et al.*, 2006) induziert. Ferner induziert Resveratrol Caspase-unabhängige Apoptose durch Bcl-2- und NF κ B-Downregulation in MCF-7-Zellen (Pozo-Guisado *et al.*, 2005).

Weiterhin wird für Resveratrol einerseits die CD95/CD95L-abhängige Apoptosekaskade in HL60 beschrieben, also die Aktivierung der extrinsischen Kaskade (s. **Tab. 1-1**). Zudem gibt es Beobachtungen an einer lymphatischen Leukämiezelllinie zu einer vom CD95/CD95L-System unabhängigen Apoptose-Induktion (s. **Tab. 1-1**).

Neben pro-apoptischen Effekten besitzt Resveratrol auch anti-apoptische Effekte. In Ratten-Leberzellen, bei denen durch Tetrachlormethan (CCl₄) eine Leber-Toxizität induziert wurde, unterdrückt Resveratrol die Apoptose und wirkt damit hepatoprotektiv (Roy *et al.*, 2011).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der vielversprechenden *in vitro*-Datenlage zur antileishmaniellen Aktivität von Polyphenolen (Kolodziej *et al.* 2001, Kiderlen *et al.*, 2001, Kolodziej und Kiderlen, 2005) und einer einzigen Veröffentlichung zum leishmaniziden Potenzial von Resveratrol (Kedzierski *et al.*, 2007) sollte die Verbindung diesbezüglich näher untersucht und Einblick in den Wirkmechanismus erhalten werden.

Diese Zielstellung beinhaltet zunächst durchflusszytometrische und biochemische Analysen an infizierten Knochenmarksmakrophagen (BMM Φ) und der murinen Makrophagenzelllinie J774-G8 zur Abtötungsrate der intrazellulären Parasitenlast durch Resveratrol und zum Ausmaß und Effektivität der induzierten NO-Menge. Resveratrol wird gemeinhin als gut verträgliche Substanz beschrieben. In Kurzzeitstudien weist sie nur wenige unerwünschte Nebeneffekte auf. Bei Tierversuchen waren toxikologische Wirkungen nur in hohen Dosen und bei Langzeitanwendung zu beobachten (Vang *et al.*, 2011). Insgesamt ist die Datenlage zur Verträglichkeit und Sicherheit von Resveratrol jedoch kontrovers. Demzufolge war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit die Erforschung des zytotoxischen Profils von Resveratrol, insbesondere im Hinblick auf Makrophagen als Wirtszellen von Leishmanien. Neben durchflusszytometrischen Messungen waren mikroskopisch-morphologische Untersuchungen und Viabilitätstestungen für das Methodenspektrum vorgesehen.

Auch sollte die pro-apoptotische Wirkung von Resveratrol auf Krebszellen (u. a. beschrieben von Tsan *et al.*, 2000, Surh *et al.*, 1999) und die damit verbundene Zytotoxizität in der humanen Lungenkrebszelllinie A549 näher untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob die Zytotoxizität von Resveratrol auf eine Induktion der Apoptose zurückzuführen ist, und inwieweit diese mit der Aktivierung von Caspasen in Zusammenhang steht.

Neben den humanen Lungenkrebszellen sollten die im Leishmanien-Modell verwendeten Maus-Makrophagen berücksichtigt werden. Durch die Einbeziehung weiterer Zelltypen (Fibroblasten) sollte untersucht werden, inwieweit die Zytotoxizität auf karzinogene Zellen beschränkt ist.

Weiterhin sollte der Einfluss von Resveratrol auf den oxidativen Stress-Status in der Zelle analysiert werden. Pro- oder antioxidative Effekte sollten mithilfe von Radikalbildnern und der Fluoreszenzsonde H₂-DCF-DA untersucht werden. Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der darauffolgenden Apoptose-

Induktion sollte durch Untersuchungen am mitochondrialen Komplex der Atmungskette geklärt werden.

Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die vielfältigen Wirkungen und Effekte von Resveratrol besser zu verstehen und das Potential des Hydroxystilbens als vielseitiges Effektmolekül weiter herauszustellen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Tab. 2-1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Firma, Ort
Analysenwaage (A200S)	Sartorius, Göttingen
Axio Cam MRm (SW)	Carl Zeiss, Jena
Axio Cam color (Farbe)	Carl Zeiss, Jena
Begasungsbrutschränke	
Typ 450 E	NuAir, Illinois, USA
HERAcell 150i	Thermo Scientific, Dreieich
Doppelgel-Elektrophorese (vertikal)	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
Durchflusszytometer	
FACS Calibur™	BD Biosciences, Heidelberg
LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Tube-Rotator (GFL 3025)	Th. Karow GmbH, Berlin
Feinwaage (MC1)	Sartorius, Göttingen
Freezing Container (Cryo 1 °C)	Nalge Nunc, Rochester, NY, USA
Glasgeräte (Messzylinder, Bechergläser, Glasflaschen)	Schott, Mainz bzw. VWR, Darmstadt
Heizplatte / Magnetrührer (IKA Ret basic)	IKA®-Werke, Staufen
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifugen	
Multifuge 1S-R	Thermo Scientific, Dreieich
Varifuge 3.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
VWR himac CT15RE	VWR International, Darmstadt
Mikroliter-Pipetten (diverse Volumina)	Eppendorf, Hamburg bzw. Biohit, Helsinki, Finnland
Mikroplattenreader (Infinite M200 Pro)	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskope	
Axioskop 2 (Fluoreszenzmikroskop)	Carl Zeiss, Jena

Tab. 2-1 (Fortsetzung)

Gerät	Firma, Ort
Axio Imager Z1 (mit Apotomefunktion)	Carl Zeiss, Jena
Axiostar plus (Lichtmikroskop)	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 25 (Lichtmikroskop)	Carl Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammern	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
Plattformschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments, Schwabach
PeqLab Perfect Blue Mini Gel System	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
PeqPower E 250 Power Supply- 230 VAC	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
Sterilwerkbänke	
BDK-S 1200	BDK Reinraumtechnik, Sonnenbühl
Type A/B3 (Klasse II)	NuAir, Illinois, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (Minishake 3 basic)	IKA®-Werke, Staufen
Wasserbäder	
Thermostat Haake W13	Thermo Electron Corp., Dreieich
WNB 7-45	Memmert, Büchenbach
Wippschüttler (Stuart ® Gyro Rocker SSL3)	Bibby Scient. Lim., Staffordshire, GB
Zentrifugen	
Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
VWR Galaxy Ministar	VWR International, Darmstadt

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Standard Labor-Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in Analysen- und Reinst-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Verbrauchsmaterialien

Tab. 2-2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material/Substanz	Firma, Ort
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Blotting Papier (Filterpapier)	Whatman (GE Healthcare), Freiburg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CryoTubes Nunc®	Sigma-Aldrich, Steinheim
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H ₂ -DCF-DA)	Life Technologies, Darmstadt
Diff-Quik® Schnellfärbeset	Medion Diagnostics, Gräfelfing
ECL-Detection Kit	GE Healthcare, Freiburg
ECL-Hyperfilm	GE Healthcare, Freiburg
Entellan® neu (Schnelleindeckmittel)	VWR International, Hannover
Formaldehyd-Lösung	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Kanülen (diverse Größen)	B. Braun, Melsungen
Kodak Medical X-ray Film	PMA Bode, Hamburg
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Messpipetten (steril)	TPP (Biochrom), Berlin
Mikrotiterplatten (12-, 24- und 96-Well)	TPP (Biochrom), Berlin
NEAA (non-essential amino acids)	Gibco (Invitrogen), Paisley, GB
Nitrocellulose Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Asheville, NC, USA

Tab. 2-2 (Fortsetzung)

Material/Substanz	Firma, Ort
Parafilm	American National Can, Mensaha, USA
Protease-Inhibitor Complete Ultra	Roche Diagnostics, Mannheim
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Spritzen (diverse Volumina)	B. Braun, Melsungen
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe
Western Blot-Fertiggele	
NuSep Tris Glycin NN 10%	NuSep Labortechnik, Wasserburg
NuSep Tris Glycin NN 12%	NuSep Labortechnik, Wasserburg
NuSep Tris Glycin NN 8-16%	NuSep Labortechnik, Wasserburg
Western Blot Recycling Kit	Alpha-Diagnostic Int, S. Antonio, TX, USA
Xylolisomere	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturschalen, steril (Petrischalen)	TPP (Biochrom), Berlin
Zellkulturflaschen, steril (T25)	TPP (Biochrom), Berlin
50 mL-Falconröhrchen (steril)	TPP (Biochrom), Berlin
15 mL-Falconröhrchen (steril)	TPP (Biochrom), Berlin

2.3 Test- und Referenzsubstanzen

Tab. 2-3: Auflistung der verwendeten Test- und Referenzsubstanzen

Substanz	Firma, Ort
Amphotericin B	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Camptothecin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DPPH	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
LPS (Samonella friedenau)	Forschungsinstitut, Borstel
Naphthylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Nitroprussid-Natrium	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
rIFN- γ (mu)	Genentech, San Francisco, USA
rIFN- γ (hu)	ImmunoTools, Friesoythe
Rotenon	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Staurosporin	Merck Millipore, Darmstadt
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DL- α -Tocopherol	Merck Millipore, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe

2.4 Materialien in der Zellkultur

Tab. 2-4: Auflistung der verwendeten Zellkulturmaterialien

Substanz/Material	Firma, Ort
Accutase	PAA Laboratories, Cölbe
Dabco (Triethylendiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
Geneticin G418	Life Technologies, Darmstadt
Gevisol®	Schülke und Mayr, Norderstedt
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Biochrom, Berlin
IL-1 β	ImmunTools, Friesoythe
Moviol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (100 Units/ 100 μ g pro mL)	PAA Laboratories, Cölbe
rIFN- γ	ImmunTools, Friesoythe
RPMI 1640	Gibco (Invitrogen), Darmstadt
TNF- α	ImmunoTools, Friesoythe
0,5% Trypsin / EDTA (10x)	Life Technologies, Darmstadt

2.5 Versuchstiere, eukaryotische Zellen und Parasiten

2.5.1 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse

Sechs bis zwölf Wochen alte, syngene immunkompetente C57Bl/6 (C: Clarence C. Little, bl: black) Maus-Inzuchtstämme wurden von der Zentralen Versuchstierzucht (ZVZ, Bundesinstitut für Risikobewertung) bezogen. Die Tiere

wurden in offener Käfighaltung in einem 12 h Hell-Dunkel-Zyklus bis zur weiteren Verwendung gehalten (Genehmigungsnummer für die Organentnahme: Reg O 0107/04, Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin).

2.5.2 J774-G8-Makrophagen Zelllinie

Die Mausmakrophagen-Zelllinie J774-G8 wurde vom Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg) im Jahre 1990 an das Robert Koch-Institut übergeben, weiter kultiviert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bis zur experimentellen Verwendung gelagert. Die Zellen wurden nach dem Auftauen auf Zellkulturschalen in R5-Medium kultiviert und mittels Accutase (PAA) vom Zellkulturplastik für den weiteren Gebrauch abgelöst.

2.5.3 L929(CSF)-Zellen

Die murine Fibroblasten-Zelllinie L929, Subklon M-CSF (Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor), wurde 1990 vom Fraunhofer Institut für Toxikologie (Hannover) dem Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellt, dort weiter kultiviert und in Aliquots bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden in R5-Medium kultiviert und mittels Trypsin/EDTA zur experimentellen Verwendung vom Zellkulturplastik abgelöst.

Die Zelllinie wurde einerseits zur Herstellung von Makrophagen-Kolonie-Stimulierendem-Faktor genutzt, der zur Differenzierung von Vorläuferzellen zu BMM Φ benötigt wird. Andererseits diente die Zelllinie als Gewebemodell zur Bestimmung der Zytotoxizität von Resveratrol *in vitro*.

2.5.4 A549-Zellen

Die humanen A549-Epithelzellen wurden aus Lungenkarzinomgewebe eines 58 Jahre alten kaukasischen Mannes isoliert und 1994 vom Trudeau Institute (New York, USA) an das RKI abgegeben. Die Zellen wurden in R5-Medium kultiviert und zur Verwendung mithilfe von 3 mL je Zellkulturschale Trypsin/EDTA (1x) vom Zellkulturplastik abgelöst.

2.5.5 Caco-2-Zellen

Die Caco-2-Zellen (DSMZ: ACC 169) entstammen einem Dickdarm-Karzinom eines 72-jährigen kaukasischen Mannes und ähneln im Verhalten den Zellen der

Darmmukosa. Die Zellen haben eine Verdopplungszeit von ~ 80 h. Bis zur Einsaat wurden die Zellen in T25-Kulturflaschen à 6mL Zellsuspension (Zellen in MEM20-Medium, vgl. Abschnitt 2.6) kultiviert und mittels Trypsin/EDTA zur Verwendung abgelöst. Die Ausdifferenzierung und Durchführung der Experimente erfolgte in 12-Well-Platten (8×10^5 Zellen/Well) in MEM-Kulturmedium mit 20% FCS. Die Zellen bilden einen Monolayer und differenzierten über 17-21 Tage aus. In Experimenten wurden nur voll ausdifferenzierte Caco-Zellen eingesetzt.

2.5.6 BMM Φ -Makrophagen aus murinem Knochenmark

Für die Ausdifferenzierung von Makrophagen aus Knochenmark wurden junge C57BL/6 Mäuse (4-6 Wochen alt) zunächst durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurden unter sterilen Bedingungen die Beinknochen (Ober- und Unterschenkel) vom Körper abgetrennt und vom Muskelgewebe frei präpariert sowie die Gelenkköpfe entfernt.

Unter Verwendung von sterilem, eiskaltem PBS wurde das Knochenmark aus den vorbereiteten Röhrenknochen mittels Einmalspritze und Kanüle (20 mL, 26 Gauge, Braun, Melsungen) ausgespült. Anschließend wurde das Knochenmark in PBS abzentrifugiert (4 °C, 250 x g, 10 min), die Zellen in Makrophagen-Differenzierungs-Medium aufgenommen und auf insgesamt 10 Polystyrol Petrischalen mit jeweils 12 mL Medium ausgesät. Die Makrophagen wurden für die Dauer von 7 Tagen im Brutschrank bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

In der Folge wurde das Medium abgenommen, gegen R10-Medium ausgetauscht und die Makrophagen für weitere 3 Tage kultiviert. Die nach 10 Tagen voll ausdifferenzierten Makrophagen (BMM Φ) wurden mit kaltem PBS ohne Ca²⁺- und Mg²⁺-Zusatz von den Zellkulturschalen abgelöst und für entsprechende Versuche eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.13 ff.).

2.5.7 Leishmanien

Der in dieser Arbeit verwendete Klon *Leishmania major* GFP LT 52 CC-1pXG-GFP wurde von Herrn Professor Beverley, Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA, zur Verfügung gestellt. Die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in diesem

transfizierten Stamm geht mit der Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin einher.

Zur Kultivierung wurden die Parasiten in ein geeignetes Wachstumsmedium (vgl. Abschnitt 2.6) überführt, dem zusätzlich das Antibiotikum Geneticin (25 µg/ml, G418, Gibco, Invitrogen) zugegeben wurde. Dieser ständige „Selektionsdruck“ verhinderte, dass das Plasmid mit der Information für die Produktion des grün fluoreszierenden Proteins und der Geneticin-Resistenz verloren geht (Bolhassani *et al.*, 2011). Kulturen der Leishmanien wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Nach dem Auftauen (vgl. Abschnitt 2.11) wurden die Parasiten in Leishmanien-Wachstumsmedium (Kulturbedingungen: 25 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂) überführt und kultiviert.

Die Leishmanien-Kulturen wurden maximal über einen Zeitraum von zwei Monaten für Experimente in Kultur gehalten, danach durch geeignete Desinfektionsmaßnahmen (Gevisol®, Schülke & Mayr, Norderstedt) inaktiviert und entsorgt. Für weitere Versuche wurde ein neues Aliquot aufgetaut. Hierdurch wurde eine vergleichbare genetische „Ausstattung“ für alle Versuche gewährleistet. Um ein Überwachsen der Kultur zu vermeiden, wurden die Parasiten alle 7 bis 8 Tage gesplittet, d. h. der Großteil (3/4) der Leishmanien-Suspension wurde verworfen und das Volumen durch frisches Medium ersetzt. Zur Ernte der Parasiten wurde die Leishmanien-Suspension in der post-logarithmischen Wachstumsphase aus den T25-Kulturflaschen entnommen und die Parasiten in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren (700 x g, 10 min, 4 °C) wurden die Leishmanien noch zweimal mit ca. 10 mL PBS gewaschen und in einem Aliquot die Anzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (vgl. Abschnitt 2.12, Durchführung nach Kram 2008).

2.6 Kulturmedien

Grundmedium (R0-Medium)

Zusammensetzung

RPMI 1640 Grundmedium vom RKI hergestellt
(alternativ kommerziell von Gibco (Invitrogen) verwendet)

Natriumpyruvat (10 mM)	1%
HEPES (25 mM)	1%
Penicillin/Streptomycin	100 Units bzw. 100 µg/mL

R5-Medium: Kulturmedium für J774-G8, A549, L929-MCSF

Zusammensetzung

RPMI 1640 Grundmedium vom RKI hergestellt
(alternativ kommerziell von Gibco (Invitrogen) verwendet)

Hitze-inaktiviertes FCS	10%
Natriumpyruvat (10 mM)	1%
HEPES (25 mM)	1%
Penicillin/Streptomycin	100 Units bzw. 100 µg/mL

R10-Medium (Kulturmedium für BMMΦ)

Zusammensetzung

RPMI 1640 Grundmedium vom RKI hergestellt
(alternativ kommerziell von Gibco (Invitrogen) verwendet)

Hitze-inaktiviertes FCS	10%
Natriumpyruvat (10 mM)	1%
L-929-konditionierter Überstand	4%
D-Glucose (20 mM)	0,5%
HEPES (25 mM)	1%
Penicillin/Streptomycin	100 Units bzw. 100 µg/mL

Makrophagen-Differenzierungsmedium für BMM Φ **Zusammensetzung**

RPMI 1640 Grundmedium vom RKI hergestellt

(alternativ kommerziell von Gibco (Invitrogen) verwendet)

Hitze-inaktiviertes FCS	10%
Hitze-inaktiviertes Pferdeserum	5%
Natriumpyruvat (10 mM)	1%
L-929-konditionierter Überstand	4%
D-Glucose (20 mM)	0,5%
HEPES (25 mM)	1%
Penicillin/Streptomycin	100 Units bzw. 100 μ g/mL

MEM20 mit Earles Salt (Kulturmedium für Caco-2-Zellen)**Zusammensetzung**

MEM-Grundmedium kommerziell von PAA Laboratories verwendet

Hitze-inaktiviertes FCS (Gibco)	20%
L-Glutamin	1%
NEAA (non-essential amino acids) 100x	1%
Penicillin/Streptomycin	100 Units bzw. 100 μ g/mL

Leishmania*-Medium (Kulturmedium für promastigote *Leishmania major*-GFP)*Zusammensetzung**

RPMI 1640 Grundmedium vom RKI hergestellt

(alternativ kommerziell von Gibco (Invitrogen) verwendet)

Hitze-inaktiviertes FCS (PAA, Laboratories)	10%
BMM Φ -konditionierter Überstand	15%
Natriumpyruvat (10 mM)	1%
Hosmen Lösung B	0,25%, (Berens und Marr, 1978)
D-Glucose (20 mM)	0,5%
HEPES (25 mM)	1%
Penicillin/Streptomycin	100 Units bzw. 100 μ g/mL

2.7 Wasser und Puffer

Wasser (H₂O)

Sofern Wasser verwendet wurde, handelte es sich um sogenanntes ELGA-Ultra (Hersteller: ELGA LabWater PURELAB Ultra Genetic) Wasser. Diese Spezifikation beschreibt doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) mit einer Leitfähigkeit von 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, welches für gentechnische Arbeiten, zur Bereitung von Zellkulturmedien und -puffern verwendet werden kann. Es ist nahezu endotoxinfrei (< 0,001 EU/mL).

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Zusammensetzung (1x)

NaCl	137,0 mM
KCl	27,0 mM
KH ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	1,8 mM
NaHPO ₄ × 2 H ₂ O	8,0 mM
gelöst auf 1 L ddH ₂ O	

Der Puffer wurde steril hergestellt. Die Lösung hat einen pH-Wert von 7,2 und wird nachfolgend als PBS bezeichnet.

Tris Buffered Saline (TBS)

Zusammensetzung (10x)

Tris	24,2 g
NaCl	80,0 g
gelöst auf 1 L ddH ₂ O	

Der pH-Wert wird auf 7,6 eingestellt.

TBS 1x wird durch 1:10 Verdünnung aus TBS 10x hergestellt

Der Puffer wurde mit sterilem PBS hergestellt und diente als Grundlage für Blocklösungen oder Waschpuffer für die Western Blot-Analyse.

2.8 Lösungen

Lösungen zum Ablösen von Zellen

Zusammensetzung von 0,5% Trypsin/EDTA (10x)

NaCL	146,55 mM
Na-EDTA	4,81 mM
Trypsin	0,21 mM

Die Lösung wird durch Verdünnung (1:10) mit PBS gebrauchsfertig hergestellt und in der Zellkultur verwendet.

Lösungen und Puffer für Durchflusszytometrie

Zusammensetzung der Propidiumjodid-Lösung (PI-Lösung)

Hitze-inaktiviertes FCS (Gibco)	2,5%
NaN ₃ (10%ige Stocklösung)	0,1%
EDTA	2 mM
Propidiumjodid	1 µg/mL
gelöst in PBS	q.s.

Zusammensetzung der DAPI-Lösung

4',6-Diamidin-2-phenylindol	3 µM
gelöst in PBS	q.s.

Zusammensetzung des Facs-Puffers

Hitze-inaktiviertes FCS (Gibco)	0,5%
gelöst in PBS	q.s.

Lösung für Mikroskopie

Zusammensetzung des Eindeckmittels Moviol

Glycerol	6,0 g
Moviol 4-88	2,4 g
ddH ₂ O	6,0 mL
Trispuffer (pH 8,5)	12 mL
Dabco (Triethylendiamin)	0,1%

Die Eindecklösung wurde in zwei aufeinanderfolgenden Herstellungsschritten zubereitet. Zunächst wurden Glycerol und Moviol im ddH₂O aufgeschwemmt. Anschließend wurden 12 mL Trispuffer dazugegeben, ca. 4 h gerührt und alles gut durchmischt. Nach Zusatz von 0,1% Dabco wurde bei 50 °C über Nacht

weitergerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung bei 2000 x g für 20 min zentrifugiert, nur der Überstand aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Lösungen und Puffer für Western Blot- Analyse

Zusammensetzung (5x)

Tris-HCl (pH 6,8)	250 mM
SDS-Pellets	10%
Glycerol	50%
Bromphenolblau	0,05%
β-Mercaptoethanol	500 mM
(frisch zusetzen)	Für 1 mL Probenpuffer 125 µL zusetzen

Zusammensetzung SDS-Laufpuffer

Tris	250 mM
SDS-Pellets	4%
Glycin	1,92 mM
gelöst auf 1 L ddH ₂ O	

Zusammensetzung Towbin-Transferpuffer

Tris	3,02 g
Methanol	200 mL
Glycin	14,4 g
gelöst auf 1 L ddH ₂ O	

Zusammensetzung Blocklösungen

Blocklösung I (iNOS, Caspase 3)	5% Magermilchpulver in PBS
Blocklösung II (Cleaved-Caspase 3)	5% Magermilchpulver in TBS (1x)+0,1% Tween20®

Zusammensetzung der Waschpuffer

PBS-T (iNOS, Caspase 3)	5% Magermilchpulver in PBS
TBS-T (Cleaved-Caspase 3)	5% Magermilchpulver in TBS (1x)

Lösungen für Zelllyse

Zusammensetzung Lysepuffer für J774-G8-Makrophagen (iNOS-Aufbereitung)

Lösung I (für 50 mL, gelöst in PBS)

10 mM Tris-HCl (pH 7,2)	500 μ L
150 mM NaCl	438,3 mg
1% Triton® X-100	500 μ L
1% Na-Doc	500 mg

Lösung II aus: Complete Ultra Tablets EDTA-free 25x (Roche) hergestellt

Für 1 mL Lysepuffer: 960 μ L Lösung I + 40 μ L Lösung II

Zusammensetzung Lysepuffer für A549-Zellen (Caspase-Aufbereitung)

Lösung I (für 50 mL, gelöst in PBS)

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)	500 μ L
150 mM NaCl	438,3 mg
1% Triton® X-100	500 μ L

Lösung II aus: Complete Ultra Tablets EDTA-free 25x (Roche) hergestellt

Für 1 mL Lysepuffer: 960 μ L Lösung I + 40 μ L Lösung II

Lösungen zum Einfrieren von Zellen

Zusammensetzung Einfrierlösung I (Freeze I)

Hitze-inaktiviertes FCS (für Leishmanien 40%
von PAA, für alle anderen Zellen von
Biochrom oder Gibco)

R0 q.s.

Zusammensetzung Einfrierlösung II (Freeze II)

DMSO (steril filtriert) 20%

R0 q.s.

Die beiden Lösungen sind gebrauchsfertig und werden zur Vorbereitung auf den Einfrierprozess im Verhältnis 1+1 (= Einfriermedium) gemischt. 1×10^6 Zellen/mL Einfriermedium wurden in CryoTubes® in Flüssigstickstoff eingefroren und so für längere Zeit gelagert.

2.9 Stabilitätsuntersuchungen

2.9.1 HPLC-Untersuchungen

Die Substanz *trans*-Resveratrol (Sigma-Aldrich) wurde als Stocklösung sowohl in Methanol als auch in DMSO zu je 20 mg/mL gelöst. Die Stocklösung wurde anschließend so verdünnt, dass Probelösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL resultierten. Diese Lösungen wurden jeweils 1 h, 2 h oder 4 h bei ca. 40 °C mit UV-Licht bestrahlt. Zur Kontrolle wurde je eine nicht-bestrahlte Lösung bei RT bzw. bei 40 °C mitgeführt. Die verfärbten Lösungen wurden direkt nach den angegebenen Zeiten per HPLC analysiert. Die Bedingungen wurden reproduzierbar für drei unabhängige Experimente eingehalten (Tab. 2-5).

Tab. 2-5: Bedingungen der HPLC-Analyse für Resveratrol

Anlage	Pumpe/ Detektor	Säule	Mobile Phase	Methode	UV- Lampe
KNAUER mit EuroChrome ® 2000 Software	HPLC- Pumpe 64/ Variabler UV-Wellen- längen- Detektor	RP-C18 Eurosphere- 100C 18,5 µm + Vorsäule	50 : 50 (Wasser: MeOH)	2 mL/min; 30 min; 295 nm/ 310 nm	Abstand zur Probe 50 cm; 365 nm

Für die HPLC-Untersuchungen sind alle *trans*-Resveratrol-Lösungen mit Ausnahme der Kontroll-Lösung mit einer UV-Lampe bei 365 nm bestrahlt worden. Die Lösungen wurden bis zur Untersuchung an der HPLC-Anlage lichtgeschützt gelagert, um die Rückumwandlung von generiertem *cis*-Resveratrol zu verhindern. Je 20 µL der zu untersuchenden Analysenlösung wurden in die Ladeschleife der Anlage gespritzt und mittels RP-C18-Säule aufgetrennt. Das Eluat wurde bei Umgebungstemperatur bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen überwacht (295nm/310nm).

2.9.2 Massenspektrometrische Untersuchungen von Resveratrol

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden im Fachbereich Chemie in der MS Core Facility an der FU Berlin durchgeführt. Für die Messung und Erstellung der Daten wurde ein ESI-TOF-Gerät (Elektrosprayionisierung-Flugzeitmassenspektrometer) verwendet.

ESI-TOF: Darstellung der Spektren mit "Counts (%) vs. Mass-to-Charge (m/z)" unter dem Graphen. Die Probe wurde mit einem Agilent 6210 ESI-TOF, Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA, vermessen. Die Flussrate betrug 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, die Sprayspannung 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen $[\text{M}+\text{H}]^+$ optimiert. Für die Analyse der *trans*-Resveratrol-Lösungen wurde die Ionenquelle im positiven Modus zur Fragmentierung der Vorläuferionen betrieben und der Massenbereich von 50 bis 460 m/z gescannt.

2.10 Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Für eine längere Lagerung wurden die Leishmanien (*L. major*-GFP) bzw. Zellen (J774-G8-Makrophagen, A549-Zellen, L929(CSF)-Zellen) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Dazu wurden sie in der logarithmischen Wachstumsphase der Kultur entnommen und in sterile 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Suspensionen wurden abzentrifugiert (Leishmanien bei 700 $\times g$, J774-G8, A549 und L929(CSF)-Zellen bei 200 $\times g$, 4 °C, 10 min) und in 10 ml 4 °C kaltem PBS aufgenommen. Die Anzahl der Parasiten bzw. Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer (vgl. Abschnitt 2.12) bestimmt, auf 1×10^6 lebende Parasiten/Zellen pro Milliliter (Diskriminierung mittels Trypanblau) eingestellt und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium (vgl. Abschnitt 2.8) aufgenommen, suspendiert und in Kryoröhrchen portioniert. Die Einfrierröhrchen wurden sofort in einen Nalgene® Nunc Cryo 1 °C Freezing Container überführt und bei -70 °C langsam eingefroren. Der hohe Proteinanteil im Einfriermedium und das langsame Einfrieren verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellstruktur zerstören könnten. Nach 2-3 Tagen bei -70 °C wurden die Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -170 °C eingelagert (nach Kram, 2008).

2.11 Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Parasiten bzw. Zellen (*L. major* GFP, J774-G8 Zellen, L929(CSF)-Zellen, A549, Caco-2) wurden schnell bis 4 °C aufgetaut. Die erhaltene Parasiten- bzw. Zellsuspension wurde sodann in 50 mL-Zentrifugenröhrchen übertragen und mit 4 °C kaltem Kulturmedium tropfenweise (bis zu einem Volumen von ca. 5 mL) unter ständigem Durchmischen versetzt. Durch die langsame Zugabe wurde der DMSO-Anteil sukzessive aus dem Einfriermedium ausverdünnt. Auch konnten sich die Parasiten/Zellen so dem sich ändernden osmotischen Druck und den neuen Kulturbedingungen

bestmöglich anpassen. Anschließend wurde weiter 4 °C kaltes Kulturmedium zugegeben (Endvolumen ca. 10 mL) und die Parasiten bzw. Zellen abzentrifugiert (Leishmanien bei 700 x g, J774-G8, A549 und L929(CSF)-Zellen bei 200 x g, 4 °C, 10 min). Danach wurde das Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und nach den jeweiligen Erfordernissen auf Zellkulturschalen oder in Zellkulturflaschen überführt und kultiviert.

2.12 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Zur genauen Einstellung auf eine definierte Zellzahl wurden die im Labor üblichen Zählkammern (Neubauer-Zählkammer) verwendet. Sie dienen der präzisen Bestimmung der Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Zellsuspension. Die in der Arbeit verwendeten Zellen (A549, BMMΦ, L929-(CSF)-Fibroblasten und J774-G8) wurden zur Lebend-Tot-Diskriminierung in einer 1:1-Mischung mit Trypanblau-Lösung (0,4% [w/v], steril filtriert, Gibco) angefärbt und unter dem Mikroskop visuell ausgezählt. Trypanblau dringt passiv in die Zellen ein, wird aber von lebenden Zellen wieder aktiv aus dem Zytoplasma herausgeschleust.

Für die Bestimmung der Anzahl der Leishmanien wurden die Parasiten nicht mit Trypanblau angefärbt, sondern mittels Formaldehydlösung immobilisiert, da es sich um die promastigote, begeißelte und damit bewegliche Form des Erregers handelte. Bei sorgfältiger Kultur bleibt der Anteil der toten Parasiten sehr gering und zudem garantiert das Verhältnis von 1:8 (Makrophagen zu Parasiten) in Infektionsversuchen einen deutlichen Überschuss des Parasiten und damit eine erfolgreiche Infektion der Zellen. Die Leishmanien-Suspension wurde in einem Mischungsverhältnis von 1+1 mit Formaldehydlösung (1% in PBS) behandelt. Nach etwa 5 min waren die Parasiten in der Zählkammer erstarrt und konnten ausgezählt werden. Die Zellen/Parasiten wurden pro Großquadrat gezählt und, wie in **Abb. 2-1** dargestellt, berechnet.

$$\text{Zellzahl/mL in der Probe} = \text{a) } \times \text{b) } \times \text{c) } \times 10^4*$$

- a) \sum Zellzahl aller Großquadrate/4 = Mittelwert der Zellzahl/Großquadrat
- b) Verdünnungsfaktor durch Trypanblau- oder Formaldehyd Zugabe
- c) Faktor der Vorverdünnung

* Der Faktor 10^4 ergibt sich als Kammerfaktor aus den Abmessungen der verwendeten Zählkammer

Abb. 2-1: Berechnung der Zellzahl in einer Suspension

2.13 Makrophagen-Infektion mit *Leishmania major*-GFP

Die Makrophagen (BMM Φ oder J774-G8) wurden mit Leishmanien im promastigoten, metazyklischen und infektiösen Stadium der post-logarithmischen Wachstumsphase in einer Suspension (Nacy und Diggs, 1981) infiziert. Die Infektion wurde im Verhältnis 1:8 von Makrophagen zu Leishmanien in R10-Medium durchgeführt, d. h. 1×10^7 Makrophagen/mL R10 und 8×10^7 *Leishmania major*-GFP Parasiten wurden in 15 mL-Zentrifugenröhrchen (Falcon) zusammengegeben und das Endvolumen pro Infektionsröhrchen auf 2 mL eingestellt. So war eine ausreichende Versorgung mit Medium garantiert. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur zentrifugiert (250 x g, 5 min), um den Parasiten-Makrophagen-Kontakt zu intensivieren und wurde anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ über die Dauer von 120-180 min inkubiert. Die Suspension wurde alle 30 min vorsichtig durchmischt, um die Infektion zu beschleunigen. Anschließend wurde die Parasiten-/Makrophagen-Suspension erneut zentrifugiert (200 x g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Der Anteil extrazellulärer Parasiten wurde durch Waschschriffe mit PBS nahezu vollständig entfernt. Schließlich wurden die infizierten Zellen nochmals pelletiert, in den entsprechenden Kulturmedien (für BMM Φ in R10-Medium, für J774-G8 in R5-Medium) resuspendiert und für die Testreihen portioniert (Infektion nach Kram, 2009).

Für die Anfertigung von Deckgläschenpräparaten mit infizierten Makrophagen wurde, wie in Abschnitt 2.19.3 beschrieben vorgegangen. Alternativ wurden Zytospinpräparate (vgl. Abschnitt 2.19.2) angefertigt.

2.14 Zytotoxizitäts-Assays

2.14.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde für jede Zellart in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Je Kavität wurden 5×10^4 Zellen/100 μL Medium eingesetzt und über Nacht ruhen gelassen. In der Folge wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Resveratrol (1,25-40 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 5,5$ -175,2 μM) behandelt und über 24 h (für A549-Zellen) bzw. 48 h (für BMM und J774-G8) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Für den Rotenon-Versuch wurden je Kavität 5×10^4 Zellen (A549 und J774-G8) eingesetzt, über Nacht ruhen gelassen und am nächsten Morgen über 30 min mit Rotenon behandelt (für A549 1 μM und 10 μM ; für J774-G8 1 μM , 10 μM und 100 μM).

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand und damit die Testsubstanz entfernt und die Zellen vorsichtig mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μL frischem Kulturmedium versetzt, um eine mögliche Reduktion des MTT durch die Testsubstanz zu vermeiden. Weder das dem Medium zugesetzte Phenolrot (pH-Indikator) noch die Serumproteine (FCS) stören die Messung (Hansen *et al.*, 1989).

Nachfolgend wurden 25 μL sterile MTT-Lösung [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma-Aldrich, 5 mg/mL PBS] in jede Vertiefung hinzupipettiert und die Mikrotiterplatte im Brutschrank bei 37 °C für 6 h inkubiert. Durch die Zugabe von 50 μL 20%iger SDS-Lösung/Well (SDS gelöst in H_2O , pH = 4,7) wurde die Reaktion gestoppt und die Farbkristalle über Nacht im Brutschrank bei 37 °C gelöst. Die Absorptionen wurden mit einem ELISA-Reader (Tecan-Reader) bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen, mit der Magellan-Software abgerufen und mithilfe von Microsoft Excel 2010 ausgewertet. Für die Darstellung der Daten wurde der MTT-Umsatz unbehandelter A549-, J774-G8- bzw. BMM Φ -Zellkontrollen als 100% definiert und die Messwerte der Proben behandelter Zellen dazu in Relation gesetzt.

2.14.2 Kristallviolett-Assay

Der Farbstoff Kristallviolett zählt chemisch zu den Triphenylmethanfarbstoffen. Die Färbung eignet sich ebenso wie der MTT-Assay zur Bestimmung der Viabilität von Zellen. Hierbei werden DNA-assoziierte Nukleoproteine unspezifisch

angefärbt. Die Intensität der Anfärbung korreliert mit der Anzahl der vitalen adhärennten Zellen (Reile, 1991).

In 96-Well-Platten wurden je Kavität $2,5 \times 10^4$ L929-Fibroblasten/100 μL Medium eingesetzt und über Nacht ruhen gelassen. In der Folge wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Resveratrol (2,5-25 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 11-109,5 \mu\text{M}$) behandelt und über 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach Inkubation der Fibroblasten mit Resveratrol wurde das Kulturmedium abgesaugt und die am Untergrund verbleibenden Zellen mit 1%igem Glutaraldehyd in PBS für 15 min fixiert. Bei der Fixierung wurden die Zellen durch Vernetzung der Membranproteine abgetötet, wodurch die nachfolgenden Arbeitsschritte zeitunabhängig durchgeführt werden konnten. Die Gewebestruktur der Zellen bleibt indes erhalten und es entsteht auf diese Weise eine Momentaufnahme der Zellpopulation.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die adhärennten Zellen mit Kristallviolett-Lösung (0,5% w/v in 20% Methanol) für 30 min im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet, mit 33%iger Essigsäure über 10 min lysiert und die Absorption bei 592 nm am Tecan-Reader vermessen.

2.15 Durchflusszytometrie (FACS)

Die FACS-Methode wurde einerseits verwendet, um intrazelluläre GFP-transfizierte Leishmanien zu detektieren bzw. um eine Lebend-Tot-Diskriminierung der Wirtszellen vorzunehmen. Andererseits diente sie der Detektion von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in der Tumorzelllinie A549. Hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies sowie oxidativer Stress *in toto* werden gemeinhin als Mediatoren in der Apoptoseregulation angesehen (Ott *et al.*, 2007).

Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Geräte der Firma Becton, Dickinson (BD) verwendet. Zum einen das FACSCalibur™; dieses verfügt über zwei Laser mit den Wellenlängen 488 nm und 635 nm. In der Regel stehen drei Sensoren für 530 nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585 nm (FL2) und > 650 nm (FL3) über den ersten Laser zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser kann ein weiterer Fluoreszenzparameter mit einer anderen Anregungswellenlänge zur Verfügung gestellt werden (FL4: 670 nm). Nach einer Verstärkung wird das optische Signal zunächst in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt (Gerätesoftware: CellQuest Pro Software 5.1).

Zum anderen wurde (nach technischem Ausfall des FACSCalibur™) das BD™ LSR II verwendet, welches über vier luftgekühlte Laser verfügt (355 nm, 409 nm, 488 nm, 633 nm). Mit dem Gerät können bis zu 12 Parameter gleichzeitig detektiert werden (Gerätesoftware: FACSDiva v6). Bei beiden Geräten sorgen unterschiedliche Filter, die den Detektoren vorgeschaltet sind, dafür, dass nur Licht einer bestimmten Wellenlänge erfasst und verstärkt wird.

Die gemessenen Parameter wurden über die FlowJo-Software v8.8.4 statistisch ausgewertet und zur zweckmäßigen Veranschaulichung entweder als Dot-Plot-Abbildung oder als Histogramm dargestellt. Säulendiagramme zur Wiedergabe der Häufigkeitsverteilung der entsprechenden Merkmalsausprägung wurden mit der Software Microsoft Excel 2010 oder GraphPad Prism 5.0® angefertigt.

2.15.1 Lebend-Tot-Diskriminierung von Makrophagen

Um die Viabilität der Makrophagen zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem Zellkern-Farbstoff PI behandelt. Propidiumjodid (PI) ist ein Farbstoff, der mit der DNA von Zellen interagiert, die eine gestörte Membranintegrität aufweisen. PI eignet sich zur Bestimmung der Zytotoxizität einer Testsubstanz. Auch lässt sich eine Aussage über mögliche Zellschädigungen durch Arbeitsschritte in einer Methode (Waschen, Ablösen, Zentrifugieren) treffen. PI färbt nur tote, respektive absterbende Zellen. Diese werden über eine Fluoreszenzemission (> 670 nm) durch die Anregung des Lasers bei 488 nm vermessen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen bei 4 °C zentrifugiert (200 x g, 10 min, 4 °C) und zweimal mit je 2 mL 4 °C kaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und abschließend in 300 µL kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Die Pellets wurden resuspendiert und bis zur Messung am FACS auf Eis gestellt. Die Propidiumjodid-Lösung (Endkonzentration im Tube: 0,33 µg/mL) wurde der Zellsuspension exakt 30 Sekunden vor der Messung am Durchflusszytometer (FACSCalibur™) zugesetzt. Je Probe wurden mindestens 10.000 Ereignisse vermessen und im Anschluss mit der FlowJo-Software v8.8.4 ausgewertet.

2.15.2 Lebend-Tot-Diskriminierung von *Leishmania major*-GFP

Um die Viabilität der *Leishmania major* GFP-Parasiten zu bestimmen, wurden promastigote Parasiten gezählt, mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 4 °C,

700 x g, 10 min) und auf eine Zellzahl von 1×10^6 Parasiten/ mL Kulturmedium eingestellt.

Anschließend wurden die Parasiten mit den Testsubstanzen (Amphotericin B $1 \mu\text{M}$ und Resveratrol $30\text{-}45 \mu\text{g/mL} \cong 131,4\text{-}196,9 \mu\text{M}$) über 48 h bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Nach der Behandlungszeit wurden die Parasiten zentrifugiert ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, $700 \times \text{g}$, 10 min), der Überstand verworfen und die Leishmanien in ca. 2 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet in $300 \mu\text{L}$ PBS aufgenommen und die Parasiten bis zur Messung am FACS auf Eis gelagert. Um den Anteil toter Parasiten zu bestimmen, wurden unmittelbar vor der Messung $50 \mu\text{L}$ PI-Lösung zur Diskriminierung von lebenden und toten Promastigoten zugegeben. Je Probe wurden insgesamt 20.000 Ereignisse vermessen. Die Messdaten wurden unter Verwendung der Software FlowJo v8.8.4 ausgewertet, wobei das GFP-Signal in der Fluoreszenz 1 und das PI-Signal in der Fluoreszenz 3 festgelegt war.

2.15.3 Nachweis von *Leishmania major*-GFP in infizierten Makrophagen

Die nach der Infektion (vgl. Abschnitt 2.13) gewaschenen Makrophagen (BMM Φ , J774-G8) wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen /mL eingestellt (Kulturmedium für BMM Φ : R10; Kulturmedium für J774-G8: R5). Je ein Milliliter der Suspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und für 24 h im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ruhen gelassen. Die phagozytierten Leishmanien wandelten sich während dieser Zeit in die intrazelluläre amastigote (unbegeißelte) Form um. Anschließend wurden die infizierten Makrophagen mit Resveratrol ($5\text{-}75 \mu\text{g/mL} \cong 21,9 \mu\text{M}\text{-}328,6 \mu\text{M}$) und der Positivkontrolle Amphotericin B ($1 \mu\text{M}$) versetzt, gut durchmischt und über weitere 48 h im Brutschrank behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert ($200 \times \text{g}$, 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und zweimal mit je 2 mL $4 \text{ }^\circ\text{C}$ kaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und abschließend in $300 \mu\text{L}$ kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Die Pellets wurden resuspendiert und bis zur Messung am FACS auf Eis gestellt. Um den Anteil toter von dem lebender Wirtszellen zu diskriminieren, wurden $100 \mu\text{L}$ PI-Lösung 30 Sekunden vor der Messung zugegeben, sorgfältig vermischt und die Leishmanien per FACS vermessen. Die Infektionsrate wurde anhand des Anteils GFP-positiver Wirtszellen im grünen Fluoreszenzkanal (FL-1) ermittelt. Der Anteil der PI-positiven Zellen wurde analog im roten Fluoreszenzkanal (FL-3) bestimmt.

Als Kontrollen wurden immer nicht-infizierte, infizierte, unbehandelte Zellen und Vehikelkontrollen mitgeführt (FACS-Methode nach Kram, 2009).

2.16 Bestimmung der Nitritkonzentration (Griess Assay)

Die Methode zur Nitritbestimmung basiert auf einer von Griess 1879 beschriebenen Farbreaktion, bei der die Anwesenheit von Nitrit-Ionen mittels einer Diazotierungsreaktion nachgewiesen werden kann.

Dabei reagiert NO_2^- mit Naphthylendiamin (Lösung A: 0,1% N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindichlorid) und Sulfanilamid (Lösung B: 1% Sulfanilamid in 5,0%iger ortho-Phosphorsäure) in einer Kupplungsreaktion im sauren Milieu zu einem rotgefärbten Diazoniumsalz. Die Lösungen A und B (Griess-Reagenz) wurden direkt vor Gebrauch im Verhältnis 1+1 gemischt und je 100 μL Zellkulturüberstand mit 100 μL Griess-Reagenz im Well zusammenpipettiert.

Das gebildete Produkt wurde nach 15 min spektralphotometrisch im ELISA-reader bei 540 nm vermessen. Medium- und Vehikelkontrollen dienen zur Ermittlung des Leerwertes.

2.16.1 NO-Modulation durch Resveratrol

Um die NO-Produktion in Makrophagen als Abwehrmechanismus zu induzieren, und die modulierenden Effekte von Resveratrol zu untersuchen, wurden J774-G8-Makrophagen mit einer Kombination aus rekombinantem, murinem Interferon- γ ($r\text{IFN-}\gamma$) und LPS in An- bzw. Abwesenheit von Resveratrol stimuliert.

Die erfolgreiche Aktivierung von 1×10^5 Zellen bei Inkubation mit 100 Units/mL $r\text{IFN-}\gamma$ und 10 ng LPS (*Salmonella friedenaus*) wurde in Vorversuchen ermittelt und die Stimuli für alle Versuche in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Für die NO-Inhibitionsversuche wurden die Makrophagen *erst* mit Resveratrol vorinkubiert und *anschließend* mit LPS/ $r\text{IFN-}\gamma$ stimuliert. Die Scavenging-Effekte sind durch die *gleichzeitige* Zugabe von Resveratrol mit dem Stimulans-Gemisch ermittelt worden. 100 μL der entsprechenden Zellkulturüberstände wurden nach Beendigung der Inkubationszeit (48 h) abgenommen, in 96-Well-Platten pipettiert und mit 100 μL Griess-Reagenz (vgl. Abschnitt 2.16) gemischt.

Die photometrische Messung erfolgte am Tecan-Reader bei 540 nm. Zur Auswertung wurde eine NaNO_2 -Kalibriergerade im angegebenen Konzentrationsbereich von 12,5 μM -600 μM erstellt.

2.16.2 Kinetik der NO-Freisetzung in Caco-2-Zellen

Für die Untersuchung zur Kinetik der NO-Freisetzung aus Caco-2-Zellen wurden undifferenzierte Caco-2-Zellen zur Differenzierung in 12-Well Platten ausgesät. 17-21 Tage nach der Konfluenz wurden die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen und mit 500 μL MEM20 (Caco-2-Wachstumsmedium), unter Zusatz von Cytomix (25 ng IL1- β /Well, 50 ng TNF- α /Well, 50 ng rIFN- γ (hu)/Well) zur NO-Bildung stimuliert. Zur Ermittlung von Leerwerten dienen Kontroll-Well mit 500 μL MEM20-Wachstumsmedium ohne Cytomix. Um die NO-Freisetzung kinetisch zu verfolgen, wurden zellfreie Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten (4-32 h) gesammelt und bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Bestimmung der NO_2^- -Konzentration, als Parameter für die induzierte NO-Bildung, wurde unter Verwendung des Nitric Oxide Colorimetric Assay Kits (Bio Vision) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Um den Einfluss von Resveratrol auf die NO-Bildung in Caco-2-Zellen zu untersuchen, wurden die Darmzellen parallel mit Resveratrol (5-50 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 21,9\text{-}219,1\text{ }\mu\text{M}$) über 28 h inkubiert und zwar entweder in Caco-2-Wachstumsmedium oder in Caco-2-Wachstumsmedium + Zytokin-Gemisch (25 ng IL1- β /Well, 50 ng TNF- α /Well, 50 ng rIFN- γ (hu)/Well). Die Überstände wurden abgenommen und die Konzentration an NO_2^- mithilfe des kolorimetrischen Assay Kits auf Basis der Griess-Reaktion bestimmt (vgl. Abschnitt 2.16).

2.17 Antioxidative Aktivität von Resveratrol im zellfreien Versuch

Zur Ermittlung der antioxidativen Aktivität von Resveratrol wurden zwei nasschemische, zellfreie Methoden (DPPH- und SNP-Assay) verwendet, die auf der Grundlage von Redoxreaktionen mit Radikalen basieren. Hierdurch sollte geklärt werden, inwieweit Resveratrol in Gegenwart von DPPH bzw. NO als Antioxidans wirkt.

2.17.1 DPPH-Assay

Der DPPH-Assay ermittelt die antioxidativen Eigenschaften von Testsubstanzen in Reaktion mit dem stabilen 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikal, welches unter Übertragung eines Wasserstoffatoms zum DPPH-H (2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazin) reduziert wird. Hierbei ändert sich die Farbe von violett zu gelb. Die Verringerung der Absorption bei 517 nm für das DPPH-Radikal ist Ausdruck

der antioxidativen Kapazität der Testsubstanz und wird hier für Resveratrol zugrunde gelegt.

Die methanolische DPPH-Lösung (unter Lichtschutz angesetzt und gelagert) mit einer Konzentration von 200 μM wurde allein oder in Kombination mit Resveratrol (0-30 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 0-131,4 \mu\text{M}$) bzw. den Positivkontrollen (Ascorbinsäure und α -Tocopherol je 0-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur in 96-Well-Platten inkubiert. Die Inkubationszeit wurde auf 10 min festgelegt und die Reduktion des DPPH-Radikals photometrisch bei 550 nm am Tecan-Reader vermessen. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnten reproduzierbare Absorptionswerte erhalten werden (Marxen *et al.*, 2007).

2.17.2 SNP-Assay

Die NO-Radikalfängereigenschaft von Resveratrol wurde mit SNP als NO-Donor untersucht. Eine 4,5 mM-SNP-Lösung wurde über einen Zeitraum von 3 h allein oder in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Resveratrol (2,5-50 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 11-219,1 \mu\text{M}$) inkubiert. Die Untersuchungen wurden mit Rücksicht auf die chemisch strukturellen Eigenschaften von Resveratrol in Lösung (vgl. Abschnitt 2.9) bei normalem Tageslicht ohne direkte Beleuchtung der Proben und bei Raumtemperatur durchgeführt. Die resultierenden Nitrit-Spiegel wurden mithilfe der Griess-Reaktion (vgl. Abschnitt 2.16) bei 540 nm photometrisch am ELISA-reader vermessen.

2.18 Caspase 3- und Caspase 8-Enzymaktivität in A549-Zellen

Die Apoptose zählt zu den wichtigen regulatorischen Vorgängen zur Aufrechterhaltung der Homöostase in multizellulären Organismen. Der nachfolgende Assay klärt, inwieweit der Mechanismus einer Resveratrol-induzierten Apoptose im Zusammenhang mit der Aktivierung von Caspasen steht.

Die Aktivität der Initiatorcaspase 8 und der Effektorcaspase 3 wurde mithilfe eines kolorimetrischen Testkits der Firma Genscript bestimmt. Das kolorimetrische Prinzip beruht auf der Spaltung des im Kit enthaltenen artifiziellen Caspase-Substrates DEVD-pNA. Das freigesetzte p-Nitroanilin (pNA) wird bei 405 nm am ELISA-reader vermessen. Die Aktivität der untersuchten Caspase ist hierbei direkt proportional zur Farbintensität.

4×10^6 Zellen/Well wurden in 6-Well-Platten kultiviert, mit unterschiedlichen Konzentrationen von Resveratrol ($5\text{-}50 \mu\text{g}/\text{mL} \cong 21,9\text{-}219,1 \mu\text{M}$) über 24 h inkubiert und anschließend lysiert (Lysepuffer-Zusammensetzung, vgl. Abschnitt 2.8). Mittels BCA-Assay (vgl. Abschnitt 2.23.1) wurde der Gesamtproteingehalt bestimmt. Für alle Proben wurden jeweils $125 \mu\text{g}$ Gesamtprotein zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Nach Zugabe des Caspase-Substrats (finale Konzentration im Well: $200 \mu\text{M}$) wurde die 96-Well-Platte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ im Brutschrank über 4 h inkubiert und anschließend die Fluoreszenz am Tecan Infinite M200 Pro bei 405 nm vermessen.

2.19 Histologische und zytologische Untersuchungen

2.19.1 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd (PFA)

Für die nachfolgend beschriebene Kernfärbung mit Bisbenzimid, bzw. Apoptose-Färbung Annexin und PI /vgl. Abschnitt 2.19.4) wurden die jeweiligen Zellen mit Paraformaldehyd entweder direkt im Well, auf Deckgläschen oder in Suspensionen fixiert. Hierzu wurde mit ca. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmem 2% igem Paraformaldehyd (in PBS) über 30 min fixiert, anschließend wurden die Untersuchungsobjekte in PBS kühl und dunkel gelagert und über mehrere Stunden das PFA ausgewaschen, um die Eigen- und Hintergrundfluoreszenz im Präparat zu vermindern.

2.19.2 Herstellung von Zytospinpräparaten aus Zellsuspensionen

Zur Herstellung von Zytospin-Präparaten wurden die Zellen in PBS gewaschen und die Zellzahl pro Probe auf etwa $2,5 \times 10^5$ Zellen/ $100 \mu\text{L}$ PBS eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je $150 \mu\text{L}$ bis maximal $200 \mu\text{L}$ in die Trichter der Zytospin-Probenkammer (Zytofuge Heraeus, München) pipettiert. Je nach Zellart wurde die Zentrifugalkraft angepasst. So wurden beispielsweise Leishmanien bei $700 \times g$, BMM Φ bei $250 \times g$ und mit Leishmanien infizierte BMM Φ bei $200 \times g$ jeweils für 10 min auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger zentrifugiert. Bei der Verwendung von nativem Material (infizierte BMM Φ) wurde das Material auf Superfrost®-Objektträger gebracht. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Präparate bei Raumtemperatur getrocknet und eingedeckt, bzw. je nach Aufgabenstellung zunächst gefärbt und anschließend eingedeckt.

2.19.3 Herstellung von Deckgläschenpräparaten

Für die Herstellung der Deckgläschenpräparate wurden 13-15 mm große sterile Deckgläschen in 24-Well-Platten eingesetzt und auf deren Mitte 100 μ L Zellsuspension in Form eines Tropfens gesetzt (Zellzahl für J774 und BMM Φ : 1×10^5 , für A549: 5×10^4). Anschließend ruhten die Zellen 1-2 h bei 37 °C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Danach wurde jedes Well auf 1 mL Endvolumen mit Medium aufgefüllt. Die Zellen adhärten und bildeten binnen 24 h ihre charakteristischen morphologischen Strukturen aus. Nach Ende der Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Deckgläschen gewaschen, entsprechend gefärbt und mithilfe eines Kanülenhakens aus dem Well gehoben. Die Deckgläschen wurden anschließend auf Objektträger gebracht und je nach Färbemethode mit den dazugehörigen Eindeckmitteln versiegelt.

2.19.4 Anfärbung von Deckgläschenpräparaten

Diff-Quik®-Färbung

Um die morphologischen Besonderheiten und Merkmale herauszustellen, wurde für die Anfertigung der Präparate eine Diff-Quik®-Schnellfärbung (modifiziert nach Pappenheim) genutzt. Das Set besteht aus drei Lösungen, dem Diff-Quik-Fix und den Färbelösungen I und II. Diff-Quik-Fix enthält Fast Green (0,002 g/L) in Methanol zur Fixierung der Zellen und Färbung der Nukleinsäuren in Zellkernen. Die Kombination aus der Färbelösung I (Eosin Y; 1,22 g/L; pH 6,6) und der Färbelösung II (Thiazin; 1,1 g/L; pH 6,6) führt schließlich zu den typischen Färberesultaten. Bei einer vollständigen Färbung erscheinen die Zellkerne durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot. Das Zytoplasma wird meistens bläulich eingefärbt, Parasitenkerne erscheinen ebenfalls leuchtend rot. Dennoch kann das Färberesultat deutliche Unterschiede aufweisen, da es durch den pH-Wert der Lösung und die Puffersubstanzen, die Färbezeit und die Art der Fixierung beeinflusst wird (Giemsa, 1902, Giemsa, 1904).

Die entsprechenden Zellen (infizierte und nicht-infizierte BMM Φ sowie J774-G8) wurden nach der Behandlung (48 h) mit PBS gewaschen. Zuerst wurde mit der Fixierlösung (Diff-Quik-Fix) inkubiert (5x vorsichtig überspülen). Anschließend wurden die Färbelösungen I und II in gleicher Weise vorsichtig über die Deckgläser gespült. Die überschüssige Farbe wurde mit PBS ausgewaschen und die Präparate wurden an der Luft angetrocknet. Zum Eindecken wurde je ein

Tropfen Xylol pro Deckglas verwendet und das Präparat mit Entellan® auf dem Objektträger fixiert.

Bisbenzimid-Färbung

Für diese fluoreszenzbasierte Zellkernfärbung wurden Deckgläschen wie oben beschrieben angefertigt (vgl. Abschnitt 2.19.3). Die Deckgläschen wurden nach vorangegangener Infektion (Makrophagen) bzw. nach erfolgter Differenzierung (Caco-2-Zellen) mit warmem (37 °C) PBS gespült und anschließend mit 2% PFA (500 µL/Well) über 20-30 min fixiert. Das PFA wurde gegen PBS ausgetauscht und die Deckgläschen dafür vorsichtig dreimal mit frischem PBS gewaschen. Über Nacht wurden die Präparate bei 4 °C in PBS zur Auswaschung des PFA gelagert. Für die darauffolgende Färbung wurde das PBS verworfen und durch eine Bisbenzimidlösung (0,25 µg/mL PBS; 500 µL/Well) ersetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Färbelösung wieder gegen PBS ausgetauscht, gründlich gewaschen und die Deckgläschen mit Moviol-Lösung auf Objektträgern eingedeckt.

Annexin-V / PI-Färbung

Die Fluoreszenzpräparate wurden mithilfe eines Färbekits (BioVision, Annexin V-FITC apoptosis kit) angefertigt. Nach 48-stündiger Inkubation mit Resveratrol (5-30 µg/mL \cong 21,9-131,4 µM) und den Kontrollsubstanzen (PMA/Ionomycin: 50 µM/10 µM bzw. H₂O₂: 25 µM/100 µM) wurde in jedem Well das Medium abgenommen und gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Färbelösungen auf die Zellen pipettiert und die Mikrotiterplatte für 10-15 min im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Direkt danach wurde die Färbelösung entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels PFA 2% (37 °C) über 20 min fixiert. Nach Ende des Fixierprozesses wurden die Deckgläser erneut mit PBS gewaschen, trocknen gelassen und mit Moviol-Lösung auf den vorbereiteten Objektträgern eingedeckt. Zur längeren Lagerung konnten die Präparate bei 4 °C und vor Licht geschützt problemlos aufbewahrt werden.

ZO-1-Färbung

Um die Differenzierung von Caco-2-Zellen zu verifizieren, wurden Deckgläser zur Vorbereitung auf die Fluoreszenzfärbung wie oben beschrieben hergestellt (vgl. Abschnitt 2.19.3 bzw. 2.5.5). Nach dem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für 1 h in Blocklösung inkubiert. Anschließend wurde die Blocklösung entfernt und 2,5 µg/mL des polyklonalen Kaninchen-anti-ZO-1-Antikörpers (Life Technologies; vgl. **Tab. 2-6**) zugegeben. Nach Abschluss der Erstinkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 6,5 µg/mL des Zweitantikörpers (polyklonal Ziege-Anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 488, Life Technologies, vgl. **Tab. 2-6**) für 30 min zugesetzt. Abschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen im Mikroskop besser detektieren zu können, wurde eine Kerngegenfärbung mit Bisbenzimid (s. o.) angefertigt. Die gefärbten Deckgläschen wurden auf Objektträger mit Moviollösung (vgl. Abschnitt 2.8) fixiert und mithilfe des Mikroskops Axio Imager Z1 dokumentiert.

2.20 Mikroskopie und fotografische Dokumentation von Zellpräparaten

Neben dem Axiostar plus (Zeiss), welches zur Ermittlung der Zellzahl (vgl. Abschnitt 2.12) verwendet wurde, erfolgte die Dokumentation und Analyse der angefertigten Deckgläschen- und Zytospinpräparate mit dem unmotorisierten Axioskop 2 (Zeiss). Bei letzterem Mikroskop steht neben der konventionellen Lichtmikroskopie eine Fluoreszenzoption zur Verfügung, mit der auch Zellen mit GFP-, Bisbenzimid- oder PE-Signalen durch Fluorochrom-markierte Antikörper, die spezifisch intrazelluläre oder Oberflächenstrukturen nachweisen, analysiert werden können. Zur Dokumentation wurde die Digitalkamera AxioCam mit anschließender Analyse durch die Software Axiovision 4.8 angewendet. Eine nachträgliche Bildbearbeitung erfolgte mit der weiterführenden Software Image J 1.47m (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Maryland, USA).

Für einige Fluoreszenzpräparate (z. B. A549, Apoptosefärbung mittels Annexin-V-FITC/PI) war es nötig, eine strukturierte Beleuchtung zur Erhöhung der Kontraste und der Auflösung in den Präparaten zu erreichen. Hierfür wurde das teilmotorisierte Mikroskop Axio Imager Z1 (Zeiss) mit Apotome-Funktion eingesetzt. Vor der Dokumentation wurden für jede Testreihe spezifische Einstellungen an Kontrollpräparaten festgelegt. Die Bilder sind im linearen Modus aufgenommen und zur Ermittlung der Grau- und Farbwerte sowie zu Gunsten

der Kontrastwertung mit Best Fit oder Min/Max in den Anzeige-Eigenschaften angepasst worden.

2.21 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

Für die Messung der intrazellulären Bildung von Sauerstoffradikalen in A549-Zellen bzw. J774-G8-Makrophagen wurde der Farbstoff 2',7'-Dichlor-dihydrofluorescein verwendet. Die Methode basiert auf der intrazellulären Oxidation des Moleküls und kann zur Beurteilung des oxidativen Stress-Status der Zellen herangezogen werden.

2.21.1 Mikroskopische Untersuchung zur ROS-Bildung

Für die mikroskopische Untersuchung zur ROS-Bildung wurden 5×10^4 A549-Zellen bzw. J774-G8-Makrophagen in 24-Well-Platten auf 13 mm-Deckgläschen mindestens 12 h ruhen gelassen und nachfolgend mit unterschiedlichen Testkonzentrationen von Resveratrol ($5\text{-}45 \mu\text{g/mL} \triangleq 21,9\text{-}197,2 \mu\text{M}$) und den Kontrollsubstanzen (Camptothecin $50 \mu\text{M}$, PMA/Ionomycin: $50 \mu\text{M}/10 \mu\text{M}$ und Staurosporin: $1 \mu\text{M}$) über 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2-3-mal mit lauwarmem PBS gewaschen. Dieser Waschschritt diente der vollständigen Entfernung der im Medium enthaltenen Esterasen, welche den Farbstoff bereits außerhalb der Zellen hydrolysieren können (Halliwell und Whiteman, 2004).

Nach Zusatz von $300 \mu\text{L}$ der $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Farbstofflösung (finale $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Konzentration im Well: $2 \mu\text{M}$) wurden die Zellen für 30 min im Dunkeln bei $37 \text{ }^\circ\text{C} / 5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen, um nicht umgesetzten Farbstoff zu entfernen.

Die Deckgläschen wurden mittels eines Kanülenhakens aus der 24-Well-Platte gehoben und mithilfe von Moviol-Lösung auf den Objektträgern eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbepreparate erfolgte durch das Axioskop 2 (Zeiss).

2.21.2 Durchflusszytometrische Untersuchung zur ROS-Bildung

Vor der Hauptuntersuchung (zur ROS-Bildung in A549-Zellen) musste aufgrund der starken Fluoreszenz am FACS BD™ LSR II zunächst der Farbstoff titriert werden. Dazu wurden 1×10^6 A549-Zellen als Suspension im Facs-Tube mit $300 \mu\text{L}$ der $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Farbstofflösung (finale $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Konzentration im Tube: $0,02\text{-}20 \mu\text{M}$) für 30 min Dunkeln bei $37 \text{ }^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Abschließend

wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert, in 300 μ L PBS aufgenommen und sofort am FACS BD™ LSR II vermessen.

Im Hauptversuch wurden 1×10^6 A549-Zellen als Zellsuspension in FACS-Röhrchen eingesetzt und mit Resveratrol (Konzentrationsbereich: 2,5-50 μ g/mL \cong 11-219,1 μ M) und den Kontrollsubstanzen (Camptothecin 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M bzw. Staurosporin 1 μ M und 4 μ M sowie H₂O₂ 100 μ M und 1 mM) über 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und wie in Abschnitt 2.21.1 beschrieben gefärbt (finale H₂-DCF-DA-Konzentration im Tube: 2 nM).

Die Auswertung erfolgte analog zu allen anderen durchflusszytometrischen Bestimmungen mit der FlowJo-Software v8.8.4.

2.22 Blockade der Atmungskette am Komplex I im Mitochondrium

Untersuchung in A549-Zellen

Für die Untersuchung zur Blockade der Atmungskette und dem Effekt der darauffolgenden Resveratrol-Behandlung wurden 5×10^4 A549-Zellen/100 μ L R5-Kulturmedium in die Mitte der 13-mm großen Deckgläschen in 24-Well-Platten gesetzt und ca. 2 h ruhen gelassen. Anschließend wurden die Kavitäten bis zu einem Volumen von 1 mL mit Medium aufgefüllt und die Zellen über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Behandlung mit 1 μ M oder 10 μ M Rotenon (Vehikel der 10 mM-Stocklösung: DMSO) erfolgte in einem ersten Schritt (Vorinkubation) über 30 min. Die Überstände wurden abgenommen und die Zellen mit 37 °C warmem PBS vorsichtig überspült, um die Vorinkubation zu stoppen. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit Resveratrol (5-30 μ g/mL \cong 21,9-131,25 μ M) über 6 bzw. 12 h behandelt. Nur mit Rotenon inkubierte (30 min) sowie nur mit Resveratrol behandelte Zellen wurden zur Kontrolle mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten Staurosporin (1 μ M) sowie Camptothecin (50 μ M) und als Vehikelkontrolle stets DMSO (0,2%). Die Zellen wurden ausschließlich in den Passagen 6-12 für die Versuche eingesetzt.

Die Präparate wurden je nach Fragestellung entweder mit H₂-DCF-DA (Untersuchung zur ROS-Bildung) oder mit Annexin-V/PI (Apoptose-Induktion) gefärbt (vgl. Abschnitt 2.21.1 und 2.19.4).

Untersuchung in J774-G8-Makrophagen

Analog zum A549-Experiment wurden 5×10^4 J774-G8-Makrophagen/100 μL R5-Kulturmedium, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auf Deckgläschen gesetzt und über Nacht kultiviert. Die Vorinkubation mit Rotenon erfolgte in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 100 μM über 30 min. Anschließend wurden die Zellen mit 37 °C warmem PBS vorsichtig gespült, um die Vorinkubation zu stoppen. Im darauffolgenden Schritt wurden die Zellen mit Resveratrol (5-30 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 21,9\text{-}131,4 \mu\text{M}$) über 6 bzw. 24 h behandelt. Nur mit Rotenon inkubierte (30 min) sowie nur mit Resveratrol behandelte Zellen wurden zur Kontrolle mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten Amphotericin B (1 μM) oder PMA/Ionomycin (50 $\mu\text{M}/10 \mu\text{M}$) und als Vehikelkontrolle stets DMSO (0,2%). Die Zellen wurden ausschließlich in den Passagen 5-15 für die Versuche eingesetzt. Die Präparate wurden je nach Fragestellung entweder mit $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ (vgl. Abschnitt 2.21.1) oder mit Annexin-V/PI (vgl. Abschnitt 2.19.4) gefärbt.

2.23 Western Blot-Analyse

Das Verfahren der Western-Blot-Analyse gründet auf der Detektion von Proteinen nach immunochemischer Methode. Die zu untersuchenden Proteine werden zunächst mittels Gelelektrophorese nach Größe und Ladung separiert, anschließend auf eine Trägermembran übertragen und mithilfe spezifischer Antikörper detektiert.

2.23.1 Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels BCA-Methode

Nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion werden bei dieser Methode Cu^{2+} -Ionen durch die in der Probe vorhandenen Proteine zu Cu^+ -Ionen reduziert, welche mit der Bicinchinoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden (Smith *et al.*, 1985). Anschließend kann die Absorption photometrisch vermessen werden und damit die Gesamtproteinmenge bestimmt werden.

Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) nach Angaben des Herstellers mitgeführt (Thermo Scientific, Pierce BCA Protein Assay Kit). Dazu wurde das gelöste BSA mit PBS verdünnt und in den Konzentrationen: 2,0, 1,5, 1,0, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ vermessen.

Bei den Zellproben wurden jeweils 25 μL in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert und alsbald das zuvor frisch gemischte Arbeitsreagenz

(200 μL /Well) hinzugegeben. Die Platte wurde bei 37 °C über 30 min im Brutschrank inkubiert, kurz abkühlen gelassen und bei 562 nm am ELISA-Reader spektralphotometrisch vermessen.

2.23.2 Zelllysate-Herstellung für iNOS-Expression

Für den Western-Blot-basierten Nachweis der iNOS-Protein-Expression wurde aus den J774-G8-Makrophagen ein Lysat hergestellt. Die Zellen wurden in eine 24-Well-Platte eingesetzt und für ca. 12 Stunden ruhen gelassen. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit Resveratrol (1-6,25 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 4,4\text{-}27,4 \mu\text{M}$) und anschließender Stimulation mit *r*IFN- γ /LPS- γ (100 U/mL bzw. 10 ng/mL) über 12 h wurde das Kulturmedium verworfen und gegen eiskaltes PBS ausgetauscht. Die Zellen wurden vorsichtig gewaschen und anschließend die adhärennten Zellen mit 100 μL Lysepuffer/Well versetzt, auf Eis gestellt und 40-60 min lysiert. Die vollständig suspendierten Lysate wurden in Eppendorfgläser überführt und zentrifugiert (9600 \times g, 10 min, 4 °C), um unlösliche Zellmembranbestandteile zu entfernen. Die Überstände wurden abgenommen und die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mittels BCA-Methode (2.23.1). Für den Western Blot wurden 20 μg Gesamtprotein je Probe eingesetzt.

2.23.3 Zelllysate-Herstellung für Caspase 3-Expression

Zur Detektion der Caspase-Expression via Western Blot wurden aus den verwendeten A549-Zellen Lysate hergestellt. Die Inkubation mit Resveratrol (5-50 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 21,9\text{-}219,1 \mu\text{M}$) und der Kontrollsubstanz Camptothecin (50 μM und 100 μM) erfolgte in einer 6-Well-Platte (4×10^6 Zellen/Well) über den Zeitraum von 24 h.

Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und die adhärennten Zellen mit 100 μL Lysepuffer/ Well versetzt, auf Eis gestellt und 40-60 min lysiert. Die vollständig suspendierten Lysate wurden in Eppendorfgläser überführt und abzentrifugiert (9600 \times g, 10 min, 4 °C), um unlösliche Zellmembranbestandteile zu entfernen. Die Überstände wurden abgenommen und die Bestimmung der Gesamtproteinmenge mit der BCA-Methode durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.23.1). Für den Western Blot wurden 100 μg Gesamtprotein benötigt. Für die kolorimetrische Caspase-Bestimmung wurden je Probe 125 μg Gesamtprotein eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.18).

2.23.4 Probenvorbereitung für Gelelektrophorese

Nach der Proteinbestimmung wurde die Proteinlösung (Lysat) mit 5x-Probenpuffer im Verhältnis 1:5 (1+4) verdünnt und bei 95 °C für 5 min aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben (falls nötig, mit einfachkonzentriertem Probenpuffer) auf ein bestimmtes Endvolumen eingestellt und solange auf Eis gelagert bis sie in die Probentaschen des SDS-Polyacrylamidgels gefüllt wurden. Der 1x-Probenpuffer konnte alternativ durch eine Verdünnung des 5x-Puffers mit PBS hergestellt werden. Der 5x-Probenpuffer wurde wie im Abschnitt 2.8 beschrieben hergestellt, steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Beta-Mercaptoethanol wurde erst frisch vor der Verwendung zugesetzt.

2.23.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld wurde mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970).

Die Auftrennung der Proteine erfolgt im elektrischen Feld nach ihrer Größe. Diese Trennung wird durch den Zusatz von SDS erreicht. Durch die Anlagerung überdeckt die negative Ladung von SDS die proteineigene Ladung. β -Mercaptoethanol wird zugegeben, um in Proteinen Disulfidbrücken zu freien Thiolen zu reduzieren.

Durch die Auftragung eines Markers (Banden mit definierter Molekülmasse) lassen sich die Proteine in der Probe der Größe und Masse nach zuordnen. Die Elektrophorese wurde in einer Mini-Gel-Apparatur der Firma PeqLab durchgeführt. Dieses Vertikalsystem ermöglicht die Durchführung von Zwei-Gel-Läufen. Für die iNOS-Detektion wurden 10%ige SDS-PAGE-Fertiggele verwendet, für die Caspase 3-Detektion 12%ige Fertiggele und für die Cleaved-Caspase 3-Detektion 8-16%ige SDS-Gele.

Um die Proben gleichmäßig im Sammelgel zu konzentrieren und einen nahezu gleichzeitigen Übertritt ins Trenngel zu ermöglichen, wurden zunächst 80 mV am Power Supply eingestellt. Nach etwa 30 min wurde die Spannung auf 120 mV erhöht.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die zu detektierenden Proteine spezifisch mittels Immunoblot-Methode (vgl. Abschnitt 2.23.6) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

2.23.6 Nachweis fixierter Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Nach Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.23.5) wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen mittels Semi-Dry Blotting transferiert und fixiert. Dieses Verfahren ermöglicht einen schnellen und effizienten Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen an zwei Graphitelektroden. Zwischen diesen Elektroden findet durch Anlegen eines Stroms der Proteintransfer vom Gel auf die Membran statt. Die Membran wurde vor dem Transferprozess zunächst für ca. 15 min in Transferpuffer äquilibriert.

Die ebenfalls mit Transferpuffer durchfeuchteten Filterpapiere (Blotting Papier) wurden auf die Anode gelegt. Darauf folgten die Membran, das Gel und abschließend wieder benetzte Filterpapiere. Dieser Sandwichstapel wurde vorsichtig angedrückt und durch Aufsetzen der Kathode der Transferprozess gestartet. Die Apparatur wurde erneut an das Power Supply angeschlossen und ein Stromfluss von 1,2 mA/cm² für 45-60 min angelegt. Nach dem Transferprozess wurde die Membran in die Blocklösung getaucht und für ca. 1 h sanft in der Lösung geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Über Nacht wurde die Membran bei 4 °C mit dem Erstantikörper inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran mit dem spezifischen Waschpuffer 2 mal für 15 min gespült (Caspasen mit TBS-T, iNOS mit PBS-T), abermals in der Blocklösung geschwenkt (2 x 15 min) und anschließend die Inkubation mit dem Zweitantikörper vorgenommen.

Für die Detektion wurde der zweite Antikörper genutzt, der an das Enzym Meerrettichperoxidase (Horseradish-peroxidase, HRP) gekoppelt ist. Durch die Inkubation der Membran mit dem Substrat des Entwicklungsreagenzes kommt es an der zu detektierenden Proteinbande, wo das fixierte Protein vorliegt, zu einer Chemilumineszenz-Reaktion. Bei dieser Oxidation entsteht Licht, dessen Intensität durch Zusatz von Verstärkern (Enhancern) erhöht wird. Die resultierende Chemilumineszenz der gewünschten Proteine und die Entwicklung der Membranen erfolgte mittels ECL-Detection-Kit (GE, Healthcare Life Sciences) auf X-ray-Film.

Tab. 2-6: Antikörper und Inkubationslösungen

Angegeben sind Antikörper und Inkubationslösungen für Western Blotting und Immunofluoreszenz-Färbungen.

Antikörper	Blocklösung	Verdünnung	Hersteller
Erstantikörper			
Anti-Caspase 3	5% MP in PBS-T	1:500	Abcam
Anti-iNOS (rabbit polyclonal to iNOS)	5% MP in PBS-T	1:200	Abcam
Beta-Actin (rabbit polyclonal to beta actin)	5% MP in PBS-T	1:2000	Abcam
Cleaved-Caspase 3 (rabbit mAb)	5% MP in TBS + 0,1% Tween® 20	1:1000	Cell Signaling
ZO-1	5% BSA in PBS-T	1:100	Life-Technologies
Zweitantikörper			
Polyklonal-Ziege Anti-Kaninchen (goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG-H&L (HRP))	5% MP in PBS-T	1:3000	Abcam
Polyklonal-Ziege-Anti-Kaninchen-Alexa Fluor® 488	5% BSA in PBS-T	1:300	Life-Technologies

2.23.7 Ablösen von Antikörpern von Nitrocellulose-Membranen

Aufgrund der unterschiedlichen Signalstärke der einzelnen Proteine war es teilweise nötig, verschiedene Proteine nacheinander auf der gleichen Nitrocellulose-Membran zu detektieren. Hierzu wurden die Membranen in einem sogenannten Abziehbad (Western Blot Recycling Kit, Alpha Diagnostic International) 10-15 min bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Die nunmehr antikörperfreie Membran wurde durch Waschen in PBS-T/TBS-T und

Inkubation mit der entsprechenden Blocklösung auf die Behandlung mit neuem Erst- und Zweit-Antikörper vorbereitet. Die Inkubation erfolgte wie in Abschnitt 2.23.6 beschrieben.

Das Prozedere wurde u. a. für die Detektion der aktiven Caspase 3- und der Caspase 3-, sowie der beta-Actin-Expression auf ein und demselben Blot angewendet.

2.24 Nachweis von Mycoplasma-Kontamination in Zelllinien

Die Gattung *Mycoplasma* (Klasse Mollicutes) bezeichnet sehr kleine, jedoch selbstständig vermehrungsfähige Bakterien, die parasitär leben. Die zur Auto-Replikation befähigten Prokaryonten sind sowohl beim Menschen als auch bei Tieren und Pflanzen für zahlreiche Krankheiten verantwortlich und leben intra- und extrazellulär (z. B. auf der Oberfläche von Epithelzellen), aerob bis fakultativ anaerob.

Etwa 15-35% aller tierischen und humanen Kulturen sind mit Mycoplasmen infiziert (Uphoff und Drexler, 2002) und diese Kontamination stellt ein schwerwiegendes Problem für experimentelle Versuche dar. Denn obwohl eine Zellkulturinfektion längere Zeit ohne offensichtliche Zellschäden andauern kann, so wird jedoch nahezu jede Funktion und Aktivität von eukaryotischen Zellen, vor allem der Zellstoffwechsel, einschließlich der phänotypischen Charakteristik und auch das normale Wachstum wesentlich beeinflusst. Dadurch werden experimentelle Ergebnisse und Schlussfolgerungen verfälscht beziehungsweise hergestellte biologische Produkte unbrauchbar.

Deshalb wurden die in der Arbeit verwendeten Zelllinien (exkl. BMMΦ) auf eine *Mycoplasma*-Kontamination überprüft. Dazu wurde der PlasmotestTM angewendet, ein zell-basierter kolorimetrischer Assay. In Gegenwart von Mykoplasmen wird der TLR 2, der auf der Oberfläche von sogenannten HEK-BlueTM-2 Zellen exprimiert wird, aktiviert. Dieser TLR 2 (Toll-like-Rezeptor 2) leitet in der Folge eine Signalkaskade ein, die zur Aktivierung von NFκB und anderen Transkriptionsfaktoren führt. Diese Transkriptionsfaktoren induzieren die Sekretion von sAP (sezernierte alkalische Phosphatase) in den Überstand, welche leicht durch resultierende Farbänderung (violett-blau) des HEK-BlueTM-Detektionsmedium nachgewiesen werden kann.

Die Methode dient ausschließlich zur Überprüfung der Kontamination von Zelllinien mit Mycoplasmen und wird daher nach Art und Durchführung nicht näher beschrieben.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien (A549, J774-G8, L929-Fibroblasten) sind regelmäßig auf eine mögliche *Mycoplasma*-Kontamination untersucht worden. Zu jeder Zeit waren die Ergebnisse negativ. Für die BMM Φ -Makrophagen und Caco-2-Zellen erfolgte keine Überprüfung, da die Zellen nicht über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten wurden, sondern immer frisch für jeden Versuch ausdifferenziert wurden.

2.25 Statistik

Alle Experimente wurden unabhängig und - sofern nicht anders angegeben - dreimal wiederholt und sind als Mittelwert \pm SD dargestellt. Paarvergleiche wurden mit dem Student's-*t*-Test durchgeführt. Multiple-Group-Vergleiche wurden unter Verwendung der Varianzanalyse (ANOVA) bzw. direkt zur Kontrolle mit dem post-hoc Dunnett-Test analysiert. Unterschiede wurden bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Alle Analysen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.0® Software, Inc. (San Diego, CA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Stabilität von *trans*-Resveratrol in Lösung

Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-*trans*-stilben) existiert als Stilben in zwei stereoisomeren Strukturen mit unterschiedlicher Anordnung der Substituenten an der Doppelbindung - einer *cis*- und einer *trans*-Form, die auch als (*Z*)- oder (*E*)-Isomere bezeichnet werden (**Abb. 3-1**). Resveratrol löst sich gut in Alkohol und organischen Lösungsmitteln, jedoch schlecht in Wasser. *Trans*-Resveratrol hat einen Schmelzpunkt von 260 °C und einen Siedepunkt von 489 °C. Die Molmasse beträgt 228,25 g/mol.

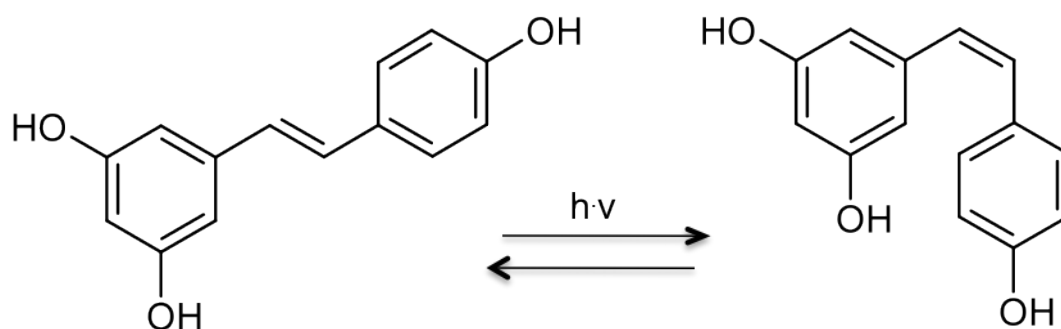


Abb. 3-1: Umwandlung von *trans*- zu *cis*-Resveratrol

Aus energetischen Gründen sind *trans*-Alkene stets die stabilere Form, können aber durch Photoisomerisierung temporär in die *cis*-Form umgewandelt werden, z. B. im Wein (Schmandke, 2002). Die Tatsache, dass *trans*-Resveratrol in Lösung durch Tageslicht und insbesondere durch Bestrahlung mit UV-Licht einer *cis/trans*-Isomerie unterliegt, ist insbesondere für Aktivitätsstudien mit dieser Verbindung von Bedeutung. Nach Aussage experimenteller Studien wird nach ca. 2-stündiger Bestrahlung ein Maximum der energetisch ungünstigeren *cis*-Form erreicht (Montsko *et al.*, 2008).

3.1.1 Verfärbung von Resveratrol in Lösung nach UV-Licht-Bestrahlung

Das Auftreten dieser Konfigurationsisomerie und die damit verbundenen unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften der Deskriptoren gab Anlass für Stabilitätsuntersuchungen einer Stocklösung (1 mg *trans*-Resveratrol/mL MeOH bzw. DMSO), welche bei 40 °C mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt wurde. Als Kontrolle diente eine bei Tageslicht

und RT gelagerte Lösung. Die Untersuchungslösungen verfärbten sich mit längerer Bestrahlungszeit zunehmend intensiver sowohl in Methanol als auch in DMSO (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Verfärbung von *trans*-Resveratrol in Lösung

Bedingungen	Farbe
Stocklösung, unbestrahlt	Farblos
Stocklösung, 1h UV, 40 °C	Hell-orange
Stocklösung, 2h UV, 40 °C	Orange-braun
Stocklösung, 4h UV, 40 °C	braun

3.1.2 HPLC-Untersuchung von *trans*-Resveratrol-Stocklösungen

Um Einblick in die Zusammensetzung der verfärbten Lösungen zu erhalten, wurden diese zunächst per HPLC analysiert. In den HPLC-Chromatogrammen der methanolischen Untersuchungslösungen wurde parallel dazu das Auftreten von weiteren Peaks mit ab- bzw. zunehmenden Flächen registriert (Tab 3-2). Dies deutete auf komplexere Vorgänge als nur auf eine photoinduzierte *cis/trans*-Isomerie hin.

Tab. 3-2: Bestrahlung einer Lösung von *trans*-Resveratrol in MeOH

Bestrahlungszeit [UV-Licht, 40 °C]	Retentionszeit [min]	Peakfläche [mV*min]	Peakfläche [%]
Keine Bestrahlung	1. Peak: 11,5	1315,3	100
1 h	1. Peak: 11,5 2. Peak: 14,3 3. Peak: 16,1	188,6 201,7 8,03	47,4 50,6 2,0
2 h	1. Peak: 5,6 2. Peak: 11,5 3. Peak: 14,3 4. Peak: 16,0	7,24 184,99 186,6 13,19	1,85 47,19 47,60 3,36
4 h	1. Peak: 2,7 2. Peak: 6,1 3. Peak: 11,5 4. Peak: 14,3 5. Peak: 16,0	1,55 20,89 85,91 95,79 16,09	0,70 9,49 39,01 43,49 7,31

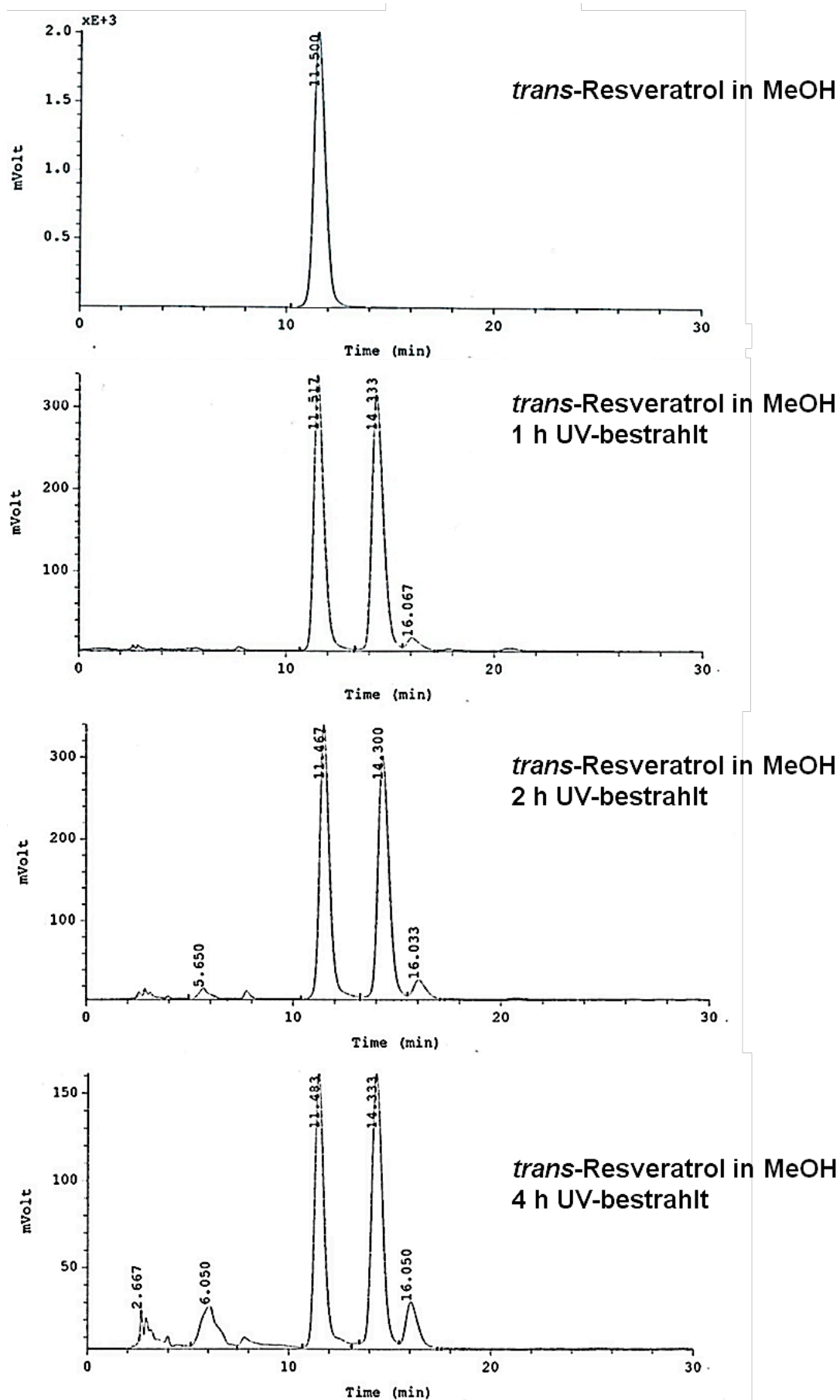
Im Gegensatz zur methanolischen Lösung waren bei der Lösung von Resveratrol in DMSO (s. Tab. 3-3) stets nur zwei Peaks detektierbar. Die Abnahme der Peakfläche für die Ausgangsverbindung *trans*-Resveratrol und das Auftreten eines neuen Peaks ließen die zu erwartende sensibilisierte *cis/trans*-Photoisomerisierung annehmen. Die maximale Umwandlung in die vermutete *cis*-Form war offensichtlich nach relativ kurzer Zeit erfolgt. Auch wenn in den HPLC-Chromatogrammen nur zwei Peaks angezeigt wurden, die Unterschiede in den Rt-Werten legten die Vermutung nahe, dass in Analogie zur methanolischen Lösung auch hier Sekundärreaktionen ablaufen, jedoch mit größerer Reaktionsgeschwindigkeit. Dies erklärt die unterschiedlichen Fingerprint-Chromatogramme in den verschiedenen Lösungsmitteln.

Tab. 3-3: Bestrahlung einer Lösung von *trans*-Resveratrol in DMSO

Bestrahlungszeit [UV-Licht, 40 °C]	Retentionszeit [min]	Peakfläche [mV*min]	Peakfläche [%]
Keine Bestrahlung	1. Peak: 17,93	111,87	100
1 h	1. Peak: 13,88	36,85	38,78
	2. Peak: 17,20	58,16	61,22
2 h	1. Peak: 13,13	32,71	39,37
	2. Peak: 16,17	50,37	60,63
4 h	1. Peak: 17,22	35,59	40,56
	2. Peak: 21,53	52,16	59,44

Die HPLC-Chromatogramme für die unterschiedlichen Bestrahlungszeiten sind beispielhaft für Resveratrol in MeOH in **Abb. 3-2** dargestellt. Die Verstärkung der Zersetzung bzw. Umwandlung der Testsubstanz wird mit zunehmender Bestrahlungszeit deutlich. Die Flächen der einzelnen Peaks sind in **Tab. 3-2** zusammengefasst.

Abgebildet ist eine Chromatogramm-Sequenz beispielhaft für drei unabhängige Experimente mit gleichem Resultat.

Abb. 3-2: HPLC-Chromatogramme von *trans*-Resveratrol in MeOH

3.1.3 Strukturanalyse der bestrahlten Resveratrol-Lösungen

Zur näheren Charakterisierung der Umwandlungs- bzw. Zersetzungsprodukte von *trans*-Resveratrol unter UV-Lichteinfluss wurden massenspektroskopische Strukturanalysen durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Lösungen mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation (Positiv-Modus) analysiert.

Das Massenspektrum von *trans*-Resveratrol zeigte den $[M+H]^+$ Peak als Basispeak bei m/z 229,08. Der Peak bei m/z 230,09 deutet auf ein ^{13}C -Kohlenstoff-Isotop des Quasimolpeaks hin und der Peak bei m/z 251,06 repräsentiert das Natriumaddukt $[M+Na]^+$. Die Fragmentierungsmuster sind für *trans*- und *cis*-Resveratrol identisch.

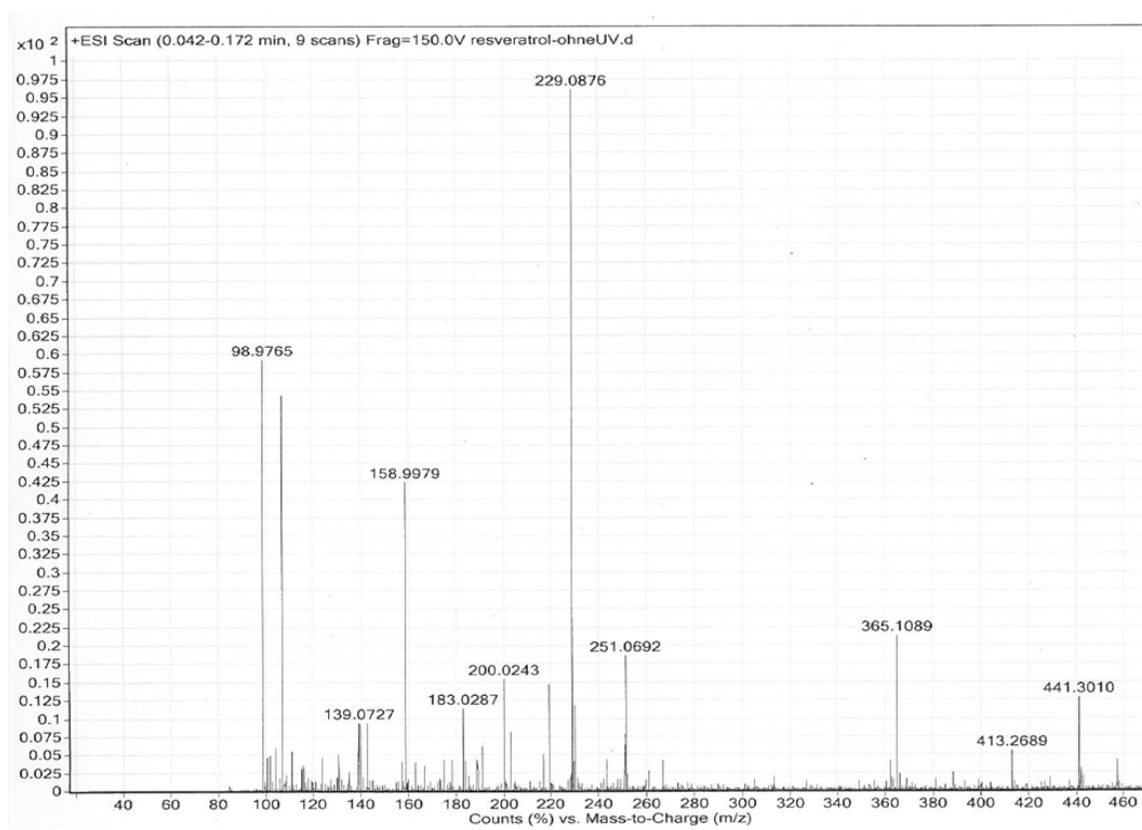


Abb. 3-3: ESI-Massenspektrum von *trans*-Resveratrol

Wurde die *trans*-Resveratrol-Lösung mit UV-Licht bestrahlt, so erschien im HPLC-Chromatogramm zusätzlich ein kleiner Peak, der im Massenspektrum bei m/z 227,07 den Peak mit der größten Massenzahl zeigte (s. **Abb. 3-4**). Dieses Umwandlungsprodukt weist ein ähnliches Fragmentierungsmuster auf wie die unbestrahlte Probe und manifestierte sich mit zunehmender Bestrahlungszeit.

Die Massendifferenz m/z von zwei zwischen den Quasimolpeaks $[M+H]^+$ 229,08 für *trans*-Resveratrol und $[M+H]^+$ 227,07 für die gebildete Verbindung deutet auf

den Verlust von zwei Protonen hin. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Substanz um ein Oxidationsprodukt handelt, bei der entweder Hydroxylgruppen zu Ketogruppen aufoxidiert wurden oder die Doppelbindung in eine Acetylenstruktur verändert wurde. Als dritte Möglichkeit kommt eine Photozyklisierung der *cis*-Form zu einem Phenantren-Derivat in Frage (Vicini *et al.*, 2004). Alle drei denkbaren Verbindungen führen zur selben Quasi-Molekülmasse von m/z 227,07 (Montsko *et al.*, 2008).

Die Analyse des Fragmentierungsmusters der bestrahlten Lösungen zeigte große Übereinstimmung über den gesamten Massenbereich mit einem Kontrollspektrum der unbestrahlten *trans*-Resveratrol-Lösung. Montsko *et al.* (2008) stellten durch spezielle Kalkulationen (mithilfe der Hyperchem Software) und Feinanalysen der Zerfallsmuster der verschiedenen Resveratrol-Lösungen fest, dass es sich bei dem Oxidationsprodukt um das Trihydroxydiphenylacetylen-Derivat handelt.

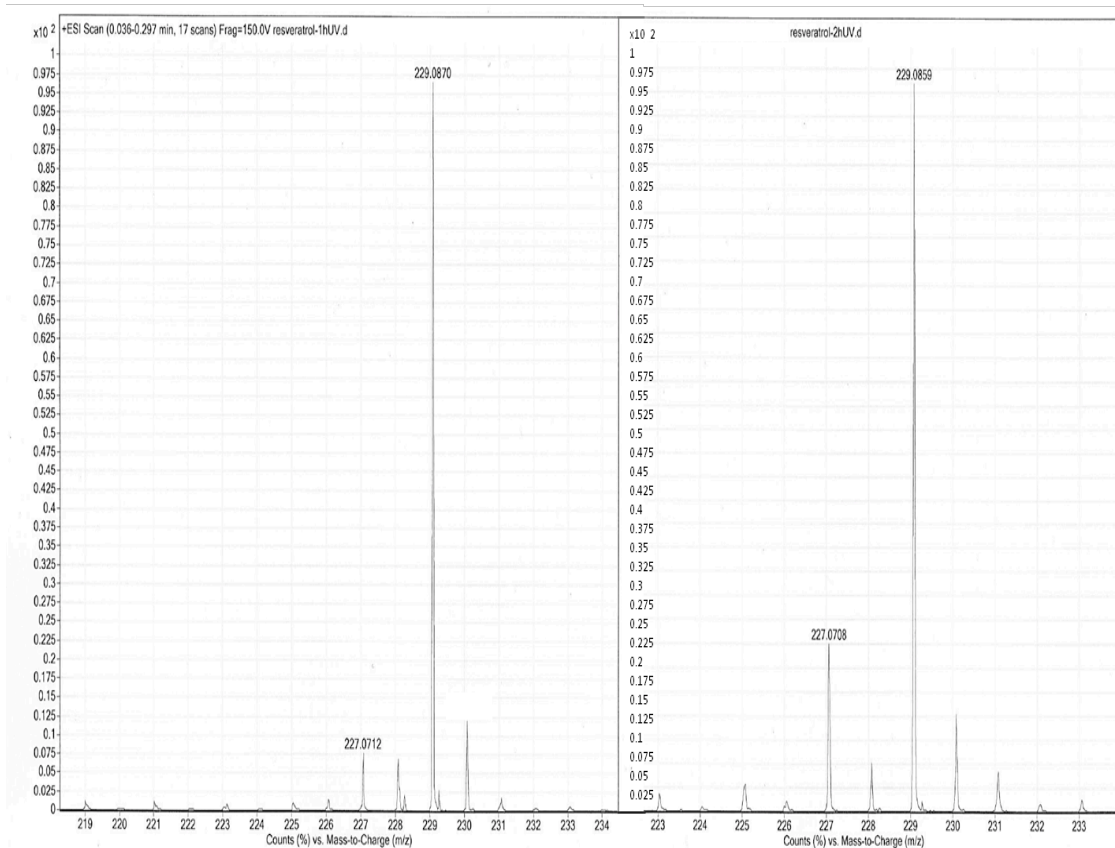


Abb. 3-4: Massenspektrum des 3,4',5-Trihydroxydiphenylacetylens

Dargestellt ist das Massenspektrum nach UV-Bestrahlung einer *trans*-Resveratrol-Lösung (links: 1h, rechts: 2h).

UV-Licht-Einstrahlung trägt demnach nicht nur zu Isomerisierungsreaktionen bei, sondern führt auch zu Oxidationsreaktionen. Diese Reaktionen sind nur schwer zu quantifizieren und sind abhängig von der Bestrahlungsintensität und -dauer.

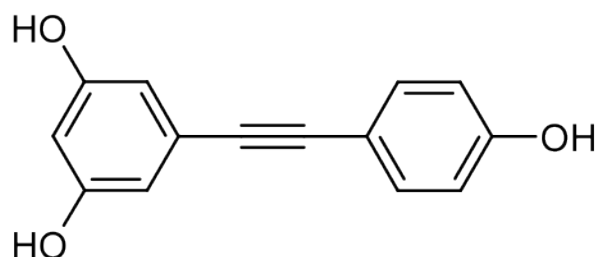


Abb. 3-5: Chemische Struktur von 3,4',5-Trihydroxydiphenylacetylen

Fazit

Um der ausgeprägten Photolabilität von Resveratrol Rechnung zu tragen, empfiehlt es sich, bei der Verwendung von *trans*-Resveratrol-Lösungen entsprechende Lagerungs- und Handhabungsweise zu beachten. Gerade für *in vitro*-Experimente ohne Lichtschutz können streng genommen keine Rückschlüsse auf Struktur- /Wirkungsbeziehungen gezogen werden. Photoinduzierte Isomerisierung und Oxidationsprozesse bedingen Testlösungen mit qualitativ und quantitativ variabler Zusammensetzung. Inwieweit das Wirkspektrum der Einzelverbindungen divergiert, ist zudem unbekannt. Für alle biologischen Aktivitätsstudien wurden die in **Tab. 3-4** aufgeführten Arbeitsweisen zur Lagerung und Handhabung streng eingehalten.

Tab. 3-4: Lagerung und Handhabung von *trans*-Resveratrol in Lösung

Anfertigung der Stocklösung (20 mg/mL) in DMSO

Aufbewahrung vor Licht geschützt und bei -20 °C

Auftauen und Verdünnung der Resveratrol-Stocklösung unter Lichtschutz

Inkubationsvorbereitung, d.h. Behandlung von Zellen mit Testlösungen am LAF ohne Beleuchtung

3.2 Leishmanien und Infektion von Makrophagen

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse zur antileishmaniellen Aktivität von Resveratrol dargestellt. Für diese Experimente war es notwendig Makrophagen

zuverlässig mit Leishmanien zu infizieren. Dazu wurden Parasiten der Art *Leishmania major*-GFP gewählt.

Für ihren biphasischen Lebenszyklus benötigen Leishmanien einen Überträger (Sandfliegen der Gattung *Phlebotomus* und *Lutzomyia*) und einen Wirt aus der Klasse der Wirbeltiere (Schafe, Hunde), u. a. auch den Menschen. Während die Parasiten in Sandfliegen extrazellulär als frei bewegliche Flagellaten existieren, transformieren sich die phagozytierten promastigoten Erreger in unbewegliche Amastigoten. Diese Form der Parasiten überlebt in Immunzellen wie Makrophagen und Monozyten. Die sich anschließende starke Vermehrung der amastigoten Parasiten in den Wirtszellen führt zum Aufbrechen und Auseinanderreißen der Wirtszellen und zur Freisetzung der Parasiten. Diese infizieren die vom menschlichen Immunsystem bereits rekrutierten Wirtszellen und setzen den Infektionskreislauf fort (vgl. Abschnitt 1.4.1).

Für die Beurteilung der antileishmaniellen Aktivität von Resveratrol wurden murine Makrophagen mit *Leishmania major*-GFP Parasiten infiziert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von Resveratrol behandelt. Die in der Arbeit verwendeten Parasiten gehören zur Art *Leishmania major*. Der spezielle Stamm (*Leishmania major*-GFP) war durch Transfektion (vgl. Abschnitt 2.5.7) in der Lage, ein grün-fluoreszierendes Protein zu exprimieren (Ha *et al.*, 1996). Die dadurch erhaltenen grünen Parasiten eignen sich für Untersuchungen sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Fluoreszenzmikroskopie und erlauben qualitative wie quantitative Aussagen. Das in der Arbeit verwendete FACS-basierte Testsystem (Kram, 2008) lässt aufgrund der guten Intensität und der Stabilität des grün-fluoreszierenden Proteins einen zuverlässigen Rückschluss auf die antileishmanielle Aktivität von Resveratrol zu und erlaubt einen hohen Probendurchsatz bei einem relativ geringen Zeitaufwand.

3.2.1 *In vitro*-Studien zur antileishmaniellen Aktivität von Resveratrol

Die Entdeckung und Charakterisierung von Naturstoffen mit antileishmanischer Wirkung ist schon seit mehr als zwei Jahrzehnten ein zentraler Forschungsansatz in unserem Arbeitskreis. Dabei sind die untersuchten Substanzen vor allem im Bereich der Polyphenole zu finden (Kolodziej *et al.*, 2001, Kiderlen *et al.*, 2001). Vor wenigen Jahren gelang dazu die Entwicklung eines *in vitro*-Testsystems zur Untersuchung von Naturstoffen auf antileishmanische Effekte (Kram, 2008). Die große Gruppe der Polyphenole beinhaltet jedoch nicht nur Tannine und

Flavonoide, sondern auch Stilbene und deren Derivate. Resveratrol war in den letzten Jahren verstärkt im Fokus experimenteller und klinischer Studien zu biologischen und pharmakologischen Aktivitäten. Für das Stilbenderivat wurde eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Eigenschaften beschrieben, welche in **Tab. 1-1** und **Tab. 1-2** zusammengefasst sind. Vor diesem Hintergrund erschienen Berichte über eine leishmanizide Wirkung gegen promastigote und intrazelluläre amastigote Parasiten bei gleichzeitig fehlender Zytotoxizität auf Wirtszellen (Kedzierski *et al.*, 2007) für uns besonders interessant. Es ist daher angebracht, das zentrale Testsystem und die Eignung der transfizierten Leishmanien kurz zu beschreiben.

3.2.2 Transfektion und Morphologie von *Leishmania major*-Parasiten

Die im Testsystem verwendeten promastigoten und intrazellulär amastigoten *L. major*-Parasiten wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst hinsichtlich der Stabilität des Fluoreszenz-Signals und auf ihre Infektiosität untersucht. Dazu wurden fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. **Abb. 3-6** zeigt eine Kultur von promastigoten Leishmanien sowie Zytospinpräparate von infizierten Makrophagen. Die Abbildung zeigt, dass die Detektion sowohl fluoreszenz-mikroskopisch als auch durchflusszytometrisch möglich ist.

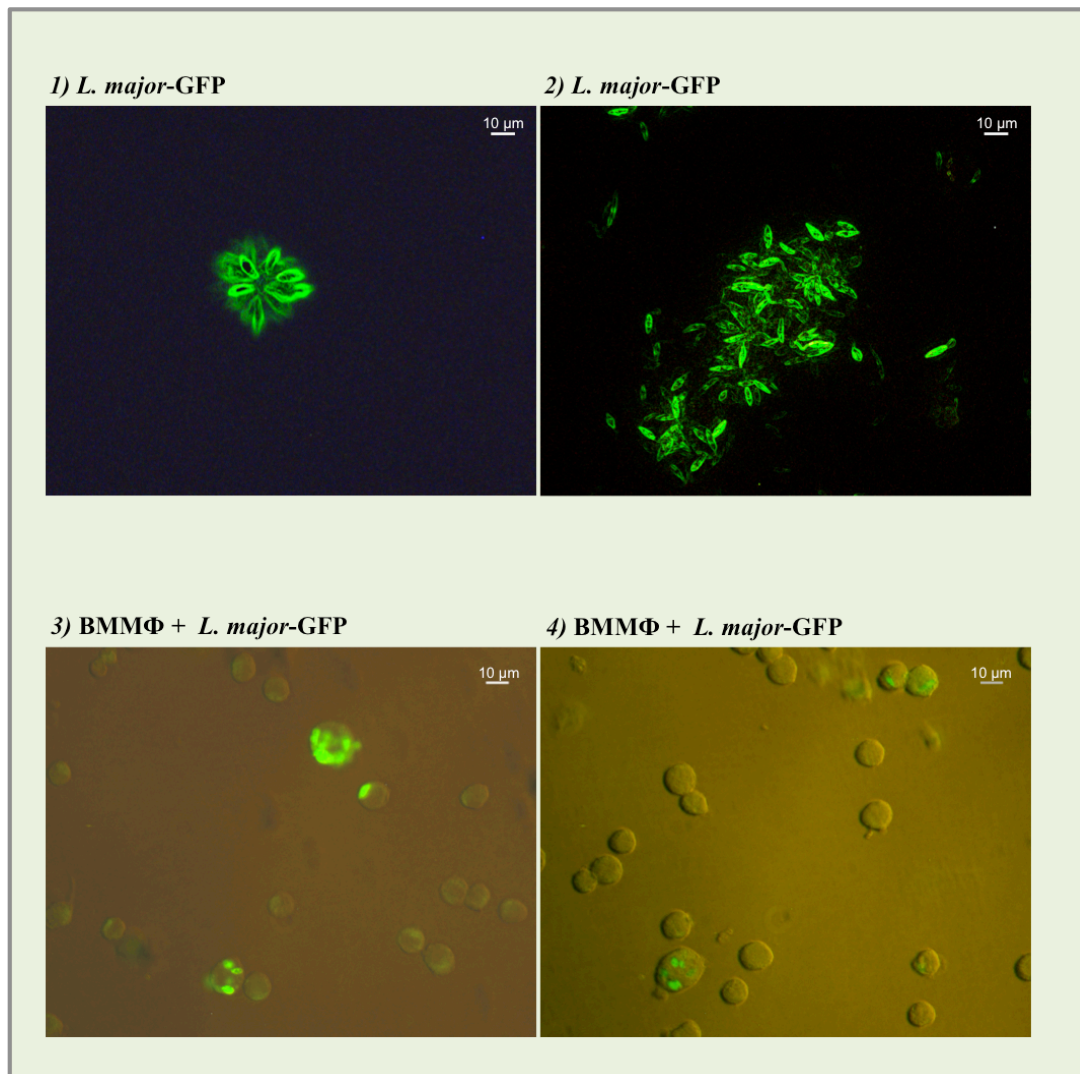


Abb. 3-6: Zytospinpräparate von *L. major*-GFP

Die Aufnahmen zeigen extrazelluläre promastigote und intrazelluläre amastigote *L. major*-GFP. Die Dokumentation erfolgte an einem Axioskop 2 mit Fluoreszenzoption. Die promastigoten, begeißelten Parasiten (Bilder 1 und 2) und ebenfalls die infizierten BMMΦ (Bilder 3 und 4) wurden in PBS gewaschen und anschließend in PFA (4%) fixiert. Die immobilisierten Proben wurden als Zytospinpräparate angefertigt und im FITC-Kanal mikroskopiert und dokumentiert. Für die Bilder 3 und 4 wurde zusätzlich zur Fluoreszenz der Phasenkontrast zugeschaltet, um die Wirtszellen zu lokalisieren.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Überprüfung der Infektion mittels zellmorphologischer und/oder Kernfluoreszenz-Färbung (s. **Abb. 3-7**, vgl. Abschnitt 2.19.4, Bisbenzimid-Färbung). Zur Dokumentation der erfolgreichen Infektion wurden entsprechende Aufnahmen zu jedem unabhängigen Experiment mitgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind beispielhaft und repräsentativ für alle Experimente und zeigen, dass eine Infektion von Makrophagen mit *L. major*-GFP stabil durchgeführt werden kann.

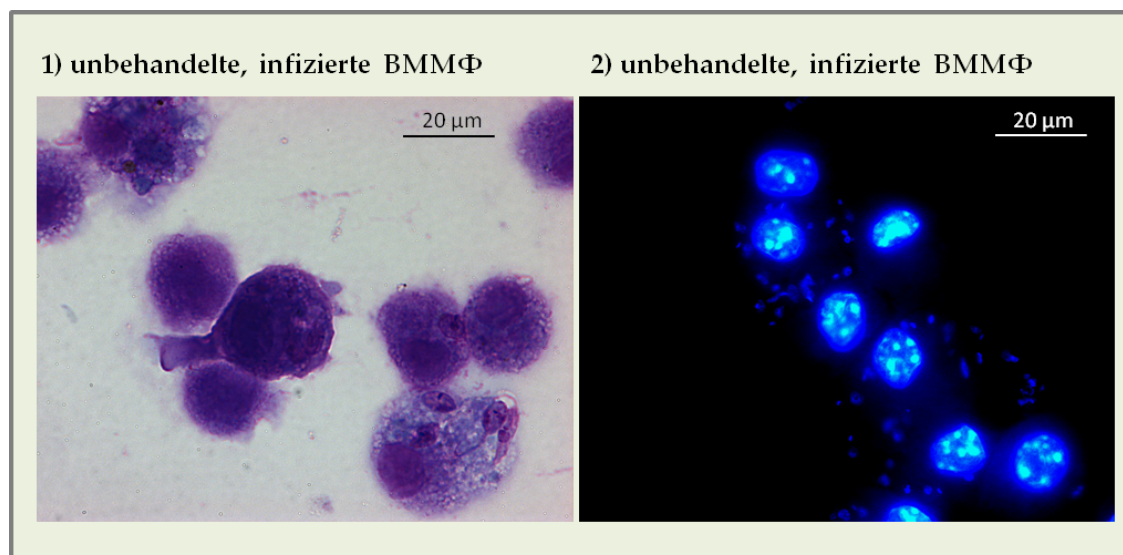


Abb. 3-7: Zytospinpräparate von infizierten BMMΦ

Die primären Mausmakrophagen wurden einerseits mittels Diff-Quik® (Bild 1) und andererseits mittels Bisbenzimid-fluoreszenzbasierter Kernfärbung (Bild 2) zur Sicherstellung einer erfolgreichen Infektion gefärbt und diskriminiert. Die Dokumentation erfolgte am Axioskop 2.

3.3 Antileishmaniellles Potential von Resveratrol

3.3.1 Aufbau und Prinzip der Durchflusszytometrie

Um den antileishmaniellen Effekt von Resveratrol zu untersuchen, wurde neben der Mikroskopie eine weitere etablierte Methode angewendet – die Durchflusszytometrie (Kram, 2008).

Bei der Durchflusszytometrie lassen suspendierte Einzelzellen in einer Trägerflüssigkeit an einem fokussierten Laserstrahl vorbeiführen und mittels geeigneter Detektoren vermessen. In Abhängigkeit der Größe, der Granularität und einer spezifischen Anfärbung senden die Zellen charakteristische Lichtsignale aus, die basierend auf Lichtstreuung, bzw. -beugung oder Fluoreszenz detektiert werden können. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Komplexität und der Größe der Zelle. Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung erlaubt sowohl eine quantitative Bestimmung von Zelloberflächen-Molekülen oder intrazellulären Proteinen als auch eine qualitative Analyse fluoreszenzbasierter Färbungen in homogenen und divergierenden Zellsuspension, da die Zellen durch laminare Strömung einzeln am Laserstrahl vorbeigeführt werden. Photoelektronenvervielfacher verstärken das einfallende Licht und geben die gemessenen Signale an einen Computer weiter. In **Abb. 3-8** ist der Aufbau eines

FACSCaliburs™ schematisch dargestellt. Die Auswertung der generierten Daten erfolgte mit einer vom Hersteller bereitgestellten gerätespezifischen Software.

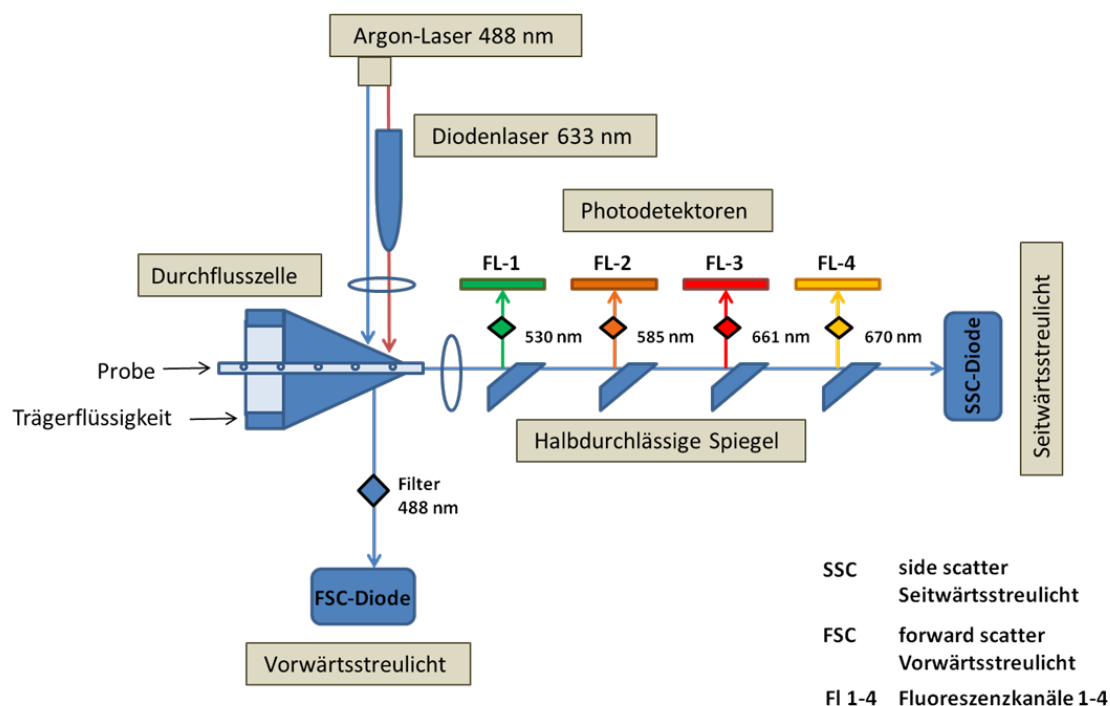


Abb. 3-8: Schematische Darstellung eines FACSCalibur™

Die fluoreszenzmarkierten Zellen der Zellsuspension werden in der Trägerflüssigkeit der Durchflusszelle vereinzelt, durch die Laser (488 nm und 633 nm) bestrahlt und dadurch angeregt. Durch das Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle entsteht Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht in Abhängigkeit von Zellgröße und Zellgranularität. Das reflektierte und emittierte Licht wird über halbdurchlässige Spiegel und verschiedene Filter in separate Wellenlängenbereiche aufgeteilt und von Photodetektoren (FL-1 bis FL-4) erfasst.

3.3.2 FACS-Analyse promastigoter *Leishmania major*-GFP

Die parallel zur grünen Eigenfluoreszenz des Erregers (vgl. **Abb. 3-6**) angefertigte Propidiumjodid-Kernfärbung bestätigte die antileishmanielle Aktivität von Resveratrol über die resultierende Zunahme der roten Kernfluoreszenz als Parameter für abgetötete Parasiten. Resveratrol zeigte allerdings nur in den höheren Konzentrationsbereichen eine ausgeprägte antileishmanielle Aktivität, wie aus der Vermessung des GFP-Signals als Parameter für die Viabilität des Parasiten hervorging. Erst ab einer Konzentration von $45 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\hat{=}$ $196,9 \mu\text{M}$) wurde die Intensität des GFP-Signals signifikant reduziert. Moderate Abtötungsraten konnten jedoch schon bei geringeren Konzentrationen ($\leq 35 \mu\text{g}/\text{mL}$ $\hat{=}$ $\leq 153,3 \mu\text{M}$) beobachtet werden (**Abb. 3-9**).

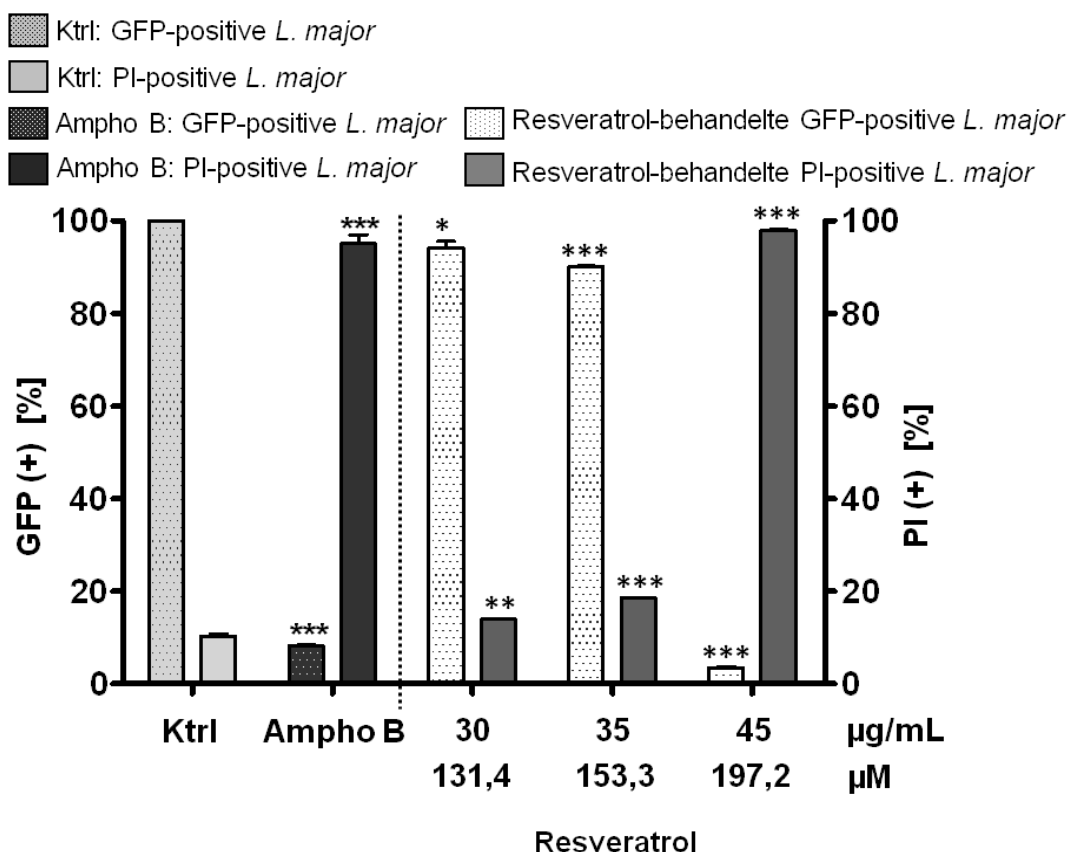


Abb. 3-9: Antileishmanieller Effekt von Resveratrol auf *L. major*-GFP

Dargestellt ist der antileishmanielle Effekt von Resveratrol auf promastigote *Leishmania major*-GFP. Die mit Resveratrol (30-45 µg/mL $\hat{=}$ 131,4-196,9 µM) behandelten Parasiten (48 h Inkubation) wurden am FACSCalibur™ direkt nach Zugabe von Propidiumjodid vermessen. Als Positivkontrolle diente Amphotericin B (1 µM). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-Test. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3.3.3 FACS-Analyse infizierter BMMΦ

Da promastigote Parasiten im Wirt nach der Übertragung durch den Vektor nur für eine sehr kurze Zeit existieren, richtet sich das klinische und pharmakologische Interesse vor allem auf die intrazelluläre, unbegeißelte Form der Leishmanien.

Im Nachfolgenden wurde daher der Effekt auf die amastigote Form der GFP-transfizierten *Leishmania major*-Parasiten untersucht. Hierzu wurden infizierte BMMΦ mit Resveratrol in verschiedenen Konzentrationen behandelt und anschließend durchflusszytometrisch vermessen.

In einem ersten Experiment wurden BMMΦ mit *L. major*-GFP Promastigoten infiziert und anschließend für 24 h bei 37 °C ruhen gelassen, um die

Transformation in die amastigote Form zu gewährleisten. Aus der nachfolgenden Exposition mit Resveratrol für weitere 48 h war eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion des GFP-Signals im Vergleich zur unbehandelten Population zu beobachten ($IC_{50} = 9,9 \mu\text{g/mL} \hat{=} 43,6 \mu\text{M}$). Amphotericin B diente hier als Positivkontrolle und wurde in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ mitgeführt (Abb. 3-10 A).

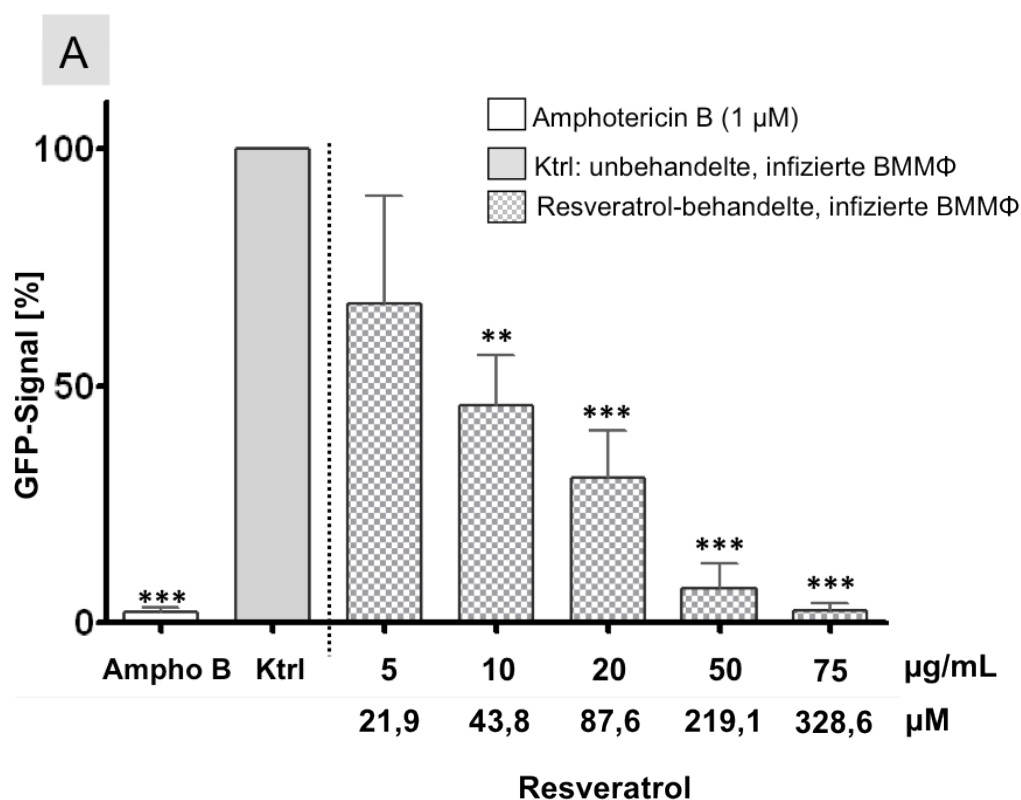
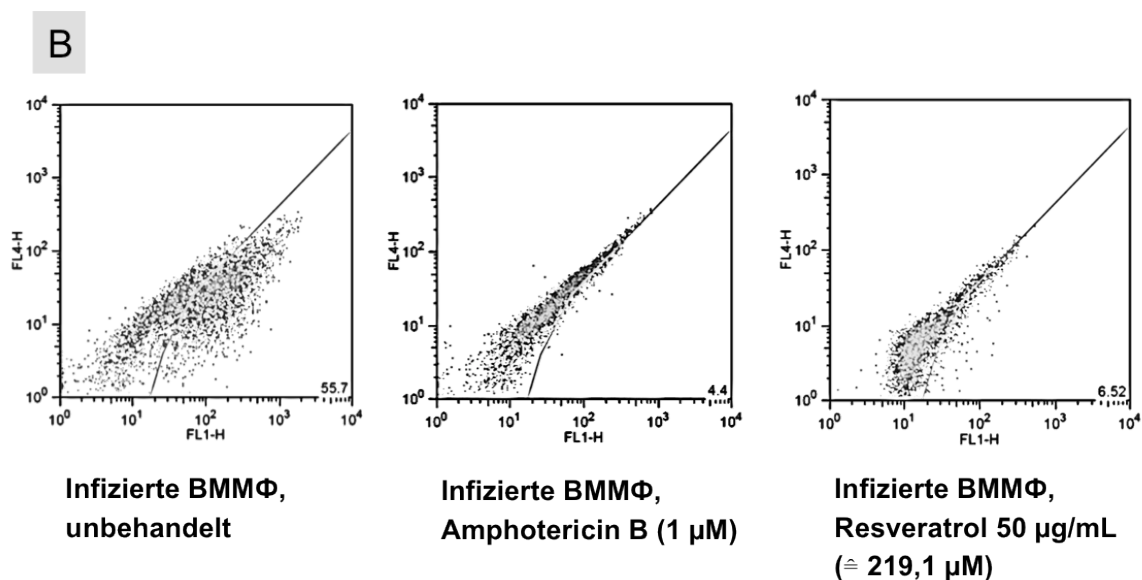


Abb. 3-10: Antileishmanielle Aktivität von Resveratrol bei infizierten BMMΦ

A: Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Reduktion des GFP-Signals bei infizierten BMMΦ durch Resveratrol. Die aus Knochenmark differenzierten Makrophagen wurden infiziert, über 48 h mit Resveratrol ($5\text{-}75 \mu\text{g/mL} \hat{=} 21,9\text{-}328,6 \mu\text{M}$) behandelt und anschließend am FACSCalibur™ nach Zusatz von Propidiumjodid vermessen. Amphotericin ($1 \mu\text{M}$) diente als Positivkontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten ($n=4$). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten infizierten Kontrolle mittels Student's t-Test. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.



B: Dargestellt ist die vergleichende, durchflusszytometrische Analyse des GFP-Signals von infizierten und behandelten Makrophagen. Negativkontrolle: unbehandelte Zellen, Positivkontrolle: Amphotericin B (1 µM) und Testsubstanz: Resveratrol (50 µg/mL ≅ 219,1 µM).

Abb. 3-10 B zeigt die Abnahme des GFP-Signals um den Faktor 10 nach Behandlung mit Amphotericin B (1 µM) und Resveratrol (219,1 µM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit einer Infektionsrate von 55%. Dies belegt, dass Resveratrol eine antileishmanielle Aktivität besitzt, wenngleich diese auffallend schwächer ist als die von Amphotericin B (1 µM).

3.4 Zytotoxisches Potential von Resveratrol bei BMMΦ

3.4.1 Bestimmung der Zellviabilität via MTT-Assay

Der Nachweis der Zellvitalität und damit das Ausmaß zytotoxischer Effekte kann mittels MTT-Assay geführt werden (vgl. Abschnitt 2.14.1). Dieser Assay beruht auf einer metabolischen Reduktion eines wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalses durch ausschließlich lebende Zellen zu einem unlöslichen blauen Formazan-Farbstoff. Diese Umsetzung ist zugleich Indikator für proliferative Prozesse über die relative Zellzahl (Mosmann, 1983). Die Intensität der entstandenen Färbung korreliert mit der Anzahl der vitalen Zellen und entspricht der Glykolyserate der Zellen.

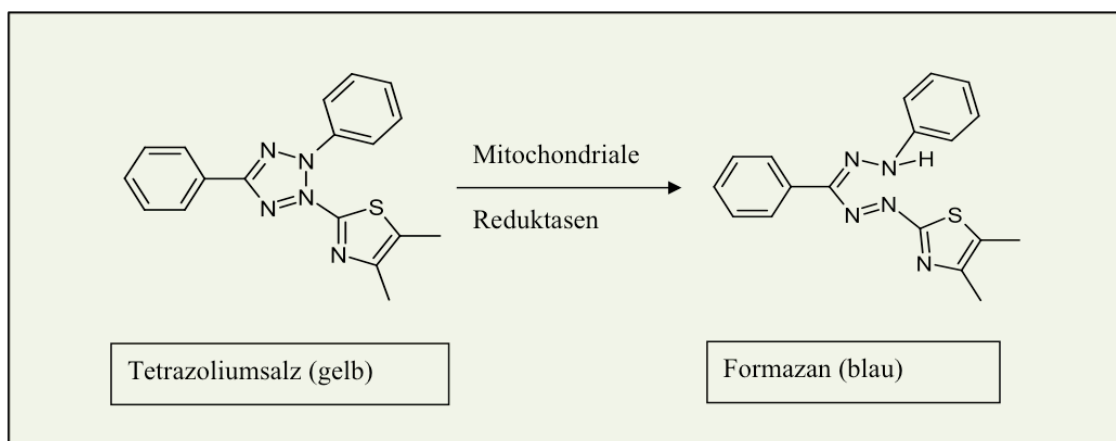


Abb. 3-11: Nachweis der Zellvitalität via MTT-Test

Dargestellt ist die metabolische Reduktion des gelösten, gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein blaues, wasserunlösliches Formazan.

Resveratrol wird im Allgemeinen als gut verträglich beschrieben (Kedzierski *et al.*, 2007). Diese *in vitro*-Studie, die sich mit Resveratrol und strukturverwandten Analoga beschäftigt, diente als Kontrollarbeit für die nachfolgenden Untersuchungen. Die Versuche zur antileishmaniellen Aktivität durch die Arbeitsgruppe um Kedzierski beschreiben Resveratrol über einen großen Konzentrationsbereich als untoxisch für mit Leishmanien infizierte Makrophagen. Für die Untersuchung zytotoxischer Effekte auf die Makrophagen wurden mit Resveratrol behandelte BMM Φ -Wirtszellen mittels MTT-Assay getestet (Abb. 3-12) und relativ zu unbehandelten Makrophagen betrachtet (unbehandelte Kontrolle = BMM Φ + Medium + 0,2% DMSO $\hat{=}$ 100%). Die Wirtszelltoxizität steigt konzentrationsabhängig nach Behandlung mit Resveratrol (Konzentrationsbereich: 5-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\hat{=}$ 21,9-175,2 μM ; IC_{50} = 71,6 μM). Damit widerspricht dieses Ergebnis den Untersuchungen von Kedzierski, der eine Abwesenheit zytotoxischer Effekte von Resveratrol bis hin zu einer Konzentration von $\geq 45 \mu\text{g}/\text{mL}$ beschreibt (Kedzierski *et al.*, 2007).

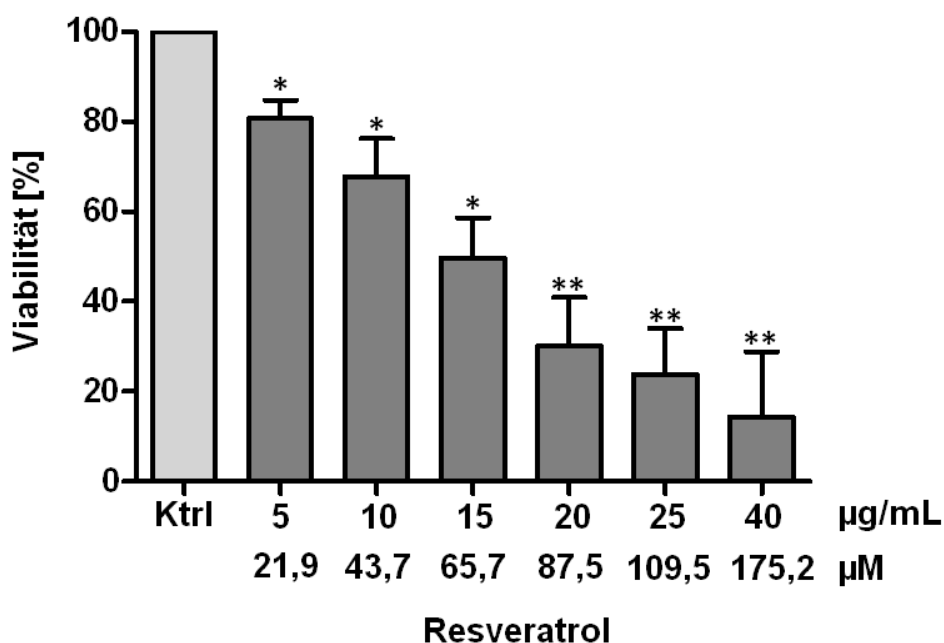


Abb. 3-12: Abnahme der Zellviabilität bei BMMΦ

Dargestellt ist die Abnahme der Zellviabilität bei BMMΦ nach Behandlung mit Resveratrol. Die aus Knochenmark differenzierten Makrophagen wurden mit Resveratrol über 48 h behandelt (5-40 µg/mL $\hat{=}$ 21,9 µM-175,2 µM) und mittels MTT-Assay untersucht. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels Student's t-Test. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3.4.2 Bestimmung der Zellviabilität via FACS-Assay

Zusätzlich zum MTT-Assay wurde der FACS-basierte Assay hinzugezogen, um die Daten aus dem MTT-Assay zu verifizieren. Für diesen Versuch wurden nicht-infizierte BMMΦ mit Resveratrol (Konzentrationsbereich: 25-75 µg/mL $\hat{=}$ 109,5-328,6 µM) über 48 h behandelt und anschließend mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Die Anzahl PI-positiver Zellen als Ausmaß der Zytotoxizität nahm mit steigender Konzentration von Resveratrol signifikant zu. Diese zusätzliche Beobachtung von zytotoxischen Effekten auf Einzelzell-Ebene bekräftigte das toxische Potential von Resveratrol, welches bereits mittels MTT-Assay gezeigt wurde. Die vernachlässigbar geringen Raten ($\leq 0,5\%$) von PI-positiven Events in allen unbehandelten Zellpopulationen erhärteten die Resveratrol-induzierte Zelltoxizität (**Abb. 3-13**).

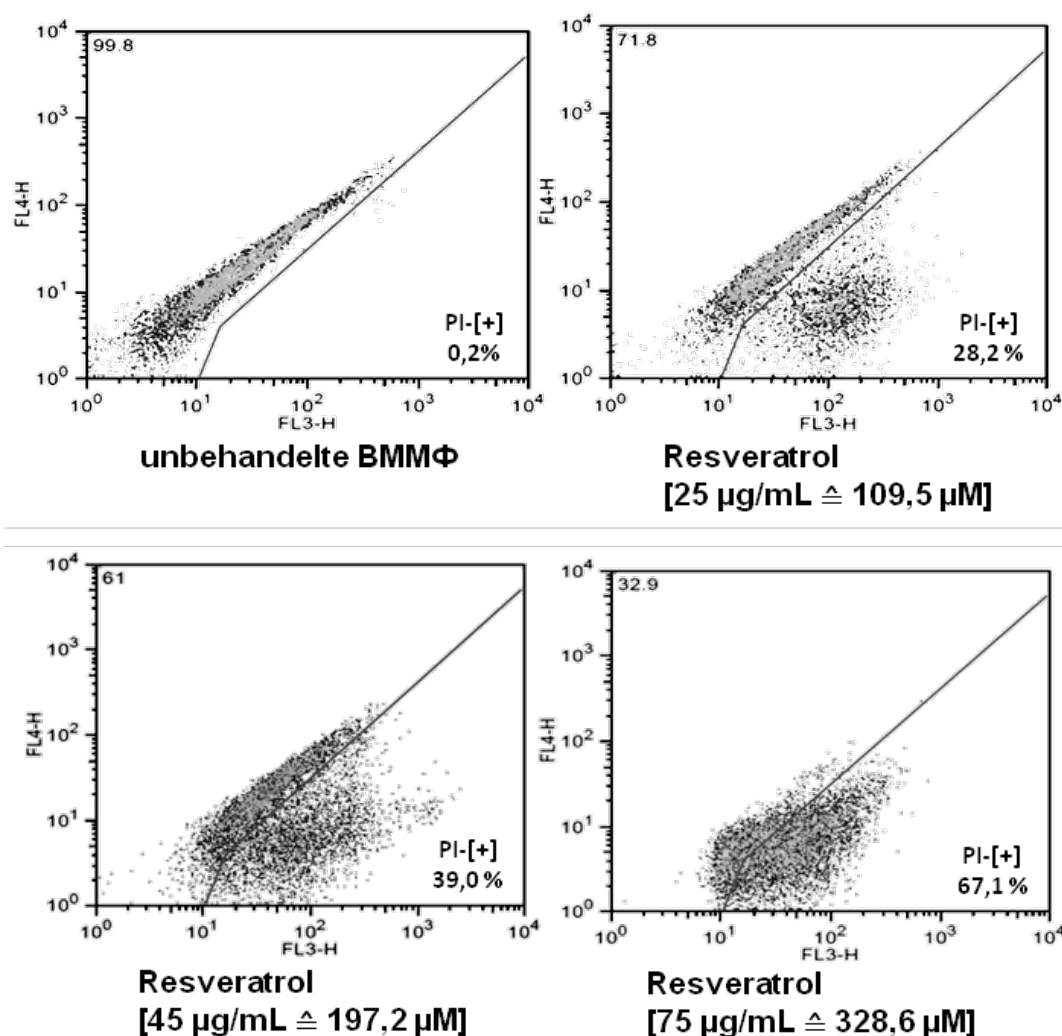


Abb. 3-13: Zytotoxische Wirkung von Resveratrol auf nicht-infizierte BMMΦ

Dargestellt sind repräsentative Dot-Plots. Sie zeigen PI-positive (tote) vs PI-negative (lebende) BMMΦ. Die aus Knochenmark differenzierten Makrophagen wurden mit Resveratrol über 48 h behandelt (25-75 µg/mL $\hat{=}$ 109,5 µM-328,6 µM) behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Beispielhaft abgebildet ist das Ergebnis eines Experiments aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

3.4.3 Mikroskopische Untersuchung der Zellviabilität

Da in der Arbeit von Kedzierski *et al.* (2007) ausschließlich mikroskopische Untersuchungen zur Beurteilung des Ausmaßes zytotoxischer Effekte von Resveratrol durchgeführt wurden, sollte auch diese Methode in der vorliegenden Arbeit einbezogen werden. Um eine morphologische Kontrolle der Zellviabilität durchführen zu können, wurden infizierte und nicht-infizierte BMMΦ Makrophagen mittels Diff-Quik®-Schnellfärbung diskriminiert. Nach 48-stündiger Behandlung der Makrophagen mit Resveratrol zeigten sich drastische Veränderungen in der Morphologie sowohl von infizierten als auch von nicht-

infizierten BMM Φ -Zellpopulationen. Auch dieses Ergebnis bestätigte das zytotoxische Potential von Resveratrol, das bereits im MTT-Assay und in der Durchflusszytometrie dokumentiert wurde. Wie aus **Abb. 3-14** ersichtlich ist, wiesen die Zellen stark kondensierte, pyknotische Zellkerne auf, zeigten bei ansteigender Resveratrol-Konzentration eine auffällige Vakuolisierung des Zytoplasmas und eine ausgeprägte Desintegrität der Zellmembranen. Diese morphologischen Veränderungen waren weniger markant in den nicht-infizierten Zellen (**Abb. 3-14 A**). Dies deutet daraufhin, dass nicht nur die Behandlung der Makrophagen mit Resveratrol, sondern auch die Infektion selbst einen Einfluss auf die Stabilität und Integrität der Wirtszellmembran hat (**Abb. 3-14 B**). Denn nach erfolgreicher Vermehrung der Parasiten in den Phago lysosomen der Wirtszellen kommt es zur Ruptur der Wirtszellmembran und damit zur Ausbreitung der Parasiten und zur Infektion neuer Zellen.

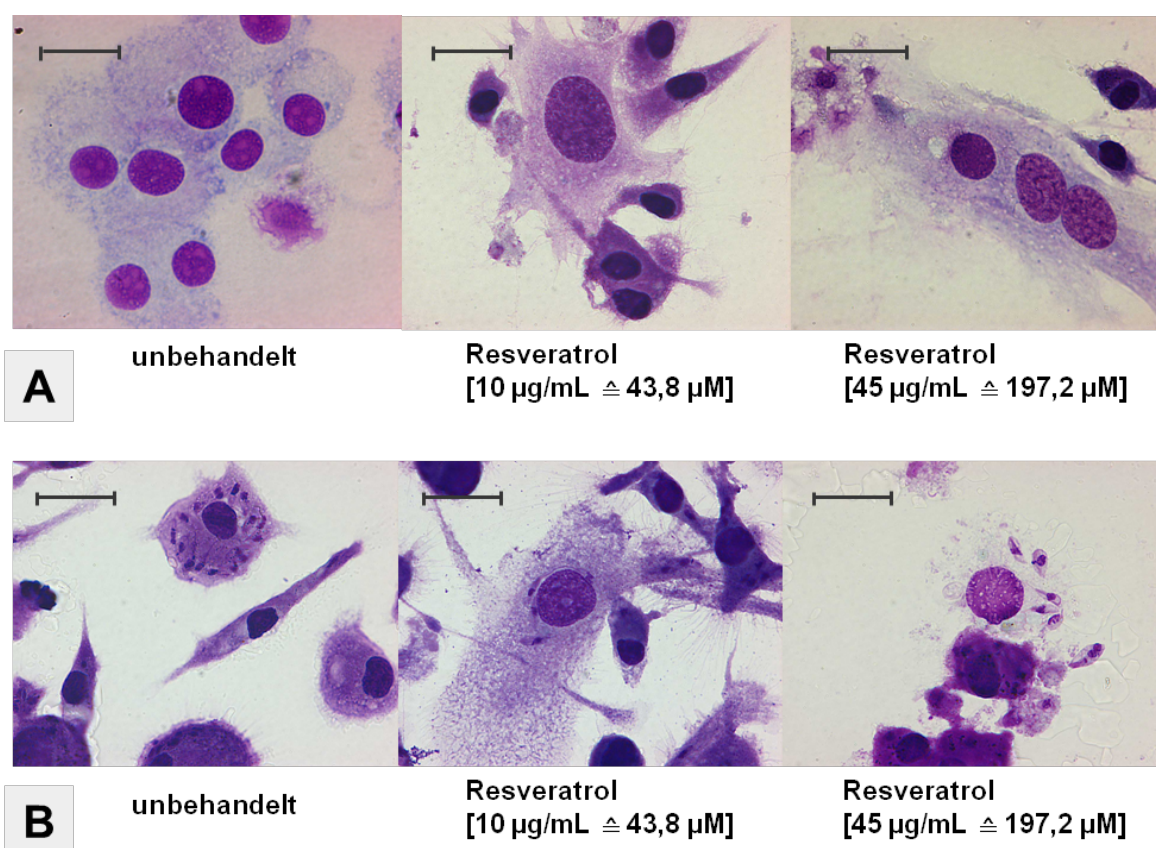


Abb. 3-14: Veränderungen der Zellmorphologie von BMM Φ

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen zur Veränderung der Zellmorphologie von BMM Φ nach Behandlung mit Resveratrol.

A: Konzentrationsabhängige Veränderung der Zellmorphologie nach Behandlung mit Resveratrol für nicht-infizierte BMM Φ mittels Diff-Quik®-Schnellfärbung (Maßstabsbalken = 20 µm).

B: Konzentrationsabhängige Veränderung der Zellmorphologie nach Behandlung mit Resveratrol für infizierte BMM Φ mittels Diff-Quik®-Schnellfärbung (Maßstabsbalken = 20 μ m).

Dargestellt sind Aufnahmen aus einem Versuchsansatz, stellvertretend für drei unabhängige Experimente mit ähnlichem Ergebnis.

Eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Zelltoxizität gegenüber BMM Φ im Unterschied zur beschriebenen guten Verträglichkeit gegenüber J774-Makrophagen (Kedzierski *et al.*, 2007) könnte in der Verwendung der verschiedenen Zelltypen liegen. Um dies zu prüfen, wurde die Zelllinie J774-G8 in gleicher Weise behandelt und mit Hilfe des verwendeten Methodenspektrum (MTT, FACS, Mikroskopie) analysiert.

3.5 Antileishmaniellles und zytotoxisches Potential von Resveratrol bei J774-G8

Die Ergebnisse, die aus der nachfolgenden Versuchsreihe erhalten wurden, bekräftigten die Ergebnisse der BMM Φ -Versuchsreihe und stehen im Widerspruch zur Arbeit von Kedzierski *et al.*, (2007).

3.5.1 Bestimmung der Zellviabilität via MTT-Assay

Um den Einfluss von Resveratrol auf die Zellviabilität der J774-G8-Makrophagen zu untersuchen, wurde in Analogie zu den BMM Φ der MTT-Assay verwendet.

Die gemessenen Absorptionswerte sind proportional zu dem in den Zellen metabolisierten MTT und somit ein Maß für die Stoffwechselaktivität viabler Zellen.

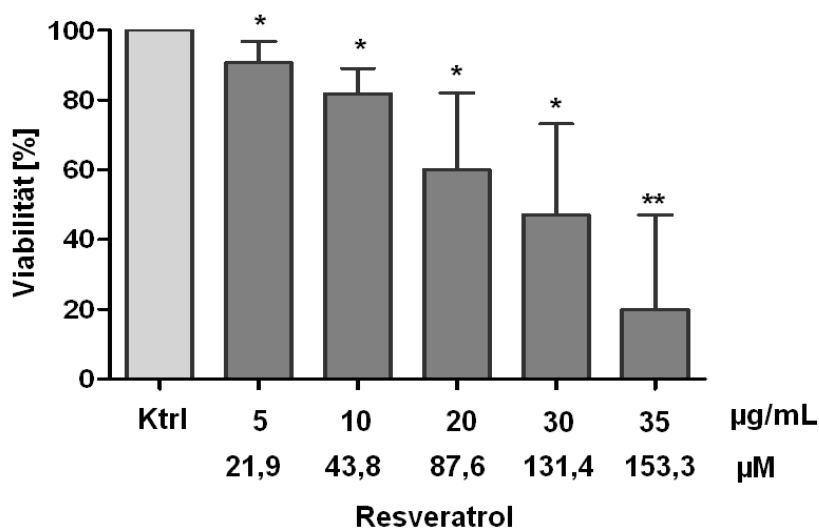


Abb. 3-15: Reduktion der Zellviabilität (MTT-Assay)

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität der J774-G8-Makrophagen nach Behandlung mit Resveratrol. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels Student's t-Test. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Zur Berechnung der Zytotoxizität von Resveratrol wurde der Messwert für die Viabilität der unbehandelten Zellen (Vehikelkontrolle DMSO: 0,2%) gleich 100% gesetzt und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (triplicate Messung je Einzelversuch) von Resveratrol-behandelten Zellen hierzu relativ bezogen.

Anhand der dargestellten Versuchsergebnisse wird deutlich, dass nach einer 48-stündigen Behandlung der J774-G8-Makrophagen mit steigender Resveratrol-Konzentration eine signifikante Reduktion der Zellviabilität zu verzeichnen ist.

Der IC_{50} -Wert des zytotoxischen Effekts von $24,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 107,3 \mu\text{M}$) aus der FACS-Messung wird durch den MTT-Assay leicht korrigiert. Es ergab sich ein IC_{50} -Wert von $29 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 127,05 \mu\text{M}$) für den MTT-Assay (**Abb. 3-15**).

Die dargestellte Konzentrationsabhängigkeit wird auch in den morphologischen Untersuchungen bestätigt (**Abb. 3-17**).

3.5.2 FACS-Bestimmung infizierter und nicht-infizierter J774-G8

Abb. 3-16 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur konzentrationsabhängigen antileishmaniellen Aktivität von Resveratrol bei infizierten Mausmakrophagen der Zelllinie J774-G8. Parallel zur

Konzentrationserhöhung steig die Zahl der PI-(+)-Events als Parameter für die Wirtszell-Zytotoxizität bei nicht-infizierten Makrophagen an.

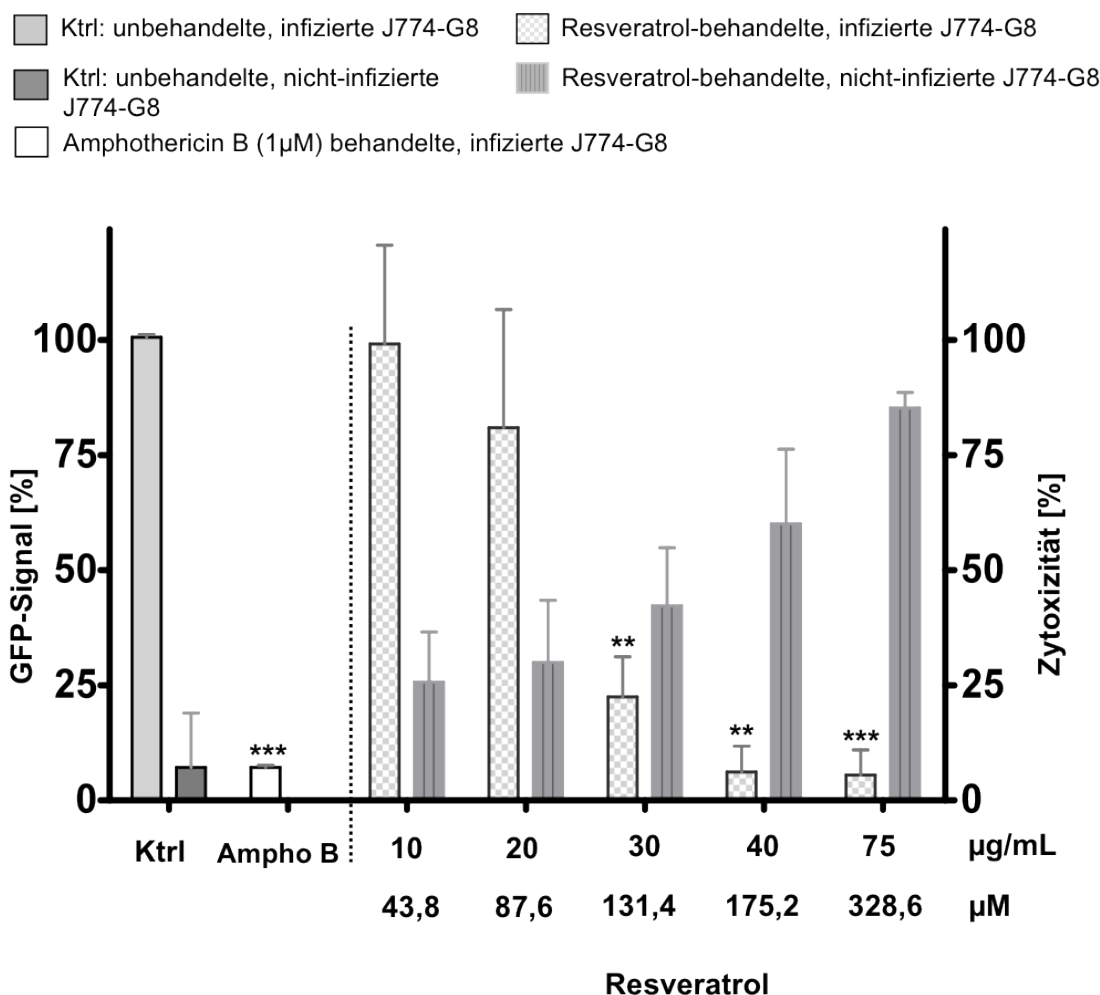


Abb. 3-16: FACS-Untersuchung von J774-G8 nach Resveratrol-Exposition

Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-positiver- bzw. PI-positiver Zellen von infizierten und nicht-infizierten J774-G8-Makrophagen nach 48-stündiger Exposition mit Resveratrol. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD je Konzentration und Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels Student's t-Test. Amphotericin B (1 μ M) diente als Positivkontrolle. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Die FACS-Messungen ergaben einen IC_{50} -Wert für die zytotoxischen Effekte (PI-positive Events) von 24,5 μ g/mL (\cong 107,3 μ M) und für den antileishmaniellen Effekt (Abnahme des GFP-Signales) einen IC_{50} -Wert von 24,8 μ g/mL (\cong 108,6 μ M). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus dem MTT-Test (vgl. **Abb. 3-15**).

3.5.3 Mikroskopische Untersuchung der Zellviabilität

Die parallel zu den durchflusszytometrischen Messungen bzw. MTT-Zytotoxizitätstestungen durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen zeigten für die untersuchten infizierten und nicht-infizierten J774-G8-Zellen ähnliche zellmorphologische Veränderungen wie für BMM Φ . Mit steigender Konzentration von Resveratrol nahmen Vakuolisierung (s. schwarze Pfeile) und Karyopyknose zu (**Abb. 3-17 A**). Die abnehmende Zellzahl, die vor allem in den infizierten und behandelten Zellpopulationen deutlich wird, kann in Zusammenhang mit einem Funktionalitätsverlust von Zelladhäsionsproteinen (Zell-Zell-Kontakt oder Zell-Matrix-Adhäsion) stehen. Die Infektion trägt in ausgeprägtem Maße zur Destabilisierung der Zellintegrität und der Adhäsionsfähigkeit bei (**Abb. 3-17 B**). Unschärfe Zellgrenzen, Vakuolisierung und eine partielle Vergrößerung der Zellen sprechen für nekrotische Prozesse. Während die starke Chromatinkondensation und das Zusammenschrumpfen einiger Zellen auf Apoptose hindeutet.

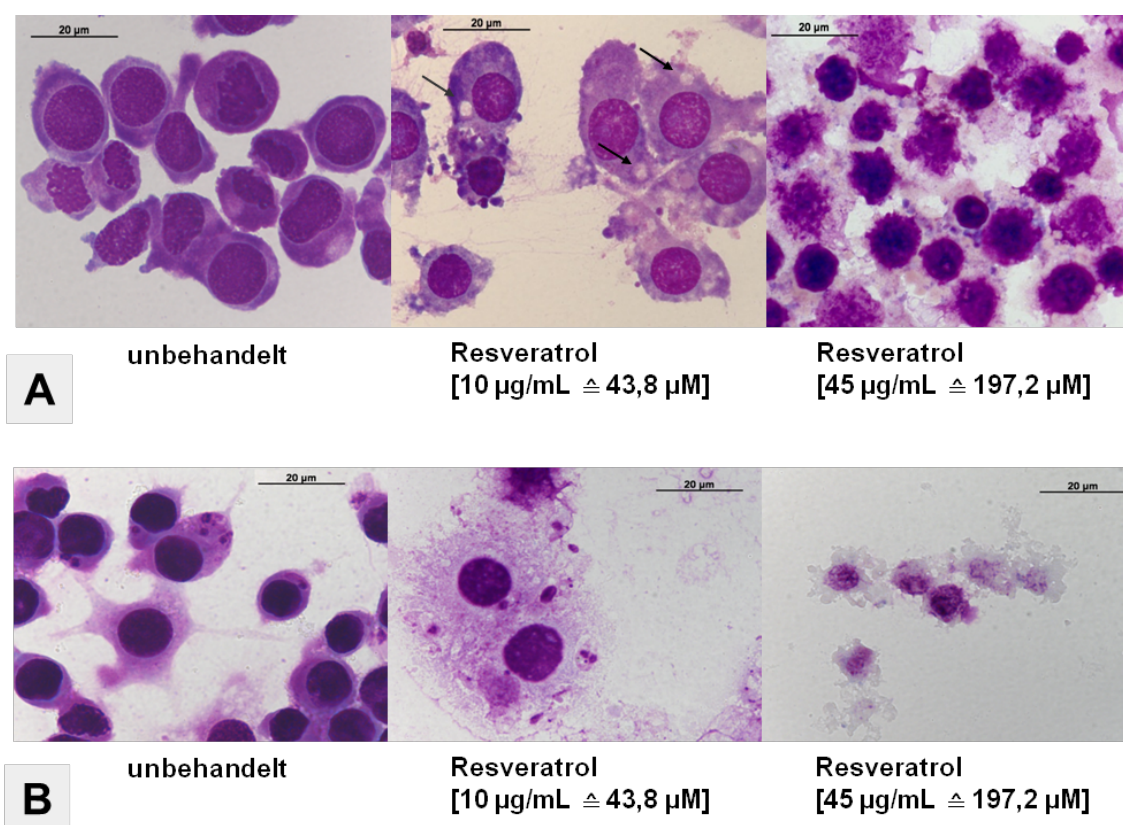


Abb. 3-17: Induktion von Apoptose in J774-G8-Makrophagen

Dargestellt sind Effekte in J774-G8 Zellen nach 48-stündiger Exposition mit Resveratrol. Die Dokumentation erfolgte mithilfe der Diff-Quik®-Färbung. (A) nicht-infizierte, (B) infizierte Zellen (Maßstab = 20 µm). Dargestellt sind

Aufnahmen aus einem Versuchsansatz, stellvertretend für drei unabhängige Experimente mit ähnlichem Ergebnis.

3.5.4 Selektivitätsindex (SI)

Zur Beurteilung der antileishmaniellen Aktivität von Resveratrol wurde der Selektivitätsindex ermittelt. Dieser berechnet sich aus dem Verhältnis der IC_{50} -Werte für die antileishmanielle Aktivität und der Zytotoxizität gegenüber Wirtszellen. Je höher der Selektivitätsindex, desto größer die spezifische Wirkung der Testsubstanz auf die Parasiten und desto geringer der Effekt auf die Wirtszelle. Nachfolgend die Formel zur Berechnung des SI:

$$SI = \frac{(\bar{x} IC_{50} \text{ Makrophagen})}{(\bar{x} IC_{50} L. major\text{-GFP})}$$

Für infizierte J774-G8-Makrophagen ergibt sich ein SI von 1,17 und für die primären murinen Makrophagen (BMM Φ) ein SI von 1,6. Antileishmanielle und zytotoxische Konzentrationsbereiche liegen somit sehr eng beieinander. Insgesamt reagieren BMM Φ im Vergleich zur Zelllinie J774-G8 sowohl auf die Behandlung mit Resveratrol als auch auf die Infektion selbst empfindlicher. Dies erscheint logisch, da primär gewonnene Zellen aus dem Knochenmark von C57Bl/6-Mäusen im Gegensatz zur isolierten Makrophagen-Zelllinie aus einem Tumor einer BALB/c-Maus weniger robust sind.

3.6 Nachweis der NO-Bildung in Makrophagen

In den folgenden Untersuchungen sollte der Einfluss von Resveratrol auf die NO-Bildung sowohl im zellfreien als auch im zellbasierten System untersucht werden. Hierzu wurden Experimente zum NO-Scavenging-Potential (zellfrei und zellbasiert), zur NO-Bildung (zellbasiert), zur NO-Inhibition (zellbasiert) und zur Expression der iNOS (Zell-Lysat) durchgeführt. Der zellfreie Assay wurde mit SNP durchgeführt. Die Zell-Untersuchungen basieren auf Experimenten mit J774-G8-Makrophagen.

Für den experimentellen Nachweis der NO-Bildung wurde ein Assay auf Basis der Griess-Reaktion angewendet (Griess, 1879). Dabei reagiert Sulfanilamid in Anwesenheit von Nitrit im sauren Milieu zu einem Diazoniumsalz, welches mit N-1-(Naphthyl)-Ethylendiamin eine rotviolette Azoverbindung bildet (Griess-

Reaktion, s. **Abb. 3-18**). Das Produkt kann spektralphotometrisch bei 540 nm am ELISA-reader vermessen werden.

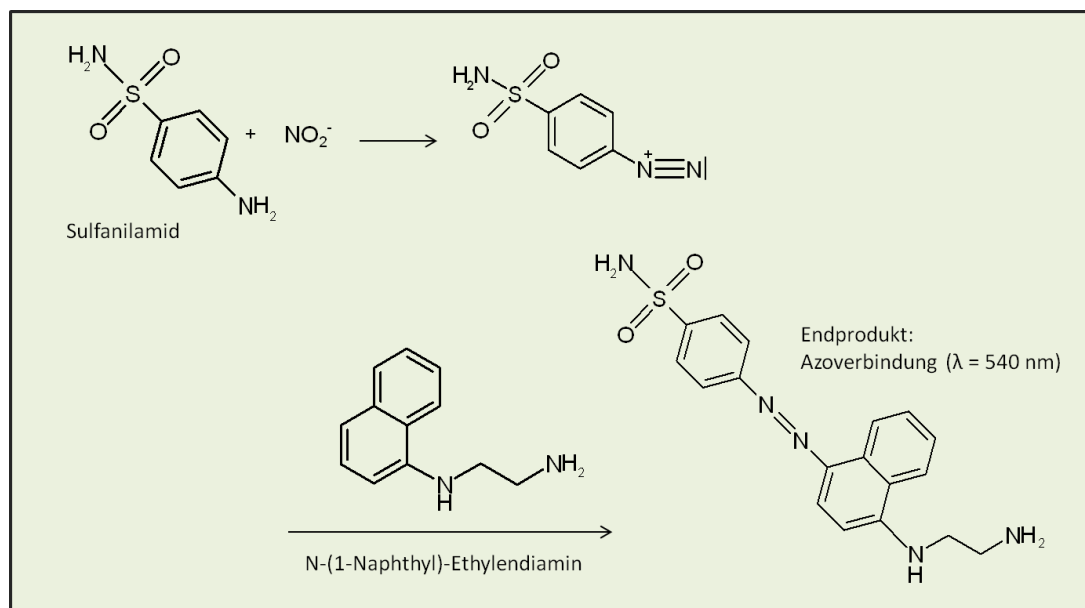


Abb. 3-18: Griess-Reaktion zur Bestimmung von Nitrit

Dargestellt ist der Reaktionsmechanismus der Griess-Reaktion zur Bestimmung von Nitrit. Dabei entsteht Nitrit als Folgeprodukt der Oxidation von NO-Radikalen in wässriger Lösung. Die weitere Umsetzung zum farbigen Endprodukt (Azoverbindung) erlaubt, die Menge an freigesetztem NO in Lösung indirekt über Nitrit bei 540 nm spektralphotometrisch zu quantifizieren.

Die Termini NO-Produktion, NO-Bildung und NO-Level werden synonym zur Messgröße Nitrit verwendet. Das mikrobizide Agens ist zweifellos NO. Die Tatsache, dass eine direkte NO-Messung schwierig ist, jedoch die gut etablierte Nitritmessung (vgl. Abschnitt Griess-Assay 3.7) Rückschlüsse auf eine NO-Radikal-Produktion erlaubt, lässt die synonyme Verwendung der Begriffe zur Beschreibung der Effekte zu.

3.6.1 NO-Scavenging-Aktivität von Resveratrol im zellfreien System

Für Resveratrol wurde mehrfach die Fähigkeit zur Steigerung der NO-Produktion bzw. eine Modulation der Expression von NOS-Isoformen beschrieben (Wallerath *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2012). Daher wurde in einem ersten Schritt NO durch den Einsatz von SNP im zellfreien System generiert (vgl. Abschnitt 2.17.2). SNP zerfällt spontan unter UV-Licht-Einwirkung und setzt NO^\cdot frei. Dieses instabile NO-Radikal wird in Lösung rasch zu Nitrit oxidiert und kann mithilfe der Griess-Reaktion quantifiziert werden.

Bei Resveratrol-Konzentrationen $\geq 30 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 131,3 \mu\text{M}$) wurden die freigesetzten NO-Mengen zwar konzentrationsabhängig reduziert, jedoch nur moderat auf bis zu 65%, bezogen auf die Kontrolle (**Abb. 3-19**).

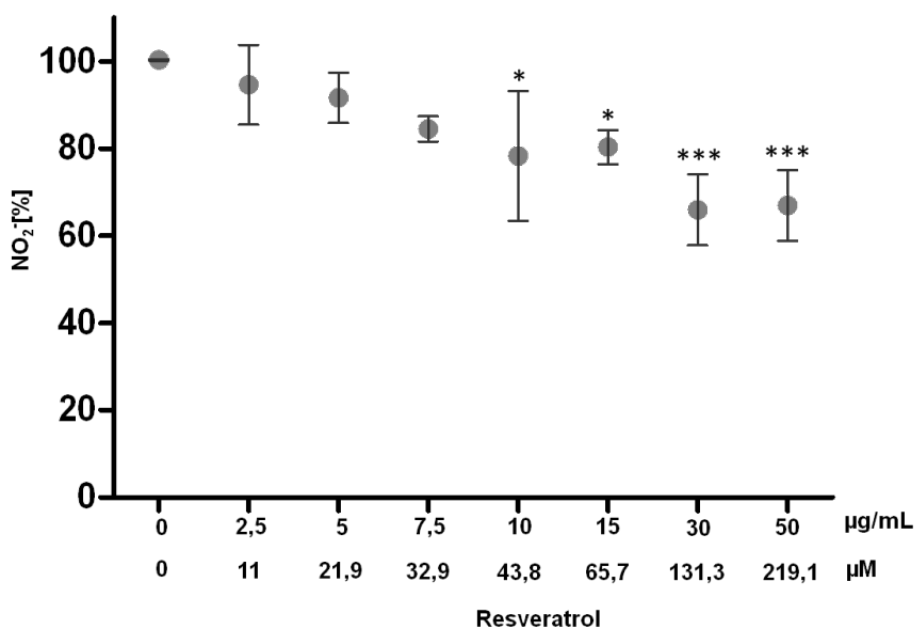


Abb. 3-19: NO-Scavenging Effekt von Resveratrol (Griess-Assay)

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Reduktion der NO-Konzentration im Zellkulturüberstand durch Resveratrol. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD je Konzentration und Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels One-Way-ANOVA mit post hoc Test nach Dunnett. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3.6.2 NO-Scavenging-Aktivität von Resveratrol im zellbasierten System

Aktiviert Makrophagen produzieren verschiedene potentielle zytotoxische Effektormoleküle, von denen NO und verwandte Stickstoffspezies die wirksamsten mikrobiziden Vertreter mit antileishmaniellen bzw. antiinfektiven Effekten sind (Green *et al.*, 1990, Lemesre *et al.*, 1997). Resveratrol ist in der Lage, in verschiedenen Zelltypen wie Skelettmuskelzellen (Centeno-Baez *et al.*, 2011), Herzmuskelzellen (Wang S. *et al.*, 2011) oder Makrophagen (Ma *et al.*, 2005, Meng *et al.*, 2008) NO-Level zu modulieren.

Bevor die Versuche zur NO-Scavenging-Aktivität von Resveratrol und zur NO-Bildung jedoch durchgeführt werden konnten, musste zunächst die optimale Inkubationsdauer für eine maximale NO-Bildung der Makrophagen ermittelt werden. Dafür wurden in einem ersten Schritt J774-G8-Makrophagen über 12 h,

24 h und 48 h mit der Kombination aus LPS/*rIFN- γ* (10 ng/100 U pro Milliliter) zur NO-Produktion stimuliert (**Abb. 3-20**). In einem zweiten Schritt wurden Aliquots der Zellkulturüberstände abgenommen und vereint, um die entstandene Menge an NO als Nitrit mittels Griess-Assay zu vermessen. Übereinstimmend mit früheren Veröffentlichungen induziert die Kombination von LPS und *rIFN- γ* eine starke NO-Produktion (ca. 30 μ M) in Makrophagen (Kram *et al.*, 2008).

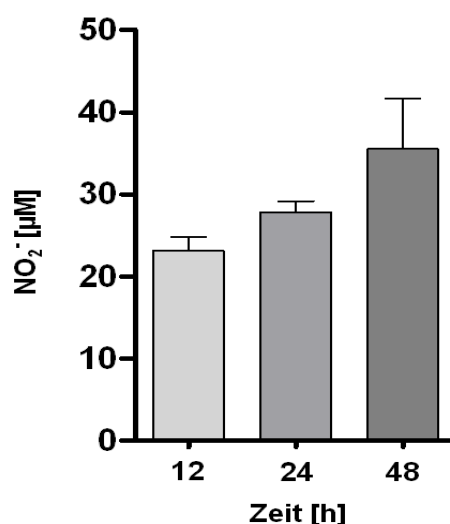


Abb. 3-20: Kinetik der NO-Bildung in J774-G8-Makrophagen

Dargestellt ist die Nitritbestimmung aus dem Zellkulturüberstand mittels Griess-Assay bei nicht-infizierten J774-G8-Makrophagen. Die Zellen wurden mit der Kombination aus LPS/*rIFN- γ* (10 ng/100 U) über 12 h, 24 h und 48 h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden auf NO-Bildung, gemessen als Nitrit, über eine Standardkurve vermessen. (Natriumnitrit-Standard: 0-100 μ M). Es sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) dargestellt.

Nach der Festlegung der optimalen Stimulationsdauer (48 h, s. oben), konnte nun der Effekt von Resveratrol, als direktes NO-Stimulans zu wirken untersucht werden.

Abb. 3-21 zeigt, dass die Behandlung mit Resveratrol nicht zu einer Aktivierung von J774-G8-Makrophagen und damit nicht zu einer erhöhten NO-Bildung führt. Das bedeutet, dass Resveratrol eine wichtige Abwehrreaktion der Makrophagen gegen intrazelluläre Erreger nicht zu stimulieren vermag.

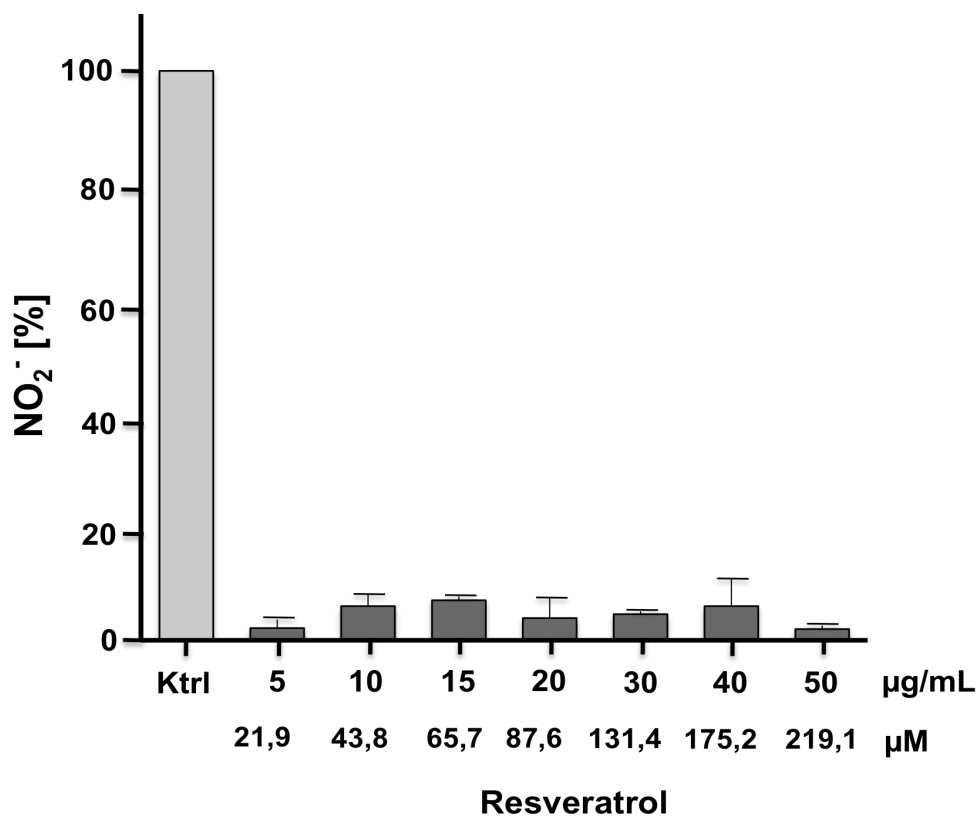


Abb. 3-21: NO-Bildung von Resveratrol bei J774-G8-Makrophagen

Dargestellt ist die Nitritbestimmung aus dem Zellkulturüberstand mittels Griess-Assay bei nicht-infizierten J774-G8-Makrophagen. Die Zellen wurden entweder mit der Kombination aus LPS/*rIFN*- γ (10 ng/100 U pro mL = Ktrl) oder mit Resveratrol (5-50 $\mu\text{g/mL} \cong 21,9$ -219,1 μM) über 48 h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden auf NO-Bildung, gemessen als Nitrit, über eine Standardkurve vermessen. Das Vehikel (Kulturmedium + 0,2% DMSO) beeinträchtigte die Nitrit-Level nicht (Natriumnitrit-Standard: 0-100 μM). Es sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) dargestellt.

Da die Resveratrol-Behandlung im Vergleich zur LPS/*rIFN*- γ -Kontrolle die Makrophagen nicht zur NO-Bildung stimulierte, sollte nachfolgend die Scavenging-Kapazität von Resveratrol untersucht werden.

Hierzu wurden J774-G8-Makrophagen mit LPS/*rIFN*- γ zur NO-Produktion stimuliert und anschließend mit Resveratrol (0,5-50 $\mu\text{g/mL} \cong 2,2$ -219,1 μM) inkubiert (**Abb. 3-22**). Es zeigte sich - ebenso wie im zellfreien Versuch (vgl. Abschnitt 3.6.1) - dass Resveratrol zwar moderate NO-Scavenging Eigenschaften besitzt. Die NO-Levels wurden jedoch erst ab Resveratrol-Konzentrationen von $\geq 27 \mu\text{M}$ um ca. 50% abgesenkt. Bei steigenden Resveratrol-Konzentrationen wurde bis zur Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL} (\cong 219,1 \mu\text{M})$ keine weitere Absenkung der Nitrit-Spiegel erreicht (**Abb. 3-22**).

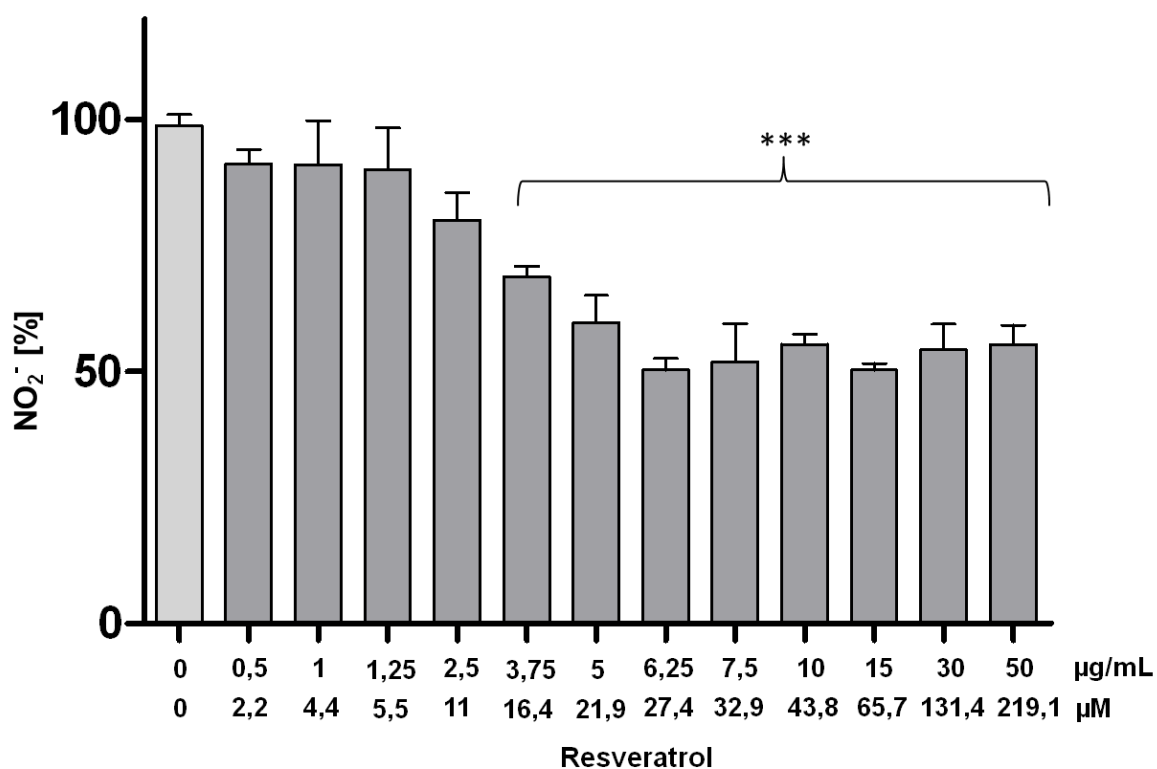


Abb. 3-22: NO-Scavenging von Resveratrol bei J774-G8-Makrophagen

Dargestellt sind die aus der Behandlung mit Resveratrol resultierenden konzentrationsabhängigen Nitritspiegel im Zellkulturüberstand, ermittelt via Griess-Assay. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) bezogen auf die mit LPS/*r*IFN- γ stimulierte Kontrolle dargestellt. Das Vehikel (Kulturmedium + 0,2% DMSO) beeinträchtigte die Nitrit-Level nicht. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3.6.3 NO-Bildung bei Vorinkubation mit Resveratrol

Im nachfolgenden Experiment sollte der Einfluss von Resveratrol auf die NO-Bildung von J774-G8-Makrophagen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit Resveratrol ($1-10 \mu\text{g/mL} \cong 4,4-43,8 \mu\text{M}$) über 48 h vorinkubiert und anschließend mit LPS/*r*IFN- γ ($10 \text{ ng}/100 \text{ U}$ pro Milliliter) aktiviert. Auch hier wurden mithilfe der Griess-Reaktion verminderte NO₂⁻-Level im Zellkulturüberstand gemessen. **Abb. 3-23** zeigt, dass die NO-Produktion der Makrophagen innerhalb des Konzentrationsbereiches ($1-10 \mu\text{g/mL} \cong 4,4-43,8 \mu\text{M}$) durch Resveratrol signifikant reduziert wurde ($\text{IC}_{50} = 5,2 \mu\text{g/mL} \cong 22,8 \mu\text{M}$).

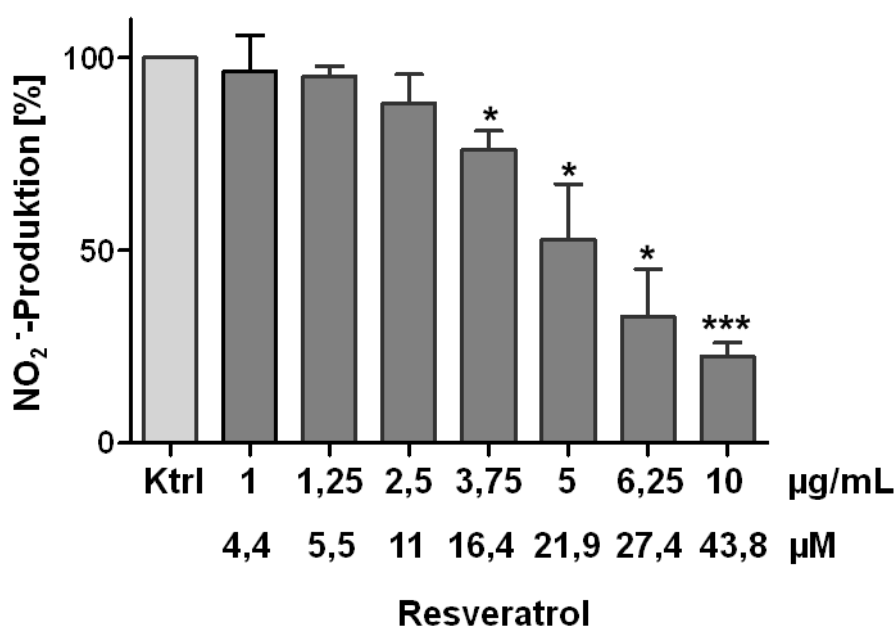


Abb. 3-23: Abnahme der Nitritspiegel im Zellkulturüberstand

Dargestellt sind die aus der Behandlung mit Resveratrol resultierenden konzentrationsabhängigen Nitritspiegel im Zellkulturüberstand, ermittelt via Griess-Assay. Die J774-G8-Makrophagen wurden über 48 h mit Resveratrol (1-10 µg/mL $\hat{=}$ 4,4-43,8 µM) vorinkubiert und anschließend über 12 h mit der Kombination *r*IFN- γ (100 U/mL)/LPS (10 ng/mL) aktiviert. Ausschließlich mit *r*IFN- γ /LPS aktivierte Makrophagen dienten als Positivkontrolle und wurden als 100% gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) bezogen auf die Positivkontrolle dargestellt. Das Vehikel (Kulturmedium + 0,2% DMSO) beeinträchtigte die NO-Level nicht. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Die Vorbehandlung der J774-G8-Makrophagen mit Resveratrol und anschließender Aktivierung mit LPS/*r*IFN- γ führte zu einer deutlichen Reduktion der NO-Freisetzung aus den Makrophagen in den Zellüberstand. Diese Beobachtung kann in einem direkten Effekt auf die Expression der induzierbaren NO-Synthase, in einer verminderten Enzymaktivität oder durch NO-Scavenging-Effekte begründet sein. Letztere können durch die Scavenging-Untersuchungen im zellfreien/zellbasierten System ausgeschlossen werden (vgl. Abschnitt 3.6.1 und 3.6.2).

Fazit

Resveratrol besitzt sowohl im zellfreien als auch im zellbasierten System nur moderate NO-Scavenging-Aktivitäten. Es beeinflusst die iNOS möglicherweise

auf der Expressionsebene bzw. moduliert die Funktionalität und damit die Aktivität des Enzyms. Demzufolge wurden Untersuchungen zur Beeinflussung der iNOS-Expression durch Resveratrol angeschlossen.

3.6.4 Einfluss von Resveratrol auf die iNOS-Expression

Um die vermutete Beeinflussung von Resveratrol auf die Expression der induzierbaren NO-Synthase bei Makrophagen zu bestätigen, wurde ein Western Blot-basiertes Protokoll zum Nachweis des exprimierten Proteins entwickelt. Die Ergebnisse zeigten, dass bei mit Resveratrol behandelten J774-G8-Makrophagen der iNOS-Expressionslevel konzentrationsabhängig abnahm im Vergleich zu der unbehandelten, jedoch mit LPS/*rIFN- γ* aktivierten Kontrolle (**Abb. 3-24**).

Unstimulierte Makrophagen exprimierten sehr niedrige iNOS-Protein-Spiegel.

LPS (10 ng/mL) + <i>rIFN-γ</i> (100 U/mL)	-	+	+	+	+	+	+	+
Resveratrol [μ g/mL]	0	0	1	1,25	2,5	3,75	5	6,25
Resveratrol [μ M]	0	0	4,4	5,5	11	16,4	21,9	27,4

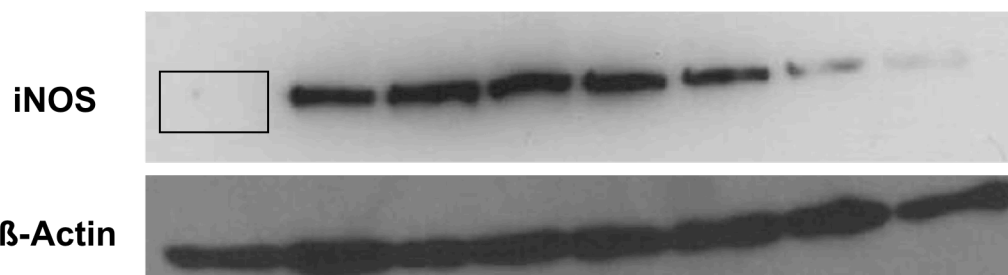


Abb. 3-24: Effekt von Resveratrol auf die iNOS-Expression

Dargestellt ist die iNOS-Expression von J774-G8-Makrophagen. Die Zellen wurden mit Resveratrol über 48 h behandelt und anschließend mit LPS (10 ng/mL)/*rIFN- γ* (100 U/mL) stimuliert. Das Gesamtprotein (20 μ g) des Zellysats wurde einer Proteinseparation mittels SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting unterzogen und auf X-ray Film detektiert. Beta-Actin wurde als Ladekontrolle genutzt und parallel gefärbt. Dargestellt ist ein Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

Die Abnahme der iNOS-Expression nach Behandlung mit Resveratrol erklärt die verminderte NO-Bildung der J774-G8-Makrophagen (vgl. Abschnitt 3.6.3). Inwieweit diese suppressiven Effekte bereits auf genregulatorischer Ebene ausgelöst werden, oder ob sich die Modulation auf die Proteinebene (Verlust der Funktionalität des Proteins z. B. durch veränderte Faltung) beschränkt, müsste weiterführend geklärt werden.

Fazit

Angesichts der inhibitorischen Wirkung auf die induzierbare NO-Synthase, der beobachteten zytotoxischen Effekte auf die Wirtszellen und eines – wenngleich – moderaten NO-Scavenging-Potentials ist Resveratrol als wenig geeignetes Mittel zur Bekämpfung der Leishmaniose einzustufen. Die antileishmaniellen Effekte sind zudem unmittelbar mit zytotoxischen Auswirkungen auf die Wirtszellen assoziiert und reflektieren eine sehr geringe therapeutische Breite für Resveratrol *in vivo*, wie es auch der Selektivitätsindex widerspiegelt (vgl. Abschnitt 3.5.4).

3.7 Zytotoxizität von Resveratrol auf Fibroblastenzelllinie L929(CSF)

Resveratrol wird immer häufiger in Haut- und Gesichtscremes als wirksamer Zusatz zur antioxidativen und konzentrierten Anti-Aging-Gesichtspflege verwendet. Die zunehmende Anwendung von Resveratrol im kosmetischen Bereich war Anlass, die Fibroblastenzelllinie L929(CSF) zu untersuchen. Fibroblasten kommen in vielen Arten von Geweben, wie Sehnen, Bändern und der Haut vor. Sie produzieren Kollagen und gelten als die Quelle der meisten extrazellulären Matrixkomponenten. Darüber hinaus haben diese Zellen eine entscheidende Bedeutung bei der Regulierung, Abnahme bzw. Fluktuation von extrazellulären Matrixbausteinen und spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung.

Zur Beurteilung der Proliferationshemmung von Resveratrol bzw. seiner Auswirkung auf die Zellviabilität von L929(CSF) wurde der Kristallviolett-Assay ausgewählt. Dieser ist vor allem bei solchen Gewebezelllinien geeignet, die Monolayer ausbilden.

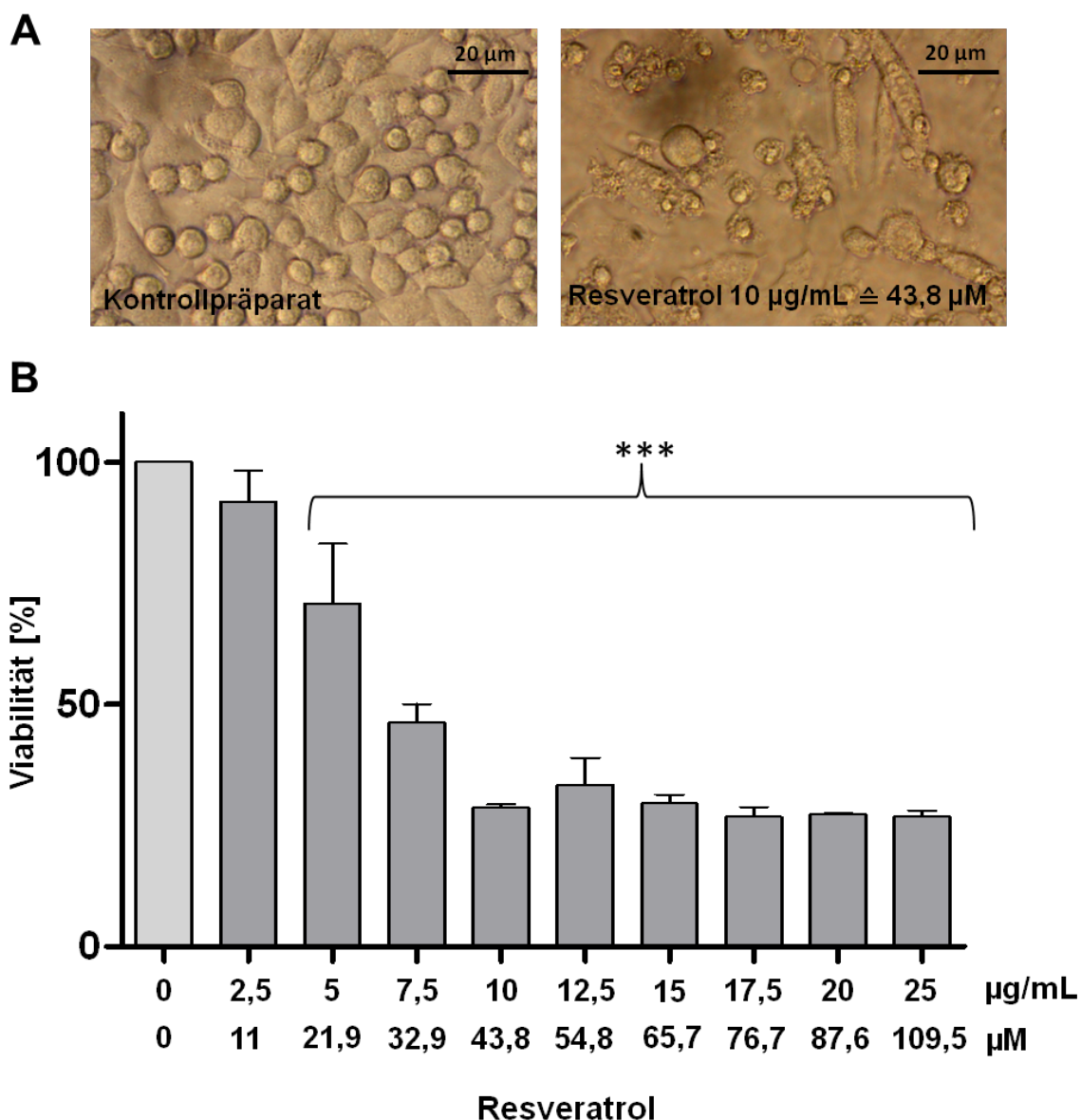


Abb. 3-25: Toxizität von Resveratrol auf die Fibroblastenzelllinie L929(CSF)

A: Dargestellt ist das DMSO-Kontrollpräparat (Kulturmedium + 0,2% DMSO, linkes Bild) im Vergleich zu einer mit 10 µg/mL (43,8 µM) Resveratrol behandelten Monolayerkultur (rechtes Bild) jeweils im Phasenkontrast.

B: Dargestellt ist die Zellviabilität der Fibroblastenzelllinie. Die Zellen wurden über 48 h mit Resveratrol (2,5-25 µg/mL $\hat{=}$ 11 µM-109,5 µM) inkubiert. Die Viabilität wurde mittels Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) bezogen auf die Positivkontrolle dargestellt. Als Vehikelkontrolle (relative Viabilität = 100%) diente Kulturmedium + 0,2% DMSO. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's-t-Test. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Der angewendete Kristallviolett-Assay (vgl. Abschnitt 2.14.2) verweist auf eine deutliche Beeinträchtigung der Viabilität der kultivierten murinen Fibroblasten. Wie in **Abb. 3-25 B** zu erkennen ist, nimmt die Zellviabilität bereits ab einer

Konzentration von ca. 11 μM Resveratrol im Kulturmedium ab und wird insbesondere ab einer Konzentration von 22 μM signifikant negativ beeinflusst. Diese Beobachtung korreliert mit einer aktuellen Studie zur Toxizität von höheren Resveratrol-Konzentrationen auf Fibroblasten. Danach hat das Hydroxystilben nur in Konzentrationen bis ca. 11 μM (bei einer Inkubation von 48 h) keinen negativen Einfluss auf die Proliferation bzw. Vitalität der Zellen (Fußer, 2010).

3.8 Antioxidative Effekte von Resveratrol: DPPH-Assay

Antioxidantien können Oxidationsreaktionen durch freie Radikale verzögern oder verhindern. Sie sind zudem in der Lage, radikalische Kettenreaktionen zu unterbrechen, ohne selbst in reaktionsfähige Moleküle umgewandelt zu werden. Viele Pflanzenextrakte, insbesondere solche, die reich an polyphenolischen Verbindungen sind, zeigen antioxidative Wirkungen. Resveratrol als Hydroxystilbenderivat zählt zu den Polyphenolen und wurde im nachfolgenden Versuch hinsichtlich seiner Radikalfänger-Eigenschaften gegenüber DPPH untersucht.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts stieg das wissenschaftliche Interesse an der Rolle von pflanzlichen Antioxidantien in Nahrungsmitteln und der Bestimmung ihrer antioxidativen Kapazität. Bekannte Vertreter für mit der Nahrung aufgenommene Antioxidantien sind neben den Polyphenolen die Ascorbinsäure (Vitamin C) und Vertreter der Tocopherole (z. B. Vitamin E). Zur zellfreien Prüfung der antioxidativen Wirksamkeit dienen eine Reihe standardisierter Methoden (Gülçin, 2012). Zu diesen Tests gehören u. a. der FRAP-Assay, XO/NBT- sowie der DPPH-Assay.

Tab. 3-5: *In vitro*-Assays zum Nachweis antioxidativer Eigenschaften

FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
XO/NBT	Xanthin/Xantinoxidase-System (enzymatisch)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Assay

Die in **Tab. 3-5** aufgeführten Assays beruhen auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen: einerseits einem Wasserstoff-Atom-Transfer und andererseits einem Elektronentransfer. Der FRAP-Assay basiert auf einer SET-Reaktion, bei der ein Elektron auf den Komplex Ferri-tripyridyltriazin übertragen wird. Im DPPH-Assay wird ein Wasserstoffatom übertragen. Der XO/NBT-Assay

ist ein enzymbasierter Assay, in dem die Xanthinoxidase bei der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zur Harnsäure neben dem Superoxidradikalanion auch Wasserstoffperoxid generiert. Im Unterschied zum DPPH- und FRAP-Assay ist der XO/NBT-Assay eine indirekte Methode, da hier die Hemmung reaktiver Spezies betrachtet wird, die erst im Reaktionsansatz generiert werden. Hingegen wird im FRAP-Assay der Eisenkomplex bzw. im DPPH-Assay das DPPH-Radikal direkt umgesetzt (Schäfer, 2007).

Die verschiedenen Mechanismen zeigen, dass die antioxidative Wirksamkeit einer Substanz nicht anhand eines einzelnen Assays dargestellt werden kann. So sind zum Beispiel Catechine und Flavonoide, sowie Zimtsäurederivate mit einer 4-OH- und einer zusätzlichen 3-OH-Gruppe gute Radikalfänger gegenüber DPPH-Radikalen (DKFZ 2002: wissenschaftlicher Ergebnisbericht 2000/2001). Der DPPH-Assay wurde ursprünglich von Blois (1958) entwickelt und ist heute eine gängige Methode zur Messung von Radikalfängereigenschaften in der Lebensmitteltechnologie, Pharmakologie und Toxikologie (Di Mambro *et al.*, 2003).

3.8.1 Prinzip des DPPH-Assays

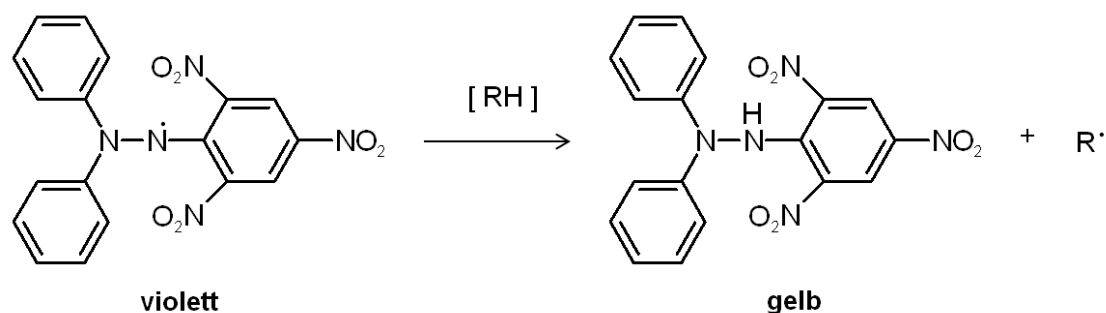


Abb. 3-26: Reduktion des DPPH-Radikals durch Antioxidantien (RH)

Dargestellt ist der Reaktionsmechanismus des DPPH-Assays. In Anwesenheit von natürlichen Reduktionsmitteln (z. B. Ascorbinsäure) oder Radikalfängern (z. B. α -Tocopherol) wird das DPPH-Radikal in die nicht-radikalische Form umgewandelt. Die dadurch veränderte Absorption der Verbindung lässt sich in Lösung bei 517 nm spektralphotometrisch bestimmen.

Das stabile freie DPPH-Radikal ist ein geeignetes Reagenz, um die Scavenger-Eigenschaften von Phenolen, Catechinen und Anilinen zu untersuchen. Der Test ist einfach und schnell durchzuführen und benötigt lediglich ein UV-Vis-Spektralphotometer. Dies erklärt die breite Anwendung in Antioxidans-Screenings.

Die Reaktionsrate des DPPH-Radikals hängt stark vom Lösungsmittel und vom pH-Wert ab (Ancerewicz *et al.*, 1998). Eine erhöhte Reaktivität von DPPH in Alkoholen wird der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem DPPH-Stickstoff und der Hydroxylgruppe des Alkohols zugeschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird daher Methanol als Lösungsmittel verwendet (vgl. Abschnitt 2.17.1). Die Farbänderung durch reduktive Umsetzung in Anwesenheit von Antioxidantien ist in **Abb. 3-26** dargestellt.

3.8.2 DPPH-Radikal-Scavenging von Resveratrol

In der Literatur werden unterschiedliche Reaktionskinetiken für antioxidative Verbindungen beschrieben. So reagiert zum Beispiel Ascorbinsäure sehr schnell mit dem DPPH-Radikal (ca. 5 min), während andere Verbindungen, wie (+)-Catechin, langsamere Reaktionsgeschwindigkeiten zeigen. Zudem scheint die Kinetik sowohl von der DPPH-Konzentration als auch der Konzentration des Antioxidans abhängig zu sein (Schäfer, 2007). Nachfolgend ist der Mechanismus des DPPH-Radikal-Scavengings von Resveratrol vereinfacht dargestellt (**Abb. 3-27**).

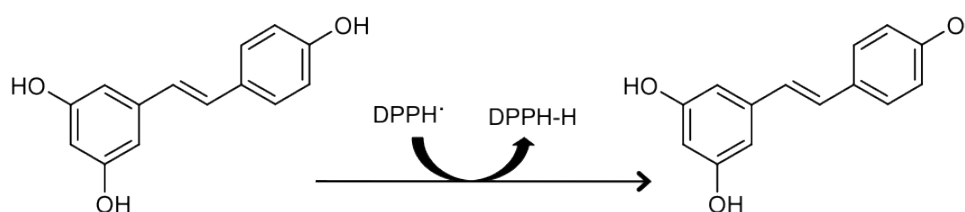


Abb. 3-27: Mechanismus des DPPH-Radikal-Scavengings von Resveratrol

Die Fähigkeit von polyphenolischen Verbindungen, antioxidativ zu wirken, ist sowohl von den Redox-Eigenschaften ihrer phenolischen Hydroxylgruppen als auch vom Potenzial für die Elektronendelokalisierung aufgrund ihrer chemischen Struktur abhängig. Die Struktur von Resveratrol bietet ein chromophores System, das Reaktionen mit dem DPPH-Radikal begünstigt. Sind phenolische Gruppen im Molekül vorhanden, so wird die radikalische Struktur über die Bildung von Resonanzstrukturen stabilisiert. Resveratrol besitzt zwei phenolische Ringstrukturen: einen Monophenol- und einen Diphenol-Aromaten. Die Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus der monophenolischen Hydroxylgruppe kann leicht auftreten (Gülçin, 2012).

3.8.3 Ergebnisse des DPPH-Assays

Um reproduzierbare Ergebnisse für Resveratrol und die Positivkontrollen (Ascorbinsäure und α -Tocopherol) zu erhalten, wurde die Reaktionszeit auf 10 min festgelegt und die Reaktion unter Lichtschutz durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.17.1). Die Scavenging-Aktivitäten von Resveratrol und die der Positivkontrollen (Ascorbinsäure und α -Tocopherol) wurden nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\text{Scavenging-Effekt (\%)} = [1 - (A_{(\text{Probe})} - A_{(\text{MeOH-blank})}) / A_{(\text{DPPH-Kontrolle})}] \times 100$$

$A_{(\text{Probe})}$	Absorption der Probe nach Umsetzung mit DPPH
$A_{(\text{DPPH-Kontrolle})}$	Absorption des DPPH-Radikals im LM MeOH
$A_{(\text{MeOH-blank})}$	Absorption von Methanol (LM-Wert)

Die in **Tab. 3-6** angegebenen IC_{50} -Werte entsprechen der Konzentration der Probe, die für das Abfangen von 50% des DPPH-Radikals erforderlich sind. Die Werte wurden durch Auftragen der prozentualen Scavenging-Aktivität gegen die Probenkonzentration aus der Kurve ermittelt. Für die Positivkontrollen (Ascorbinsäure und α -Tocopherol) besteht für den Konzentrationsbereich (0 – 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Scavenging-Effekt, für Resveratrol für den Bereich von 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 27,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tab. 3-6: Übersicht der IC_{50} -Werte aus dem DPPH-Assay

Dargestellt sind die IC_{50} -Werte aus dem DPPH-Assay für Resveratrol und die Positivkontrollen. Alle Bestimmungen wurden sechsmal durchgeführt und als Mittelwerte \pm SD angegeben (n=6). Die lineare Regressionsanalyse wurde verwendet, um die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Standard-Lösung für die Kalibrierung sowie der Proben zu berechnen.

IC ₅₀ -Werte		
Ascorbinsäure	α -Tocopherol	Resveratrol
6,9 \pm 0,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$	16,0 \pm 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$	21,3 \pm 1,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$
(38,9 \pm 1,02 $\times 10^{-3}$ μM)	(37,1 \pm 1,7 $\times 10^{-3}$ μM)	(93,3 \pm 7,0 $\times 10^{-3}$ μM)

Der IC_{50} -Wert von 21,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\hat{=}$ 93,3 μM) aus **Tab. 3-6** zeigt das schwächere Scavenging-Potential von Resveratrol im Vergleich zu den Positivkontrollen Ascorbinsäure und α -Tocopherol. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit aktuellen Studien zum antioxidativen Potential von Resveratrol (Kurin *et al.*, 2012). So

erzielen z. B. die äquimolaren Kombinationen aus Resveratrol und Quercetin bzw. Resveratrol und Kaffeesäure deutlich stärkere antioxidative Effekte als Resveratrol allein (Kurin *et al.*, 2012). Die Ergebnisse aus dem DPPH-Assay korrelieren mit der aufgezeigten moderaten antioxidativen Aktivität von Resveratrol bezüglich der NO-Scavenging Effekte (vgl. Abschnitt 3.6.1 und 3.6.2).

3.9 Zytotoxisches und pro-apoptotisches Potential von Resveratrol

Resveratrol wurde wie bereits erwähnt (vgl. Abschnitt 1.6) als chemopräventives Agens gegen Krebsentstehung beschrieben. Es besitzt die Fähigkeit, Krebs-Initiierung und -Förderung zu unterdrücken, sowie Phasen der Tumor-Initiation, -Promotion und -Progression zu stören (Jang *et al.*, 1997, Joe *et al.*, 2002). Dieses Potential gilt als ein interessanter und möglicher Ansatz in der Tumorthherapie sowohl für Mono- als auch Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika. In den nachfolgenden Untersuchungen dienten A549-Zellen (humane Lungenkrebs-Zellen) neben den J774-G8-Makrophagen als Modell zur Untersuchung pro-apoptotischer Prozesse, die durch Resveratrol ausgelöst werden können. Es sollte zudem geklärt werden, inwieweit die Bildung und Produktion von ROS in die Induktion der Apoptose involviert sind und inwiefern Resveratrol darauf Einfluss nimmt.

3.9.1 Apoptose-Induktion in J774-G8-Makrophagen

Morphologisch kommt es zu Beginn der Apoptose zu einer Verringerung des Zellvolumens. Die Zellorganellen bleiben – im Gegensatz zu Zellveränderungen bei der Nekrose – zunächst intakt und der Stoffwechsel läuft normal weiter.

In vivo werden die schrumpfenden Zellen von Phagozyten eliminiert, die die apoptotischen Zellen vor allem an Membranveränderungen, wie z. B. der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Plasmamembran, erkennen. *In vitro* lässt sich morphologisch nur zu einem späteren Zeitpunkt die Lyse der apoptotischen Zellen beobachten, da eine Phagozytose nicht möglich ist. Diese Lyse ähnelt dann dem Prozess der Nekrose.

In den frühen Phasen der Apoptose kann man die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran beobachten und zur Diskriminierung von apoptotischen und nekrotischen Vorgängen nutzen. Hierzu eignen sich Annexine, die mit einer hohen Affinität an Phosphatidylserin binden. Annexine dienen im physiologischen Gefüge u. a. zur Ausbildung von

Ionenkanal-Transportproteinen. Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, welches an einen Fluoreszenzmarker wie das Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt werden kann und so den Nachweis der Translokation des Phosphoglycerolipids mikroskopisch sowie durchflusszytometrisch ermöglicht (Keedwell *et al.*, 2004). Die Gegenfärbung mit Propidiumjodid ist nötig, um späte apoptotische Prozesse und nekrotische Prozesse sowie Zellmembranzerstörungen, zum Beispiel in Kontrollpräparaten, zu detektieren.

Die folgenden Ergebnisse zeigen die Untersuchung der Apoptose-Induktion in J774-G8-Makrophagen durch Resveratrol. **Abb. 3-28** und **3-29** zeigen die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität nach Behandlung mit den Positivkontrollen (PMA/Ionomycin und H_2O_2) sowie mit Resveratrol. Es werden sowohl früh-apoptotische [Annexin-V (+)] als auch spät-apoptotisch/nekrotische Zellen [Annexin-V (+) und PI (+)] diskriminiert (**Tab. 3-7**). Letztere erscheinen im Fluoreszenzmikroskop zum Teil gelb-rot.

Tab. 3-7: Korrelation zwischen Vitalitätsstadium und Fluoreszenzsignal

Status der Zelle	Fluoreszenzsignal	Farbe
früh-apoptotisch	Annexin-V positiv, PI-negativ	grün
lebend	Annexin-V-negativ, PI-negativ	ungefärbt
spät-apoptotisch/ nekrotisch (tot)	Annexin-V positiv, PI-positiv	gelb-rot

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert (Kanal 1: rot + Kanal 2: grün). Die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbungen der Mediumkontrolle und der Vehikelkontrolle zeigen keine Fluoreszenz. Die Aufnahmen wurden stark belichtet, da keine Kerngegenfärbung mit Bisbenzimid parallel angefertigt wurde, um die resultierenden Fluoreszenzen nicht zu überlagern. Die mit H_2O_2 behandelten J774-G8-Makrophagen zeigen bei den verwendeten Konzentrationen starke Kernanfärbungen durch Propidiumjodid (rot). Mit steigender Konzentration wird die Färbung im Kern diffuser und die Zellzahl nimmt überraschenderweise ab. Nach Behandlung mit der Apoptose-auslösenden Kombination aus PMA/Ionomycin erscheinen die Makrophagen deutlich grün. Im Gegensatz zur H_2O_2 -Behandlung ist für die Apoptosekontrolle (PMA/Ionomycin) keine rote Kernfärbung feststellbar. Die

Zellen zeigen zum dokumentierten Zeitpunkt also keine Membrandurchlässigkeit für Propidiumjodid (**Abb. 3-28**).

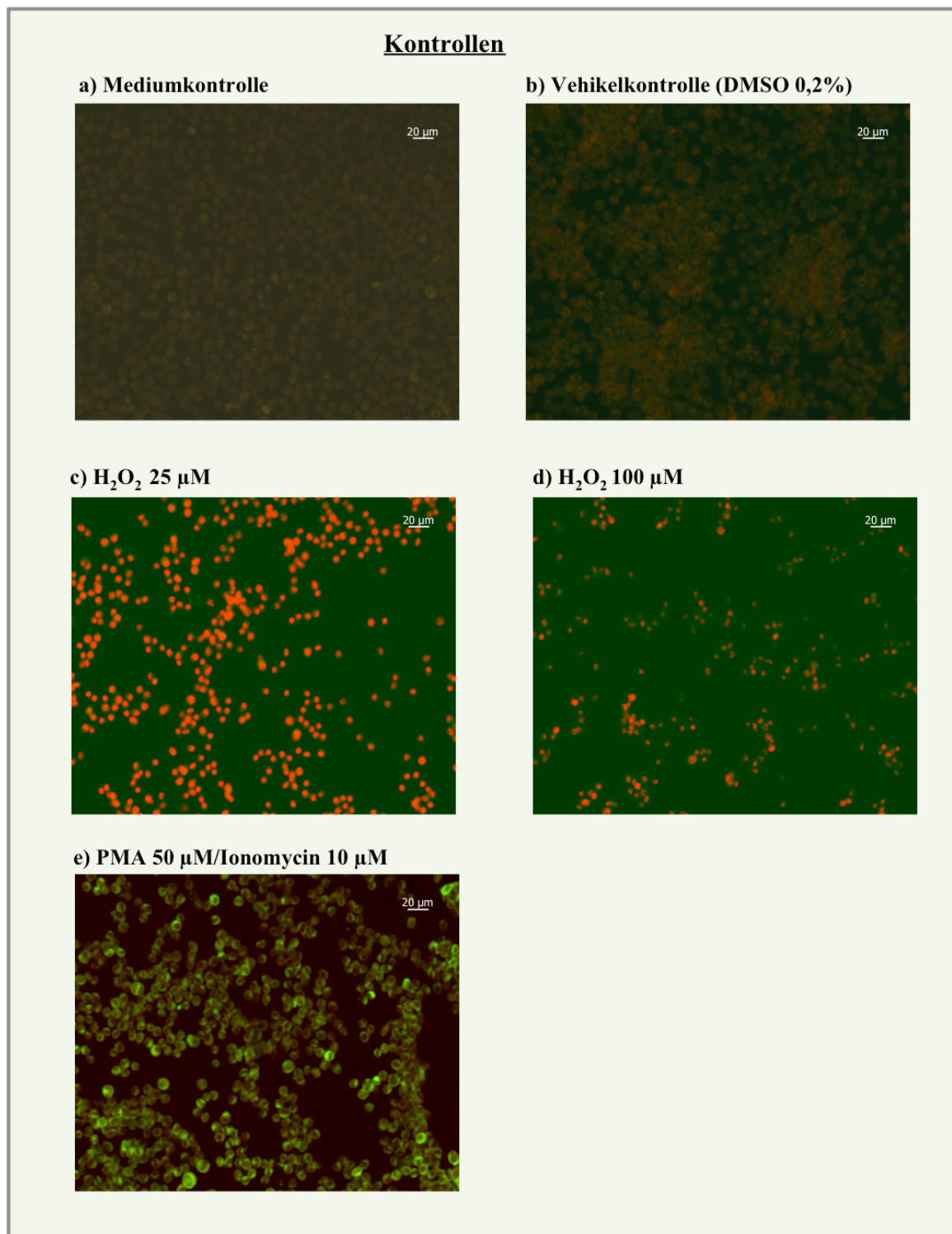


Abb. 3-28: Frühe Apoptose bei J774-G8-Makrophagen (Kontrollen)

Dargestellt sind die lichtmikroskopischen Kontroll-Präparate einer Versuchsreihe stellvertretend für drei unabhängige Experimente ($n=3$) mit ähnlichem Ergebnis (Belichtungszeit: 600 ms; linearer Wertebereich bei 5% im Min/Max-Modus zur Darstellung der Grau- bzw. Farbwerte).

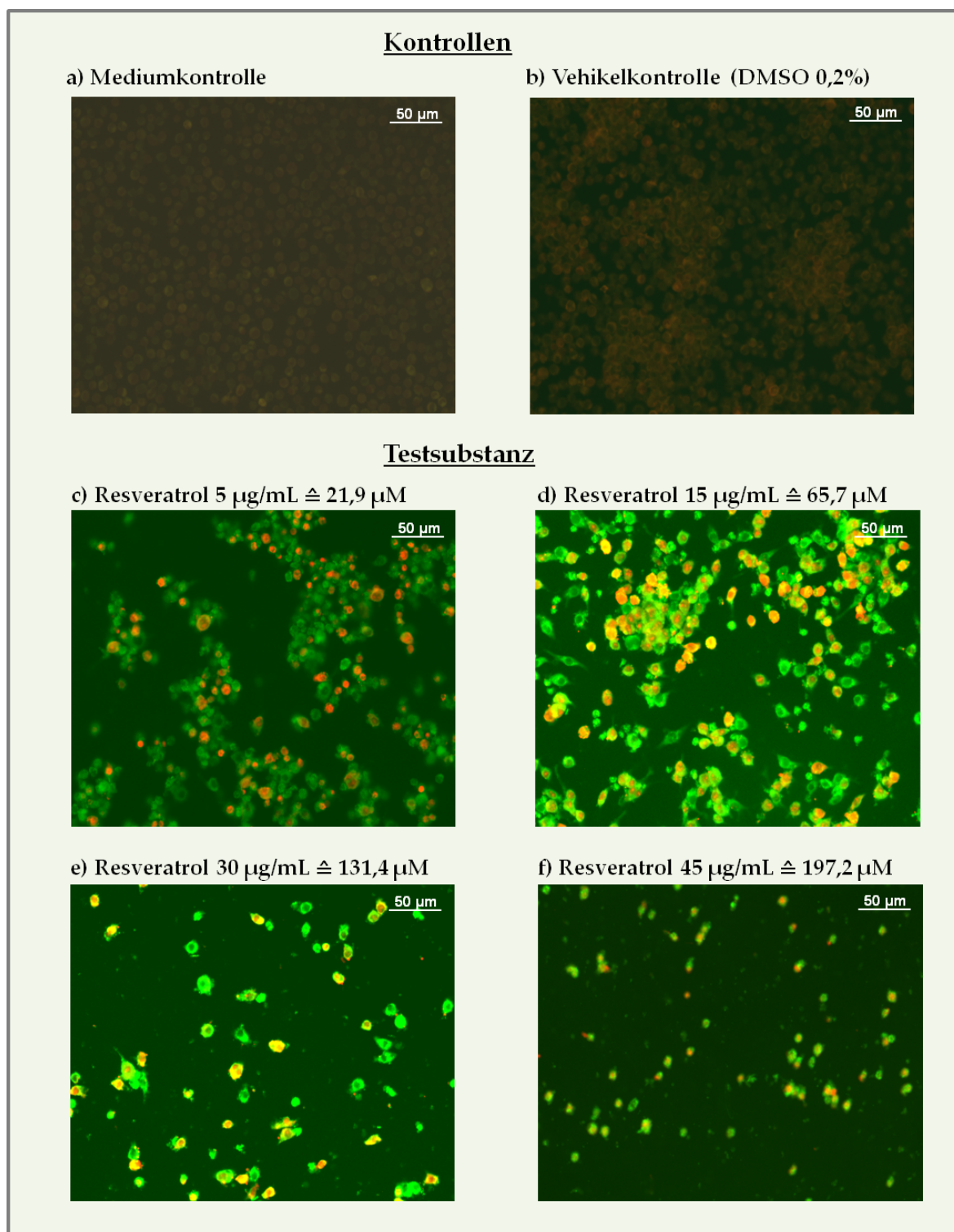


Abb. 3-29: Frühe Apoptose bei J774-G8-Makrophagen (Resveratrol)

Dargestellt sind die Kontroll- und Resveratrol-Präparate einer Versuchsreihe stellvertretend für drei unabhängige Experimente ($n=3$) mit ähnlichem Ergebnis (Belichtungszeit: 600 ms; linearer Wertebereich bei 5% im Min/Max-Modus zur Darstellung der Grau- bzw. Farbwerte).

Abb. 3-29 zeigt die Resultate der Annexin-V-FITC/PI-Färbung in den J774-G8-Makrophagen nach Behandlung mit Resveratrol. Die intensive grüne und auch

rote Fluoreszenz spiegeln die starke apoptotische Aktivität der Makrophagen nach Inkubation über 48 h mit Resveratrol wider. Neben der Zunahme der Fluoreszenzintensität lässt sich auch die Abnahme der Zelldichte mit steigender Konzentration des Stilbenderivats verzeichnen. Dies lässt auf eine abnehmende Adhäsionsfähigkeit der Zellen schließen, ein weiterer Indikator für die reduzierte Viabilität der Zellen.

3.10 Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur ROS-Bildung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Mitochondrien spielen bei der Apoptose-Induktion sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Eine wesentliche Quelle für die ROS-Bildung sind Mitochondrien, die über eine Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptischen Faktoren die Apoptose induzieren. Neben den pro-apoptischen Effekten besitzen ROS auch anti-apoptische Wirkungen (Simon *et al.*, 2000).

Mit der H₂-DFC-DA-Färbung soll das Potential von Resveratrol zur intrazellulären ROS-Bildung untersucht werden, um mögliche induzierte alternative Abwehrstrategien (vgl. Abschnitt 3.6.4) bei infizierten Makrophagen mit Leishmanien zu identifizieren. Damit sollte geklärt werden, inwieweit reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden und diese bei der Apoptose-Induktion eine Rolle spielen.

3.10.1 Prinzip der ROS-Färbung mit H₂-DCF-DA

Das Diacetat (H₂-DCF-DA) des Farbstoffs wird im Gegensatz zum 2',7'-Dichlordihydrofluorescein (H₂-DCF) schnell in die Zelle aufgenommen und akkumuliert im Zytosol. Dort wird H₂-DCF-DA von intrazellulären Esterasen zum H₂-DCF deacetyliert und verbleibt in der Zelle. Unter Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies wie dem Hydroxylradikal, dem Peroxynitritanion oder H₂O₂ wird das nicht fluoreszierende H₂-DCF zum fluoreszierenden Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert (**Abb. 3-30**). In diesem Zusammenhang ist wichtig zu bemerken, dass Peroxide sich mithilfe dieser Methode nur nachweisen lassen, wenn sie zuvor zu Radikalen umgewandelt wurden. So oxidiert H₂O₂ den Farbstoff nur langsam, in Gegenwart von Eisen(II)-Ionen hingegen sehr schnell (LeBel *et al.*, 1992).

Die resultierende Fluoreszenz ist proportional zur Konzentration freier Radikale. Die Detektion des DCF erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm (Halliwell und Whiteman, 2004).

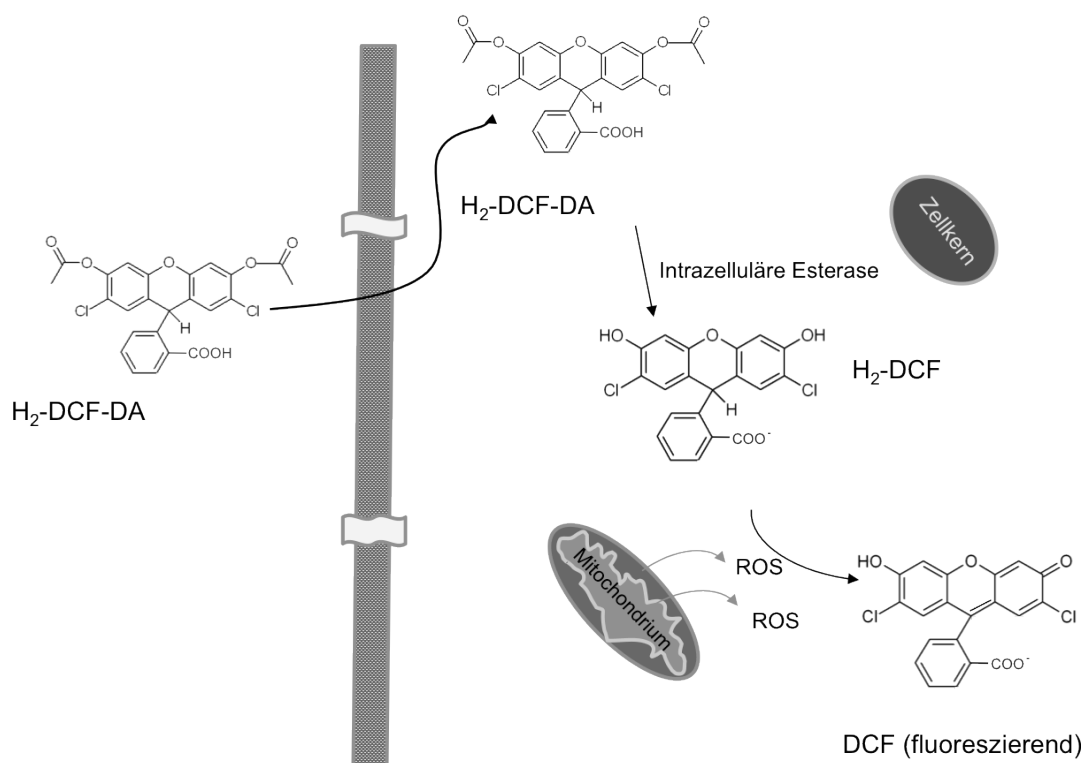


Abb. 3-30: Prinzip der ROS-Färbung

Dargestellt ist die Umwandlung von H_2 -DCF-DA zum fluoreszierenden DCF. Das Zellmembran-permeable H_2 -DCF-DA-Molekül wird von der Zelle aufgenommen und durch zelleigene Esterasen hydrolysiert. Das dadurch intrazellulär arrestierte H_2 -DCF kann durch mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies zum DCF oxidiert werden. Die emittierte Fluoreszenz von Dichlorfluorescein (DCF) kann fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusszytometrisch detektiert werden (Abbildung modifiziert nach Halliwell und Whiteman, 2004).

3.10.2 ROS-Bildung in J774-G8-Makrophagen

Für Resveratrol ist bekannt, dass es in der Lage ist, ROS-Level zu modulieren (Leonard *et al.*, 2003, Miki *et al.*, 2012). Die nachfolgenden Untersuchungen zeigen die ROS-Induktion bei J774-G8-Makrophagen.

Das nach Reaktion mit Sauerstoff gebildete grün fluoreszierende DCF (vgl. **Abb. 3-30**) ist für eine Detektion reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal (HO^\cdot), Peroxylradikal (HOO^\cdot) und Peroxynitritanion ($ONOO^\cdot$) gut geeignet. Zwar kann keine dezidierte Aussage hinsichtlich der Beteiligung einzelner Sauerstoff-Spezies getroffen werden, das Endprodukt ist jedoch mittels Fluoreszenzmikroskopie eindeutig detektierbar.

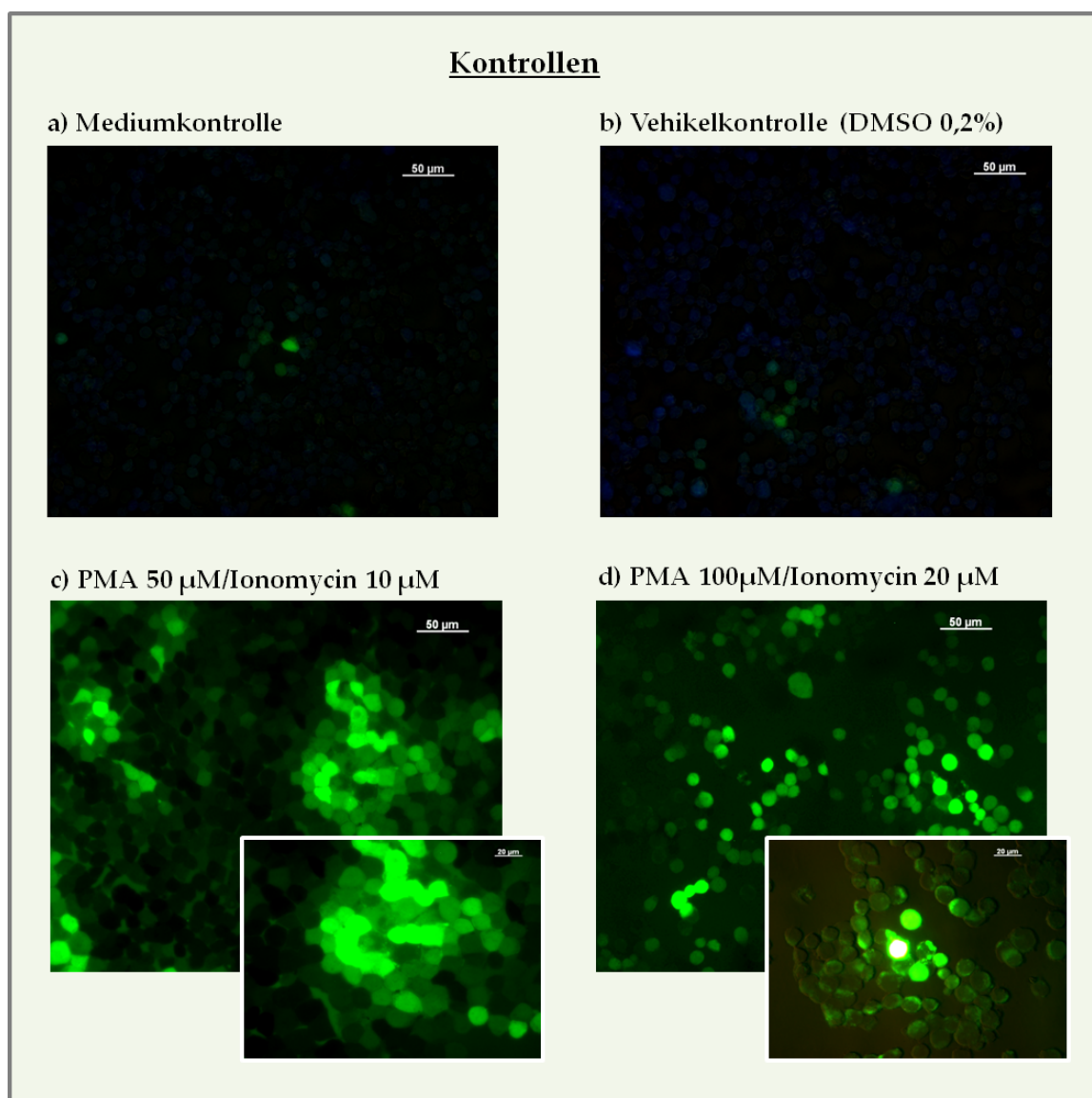


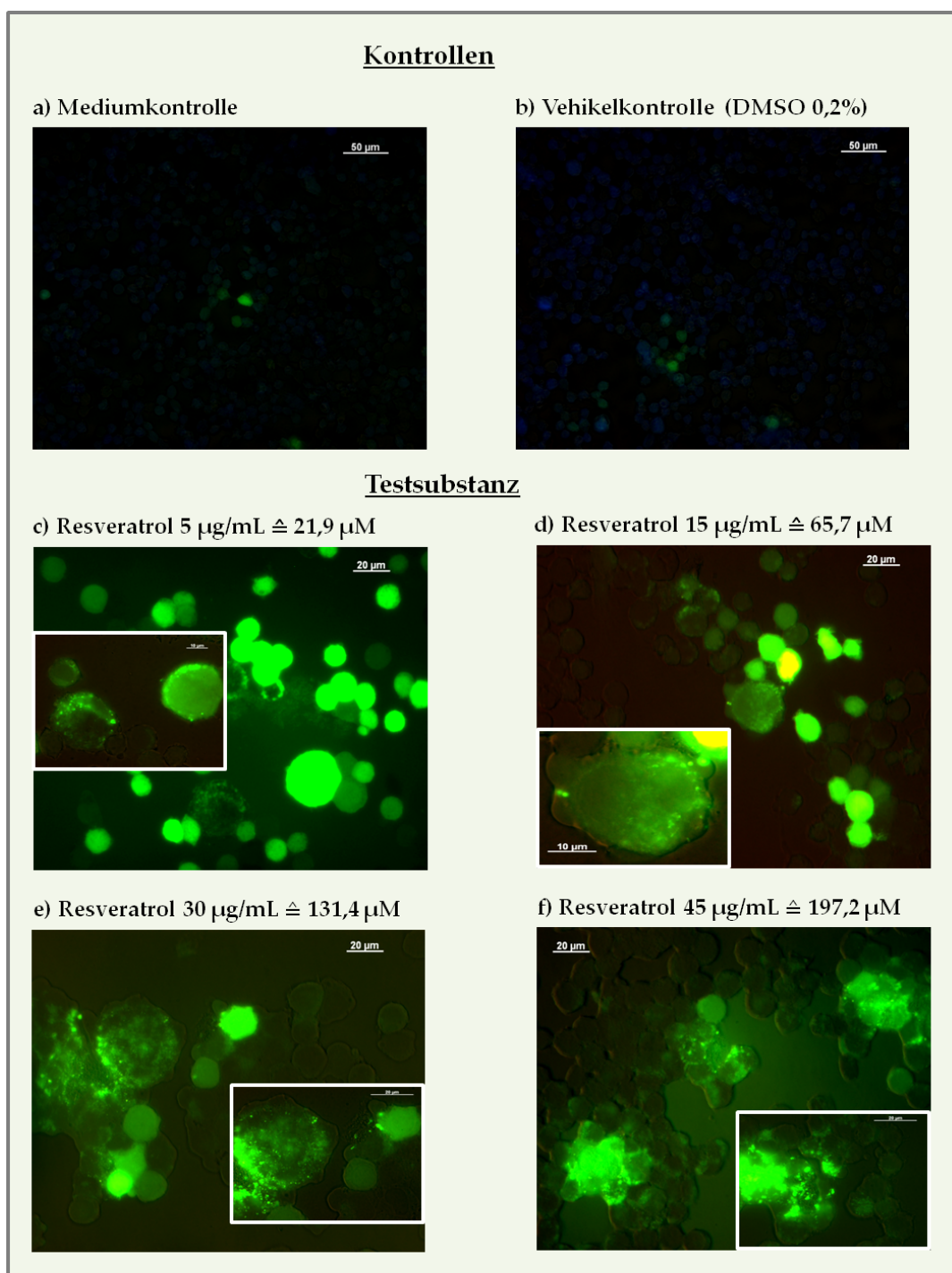
Abb. 3-31: ROS-Induktion in J774-G8-Makrophagen (Kontrollen)

Dargestellt ist die ROS-Induktion in J774-G8-Makrophagen nach Behandlung mit der Kombination aus PMA/Ionomycin im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (H2-DCF-DA-Färbung). Die Medium- und Vehikelkontrolle (Zellen + Medium + 0,2% DMSO) zeigen im Unterschied zu den Kontrollpräparaten keine grüne Fluoreszenz. Die Intensität verstärkt sich nach Behandlung mit der Kombination aus PMA/Ionomycin. Einstellungen am Axioskop: Belichtungszeit im GFP-Kanal: 600 ms (linear, Best Fit: 16%). Abgebildet ist ein beispielhaftes Experiment aus drei unabhängigen Testreihen ($n=3$) mit gleicher Intensität und Verteilung der Fluoreszenz.

Für die Kombination aus PMA und Ionomycin als Positivkontrolle zeigte sich in den Präparaten erwartungsgemäß eine grüne Fluoreszenz, was die Anwesenheit von ROS bestätigte. Dass Makrophagen nach Behandlung mit PMA und Ionomycin erhöhte Spiegel von Superoxid-Anion-Radikalen freisetzen, ist bekannt

(Finkel *et al.*, 1987). Diese Spezifikation konnte, wie schon erwähnt, mit der angewendeten Färbemethode nicht belegt werden.

Die Mosaikstruktur im Übersichtspräparat der PMA/Ionomycin-Behandlung ist auffällig (**Abb. 3-31**). In den Kontrollpräparaten (Medium- und Vehikelkontrolle) ergibt sich keine bzw. nur eine schwach grüne Fluoreszenz, die jedoch eine Unterscheidung zu den Testsubstanzen zulässt.



Die Beschriftung zur **Abb. 3-32** folgt auf der nächsten Seite.

Abb. 3-32: ROS-Induktion in J774-G8-Makrophagen (Resveratrol)

Dargestellt ist die ROS-Induktion in J774-G8-Makrophagen nach Behandlung mit Resveratrol (H_2 -DCF-DA-Färbung). Alle Präparate der Serie wurden unter folgenden Einstellungen am Axioskop aufgenommen: Belichtungszeit im GFP-Kanal: 600ms (linear, Best Fit 16%). Abgebildet ist ein beispielhaftes Experiment aus drei unabhängigen Testreihen ($n=3$) mit gleicher Intensität und Verteilung der Fluoreszenz.

Bei den mit Resveratrol behandelten J774-G8-Makrophagen zeigte sich mit steigenden Resveratrol-Konzentrationen eine deutliche Intensitätszunahme der grünen Fluoreszenz, was auch hier die Produktion von ROS belegt. Zur besseren Veranschaulichung der feinen punktuellen Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Zellen sind Detail-Ausschnitte in den Abbildungen eingefügt. Bei höheren Konzentrationen von Resveratrol bildeten sich in den Präparaten zunehmend zusammenhängende fluoreszierende Zell-Aggregate. Bei geringeren Resveratrol-Konzentrationen waren hingegen stark fluoreszierende Einzelzellen zu beobachten (**Abb. 3-32**).

3.10.3 ROS-Bildung in A549-Zellen

Resveratrol hat gezeigt, dass es ein chemotherapeutisches Potential durch die Induktion von Apoptose besitzt (Gullett *et al.*, 2010). Zudem lassen neuere Untersuchungen vermuten, dass geringe Mengen Resveratrol das Zellwachstum von A549-Zellen hemmen könnten. Dies zeigt sich vor allem bei der Induktion einer vorzeitigen Alterung durch ROS-vermittelte DNA-Schäden in den Krebszellen (Luo *et al.*, 2013). Die Frage nach der Involvierung von ROS-Spezies in humanen Lungenkarzinomzellen, wie z. B. A549, ist von wissenschaftlichem Interesse, da die ROS pro-apoptotisch wirken können und deshalb im Krebsgeschehen eine Rolle spielen.

Lungenkrebs zählt zu den gefährlichsten Krebsarten. Laut DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) belegt Lungenkrebs auf der Prävalenz-Liste in Deutschland für beide Geschlechter den dritten Platz. Das weitgehend beschwerdefreie Wachstum des Tumors erschwert die frühzeitige Erkennung, ohne die eine wirksame Therapie nicht möglich ist. Die 5-Jahre-Überlebensrate der Patienten hat sich trotz weiterentwickelter therapeutischer Ansätze über viele Jahrzehnte hinweg nicht wesentlich verbessert. Diese schlechte Prognose unterstreicht die Notwendigkeit für die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und effektiven Behandlung dieser Krebsart. Allerdings sind die

genauen molekularen Mechanismen offenbar zellabhängig und noch nicht vollständig geklärt.

Die folgende Untersuchung zeigt die ROS-Bildung in A549-Zellen nach Behandlung mit Positivkontrollen (**Abb. 3-33**) und Resveratrol (**Abb. 3-34**).

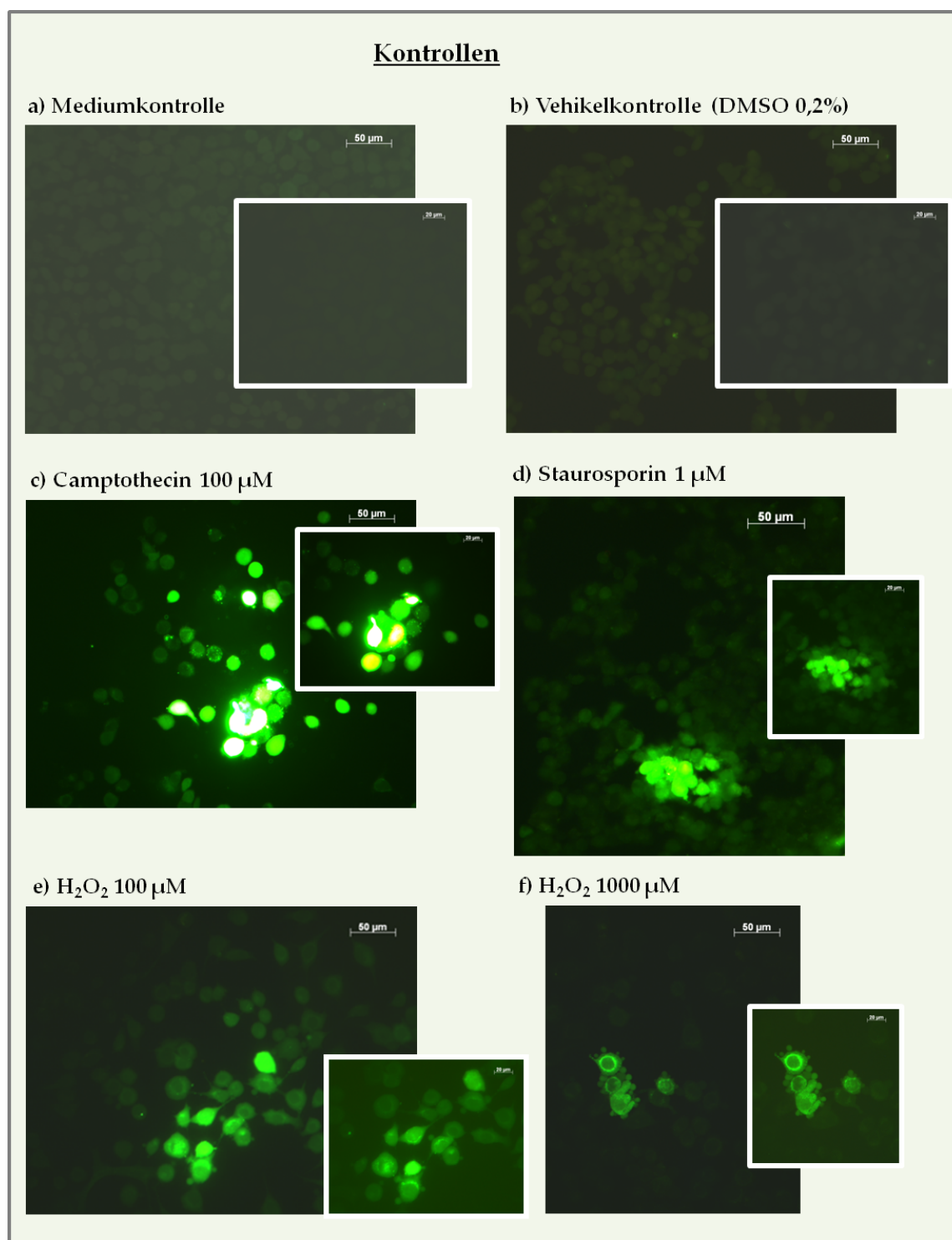


Abb. 3-33: ROS-Induktion in A549-Zellen (Kontrollen)

Dargestellt ist die ROS-Induktion in A549-Zellen nach Behandlung mit Positivkontrollen (H₂-DCF-DA-Färbung). Einstellungen am Axioskop:

Belichtungszeit im GFP-Kanal: 800 ms (linear, Best Fit 16%). Abgebildet ist ein beispielhaftes Experiment aus drei unabhängigen Testreihen (n=3) mit gleicher Intensität und Verteilung der Fluoreszenz. Medium- und Vehikelkontrolle (Zellen + Medium + 0,2% DMSO) zeigen im Unterschied zu den Positivkontrollen keine Fluoreszenz. Camptothecin (100 μM), Staurosporin (1 μM) und H_2O_2 (100 μM und 1 mM) zeigen unterschiedlich starke grüne Fluoreszenzintensitäten.

Neben der starken Fluoreszenzbildung in den A549-Zellen sind auch morphologische Veränderungen in den Präparaten zu erkennen. Besonders zu beachten ist die Bläschenbildung, die vor allem in den H_2O_2 -Präparaten zu sehen ist. Es handelt sich dabei einerseits um Zytoplasmaausstülpungen, andererseits um membranumhüllte Bruchstücke, die Apoptosekörperchen. Durch die Behandlung mit H_2O_2 ist also nicht nur die ROS-Bildung, sondern auch eine starke morphologische Veränderung der Zellen erkennbar. In den Kontroll-Präparaten mit Camptothecin ist bei gleicher Belichtungszeit die stärkste Fluoreszenzintensität zu verzeichnen (**Abb. 3-33**). Die morphologische Desintegration und Fragmentation, zusammen mit einer starken Fluoreszenzintensität, fallen in nennenswerter Ausprägung auch in den Resveratrol-Präparaten (v. a. bei 15 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 65,7 \mu\text{M}$) auf (**Abb. 3-34**). Die Zunahme der Grundintensität der Fluoreszenz in den Resveratrol-Präparaten und die morphologischen Veränderungen der Zellen zeigen das große Potential von Resveratrol, reaktive Sauerstoffspezies unter den gegebenen Bedingungen in der humanen Lungenkrebszelllinie A549 zu induzieren (**Abb. 3-34**).

Die Vehikelkontrolle (Zellen + Medium + 0,2% DMSO) zeigen im Unterschied zu den Resveratrol-Präparaten keine Fluoreszenz. Für Resveratrol war über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg eine starke grüne Fluoreszenzintensität zu beobachten.

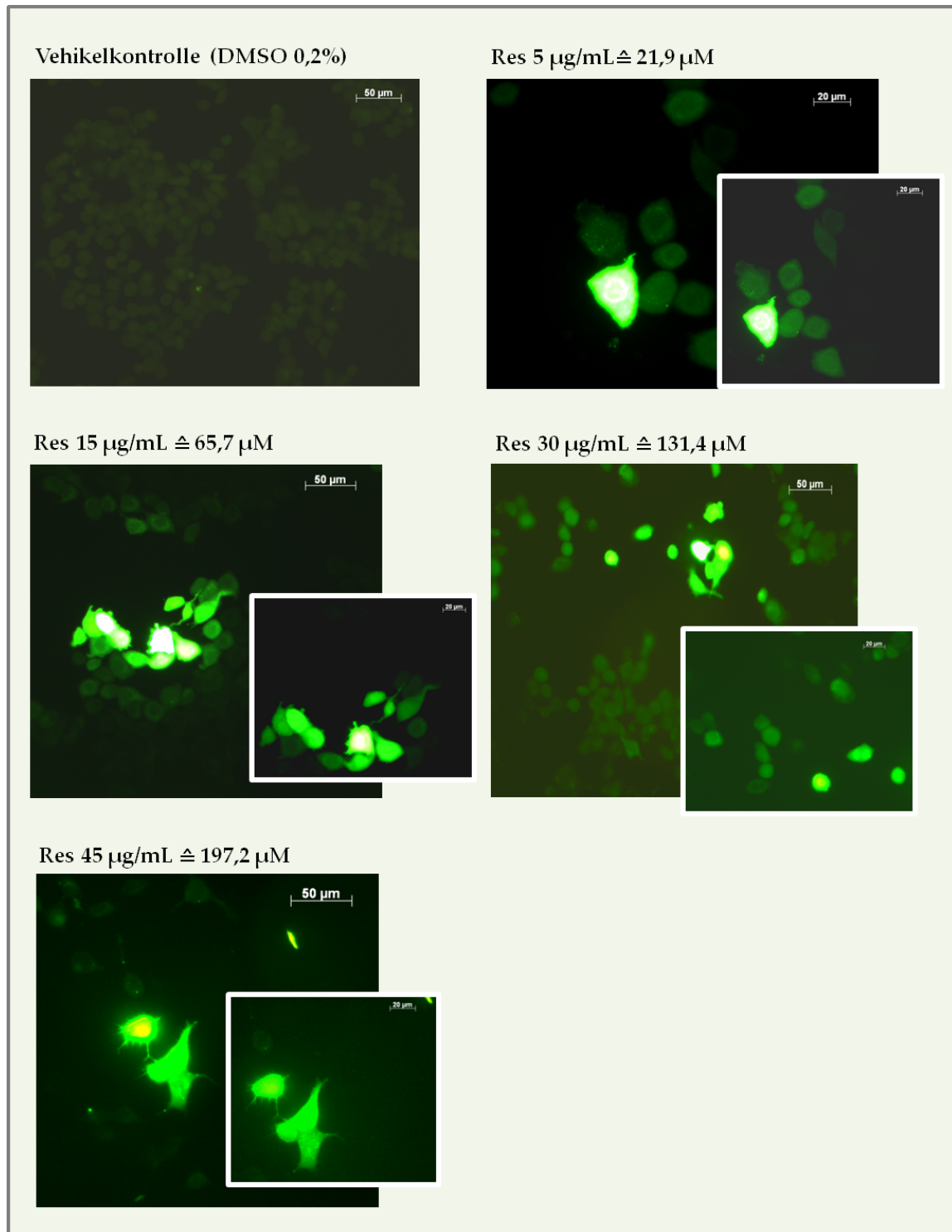


Abb. 3-34: ROS-Bildung in A549-Zellen (Resveratrol)

Dargestellt ist die ROS-Induktion in A549-Zellen nach Behandlung mit Positivkontrollen ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Färbung). Einstellungen am Axioskop: Belichtungszeit im GFP-Kanal: 800 ms (linear, Best Fit 16%). Abgebildet ist ein beispielhaftes Experiment aus drei unabhängigen Testreihen ($n=3$) mit gleicher Intensität und Verteilung der Fluoreszenz. Die Vehikelkontrolle (Zellen + Medium + 0,2% DMSO) zeigt im Unterschied zu den Resveratrolpräparaten keine Fluoreszenz.

3.11 Durchflusszytometrische Untersuchung zur ROS-Bildung

3.11.1 Titration des Farbstoffs H₂-DCF-DA im FACS-Gerät BD™ LSR II

Neben der Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die A549-Zellen zur Überprüfung der Ergebnisse bezüglich der ROS-Bildung auch durchflusszytometrisch untersucht. Aufgrund der starken Eigenfluoreszenz des Farbstoffs war es jedoch notwendig, die bisher verwendete Farbstoff-Konzentration aus der Fluoreszenz-Mikroskopie (2 μ M, vgl. Abschnitt 2.21.1) neu anzupassen. **Abb. 3-35** zeigt die Titration des Farbstoffs (Eigenfluoreszenz) ohne induzierte ROS-Bildung durch Positivkontrollen oder durch Resveratrol. Dabei ergab die Farbstoff-Konzentration von 20 nM noch ein zu starkes Fluoreszenz-Signal. Für alle nachfolgenden Testreihen wurde daher die Konzentration von 2 nM eingesetzt, um die Verschiebung des FITC-Signals nach Behandlung mit Resveratrol und den Kontrollsubstanzen innerhalb der Zellpopulation besser detektieren zu können (**Abb. 3-36**).

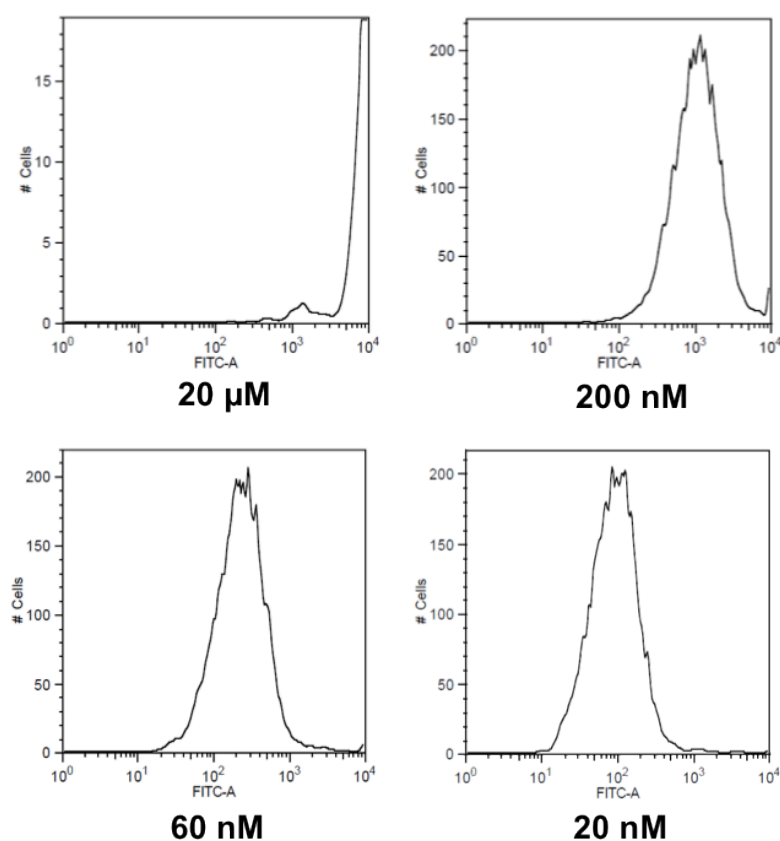


Abb. 3-35: Titration des H₂-DCF-DA im FACS BD™ LSR II

Darstellung des FITC-Signals über die gezählte Zellpopulation (Counts: 10.000) in Abhängigkeit der gewählten Farbstoffkonzentration.

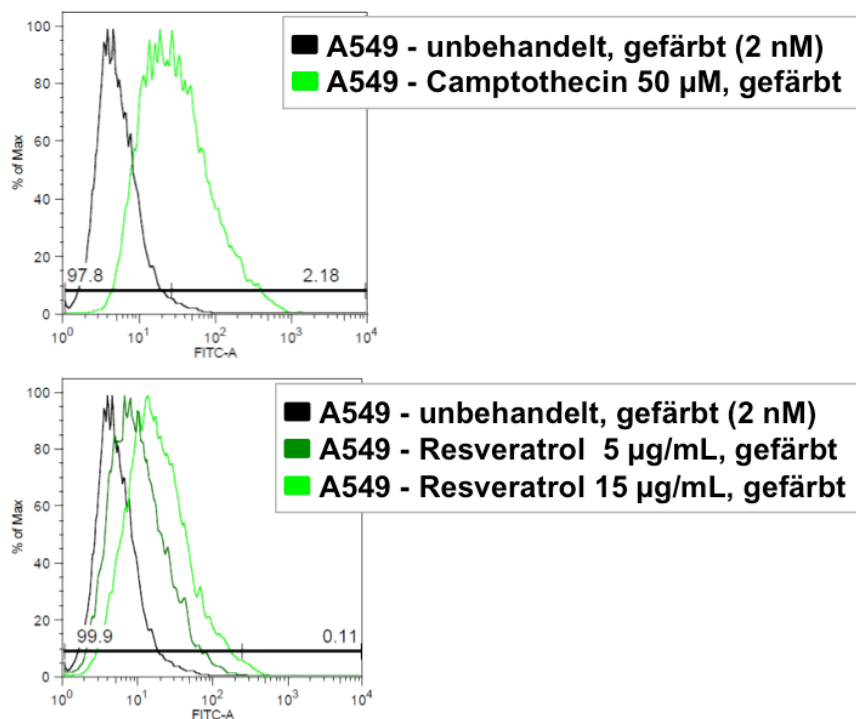


Abb. 3-36: ROS-Bildung durch Camptothecin und Resveratrol

Dargestellt ist die Verschiebung der Zellpopulation im Histogramm (FITC-Signal im grünen Kanal) nach intrazellulärer ROS-Bildung durch Camptothecin und Resveratrol (H_2 -DCF-DA-Färbung; Counts: 10.000). Die Rechtsverschiebung entspricht der Intensität der grünen Fluoreszenz pro Partikel nach Behandlung mit Camptothecin $50 \mu\text{M}$ oder Resveratrol $5 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 21,9 \mu\text{M}$) und $15 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 65,7 \mu\text{M}$).

3.11.2 ROS-Bildung in A549-Zellen durch Resveratrol

Für die Auswertung des durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bedingten Fluoreszenzanstiegs, bedingt durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wurde am Durchflusszytometer die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gewählt. Die MFI ist ein Maß für die Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff bzw. intrazellulärer Fluoreszenz pro Partikel. **Abb. 3-37** zeigt eine signifikante, konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität für Camptothecin, Staurosporin und auch für Resveratrol. Die Fluoreszenzintensität von H_2O_2 erhöht sich lediglich moderat. Ähnlich wie in den mikroskopischen Analysen war die Fluoreszenzintensität für die Wasserstoffperoxid-Präparate zwar gut detektierbar, im Verhältnis zum Camptothecin jedoch eher moderat (vgl. **Abb. 3-33**). Für die Resveratrol-Präparate stimmen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen hinsichtlich der Intensität und Verbreitung der ROS-Induktion mit den quantifizierten Werten aus der Durchflusszytometrie überein.

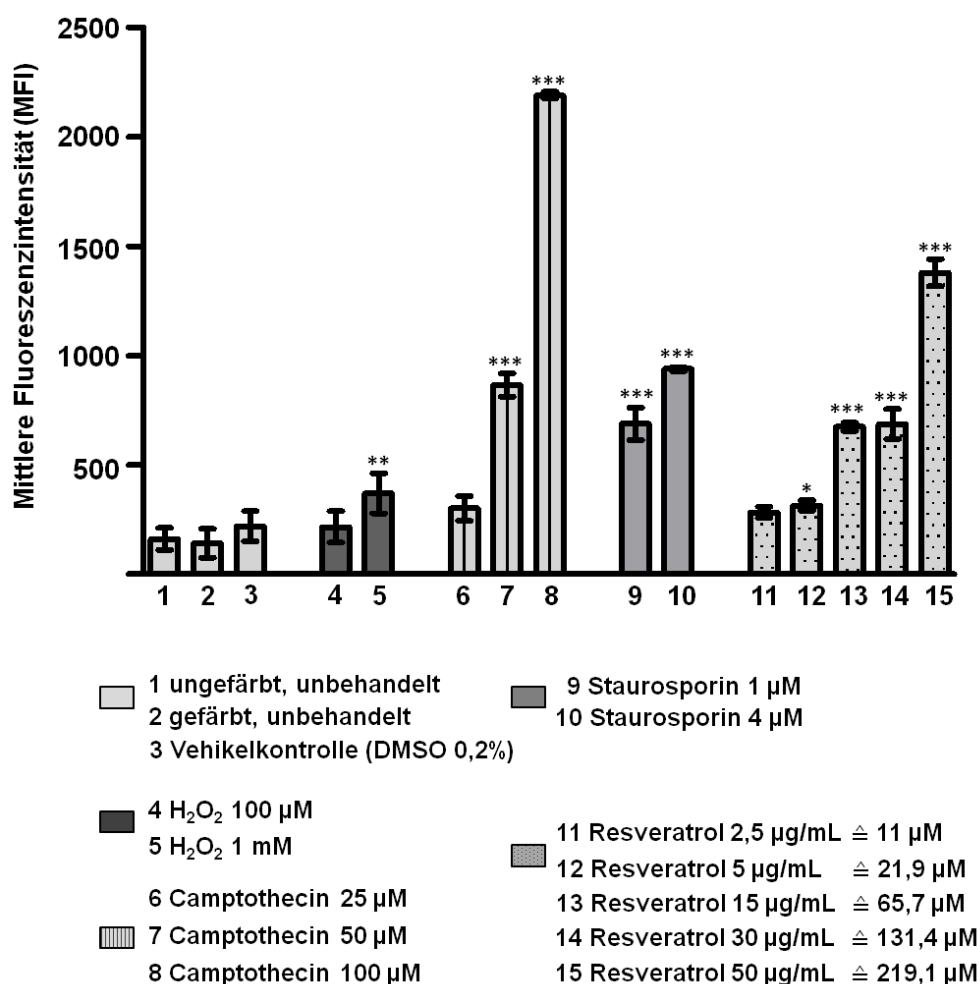


Abb. 3-37: ROS-Bildung in A549-Zellen

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären ROS-Bildung in A549-Zellen mittels H₂-DCF-DA-Färbung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten, gefärbten Kontrolle mittels One-Way-ANOVA mit post hoc Test nach Dunnett. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3.12 Apoptose-Induktion in A549-Zellen

Die Versuchsergebnisse zur Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung mit Resveratrol (vgl. Abschnitt 3.10 f.) führten zur Frage, inwieweit der durch Resveratrol ausgelöste oxidative Stress zur Induktion der Apoptose in A549-Zellen beiträgt.

In **Abb. 3-38** ist die Apoptose-Induktion in A549-Zellen nach Behandlung mit Camptothecin und Staurosporin dokumentiert. Während die Medium- und Vehikelkontrollen nur ein schwaches Fluoreszenz-Signal aufwiesen, zeigten die Kontrollpräparate (Camptothecin und Staurosporin, Inkubationszeit 24 h) eine

Zunahme der Fluoreszenz-Intensität. Auffällig bei den Staurosporin-Präparaten war die Abrundung und Zusammenballung der Zellen. Bei höherer Konzentration spricht die geringe Zellzahl für eine Ablösung vom Zellkulturplastik und damit für eine beeinträchtigte Viabilität.

In **Abb. 3-39** sind die Effekte dargestellt, die durch Resveratrol ausgelöst wurden. Im Vergleich zu den Kontroll-Aufnahmen stieg die Fluoreszenz-Intensität in den über 24 h mit Resveratrol behandelten Zellkulturen (A549) deutlich an. Dies spricht für die Translokation des Phosphatidylserins auf die Außenseite der Zellmembran und für die Induktion von Apoptose.

Die Behandlung der A549-Zellen mit H_2O_2 (Konzentration $1000 \mu M$) bewirkte eine starke, jedoch räumlich begrenzte Zunahme der Fluoreszenz-Intensität innerhalb des abgebildeten Zellverbandes (Fluoreszenz-Inseln). In den mit Resveratrol behandelten A549-Zellen nahm die Fluoreszenz-Intensität im gesamten Bildausschnitt repräsentativ für das ganze Präparat zu. Zudem konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der grünen Fluoreszenz-Intensität beobachtet werden (**Abb. 3-39**).

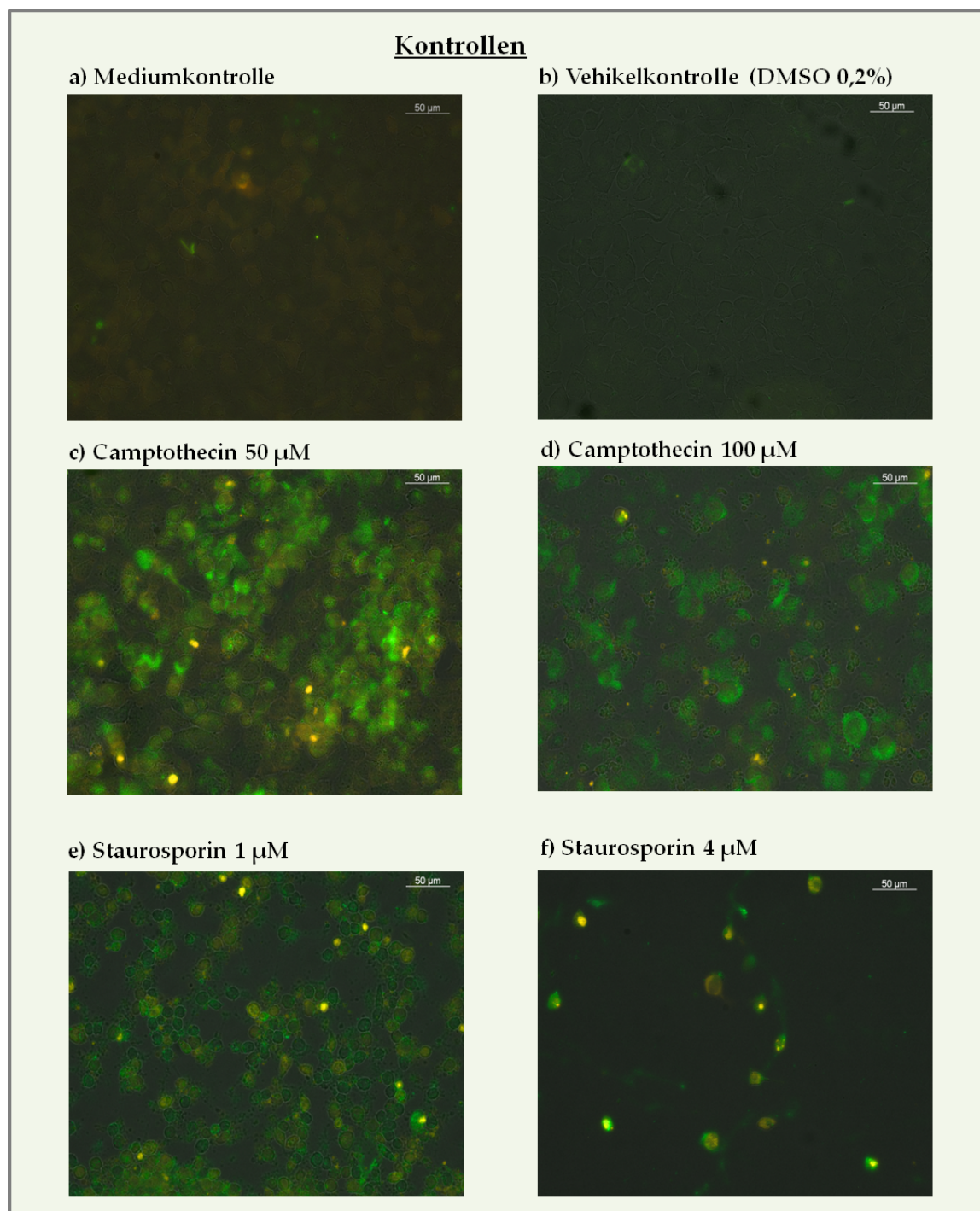


Abb. 3-38: Apoptose-Induktion in A549-Zellen (Kontrollen)

Dargestellt ist die Apoptose-Induktion in A549-Zellen mittels Annexin-V/PI-Färbung. Die Abbildung zeigt Fluoreszenz-Aufnahmen von drei Versuchsreihen (n=3) mit ähnlichem Ergebnis (Aufnahmebedingungen: linear, BLZ: 600 ms, Min/Max: 5%). Medium- und Vehikelkontrolle (Zellen + Medium + 0,2% DMSO) zeigen im Unterschied zu den Positivkontrollen keine Fluoreszenz. Camptothecin (100 µM), Staurosporin (1 µM) und H₂O₂ (100 µM und 1 mM) zeigen unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitäten.

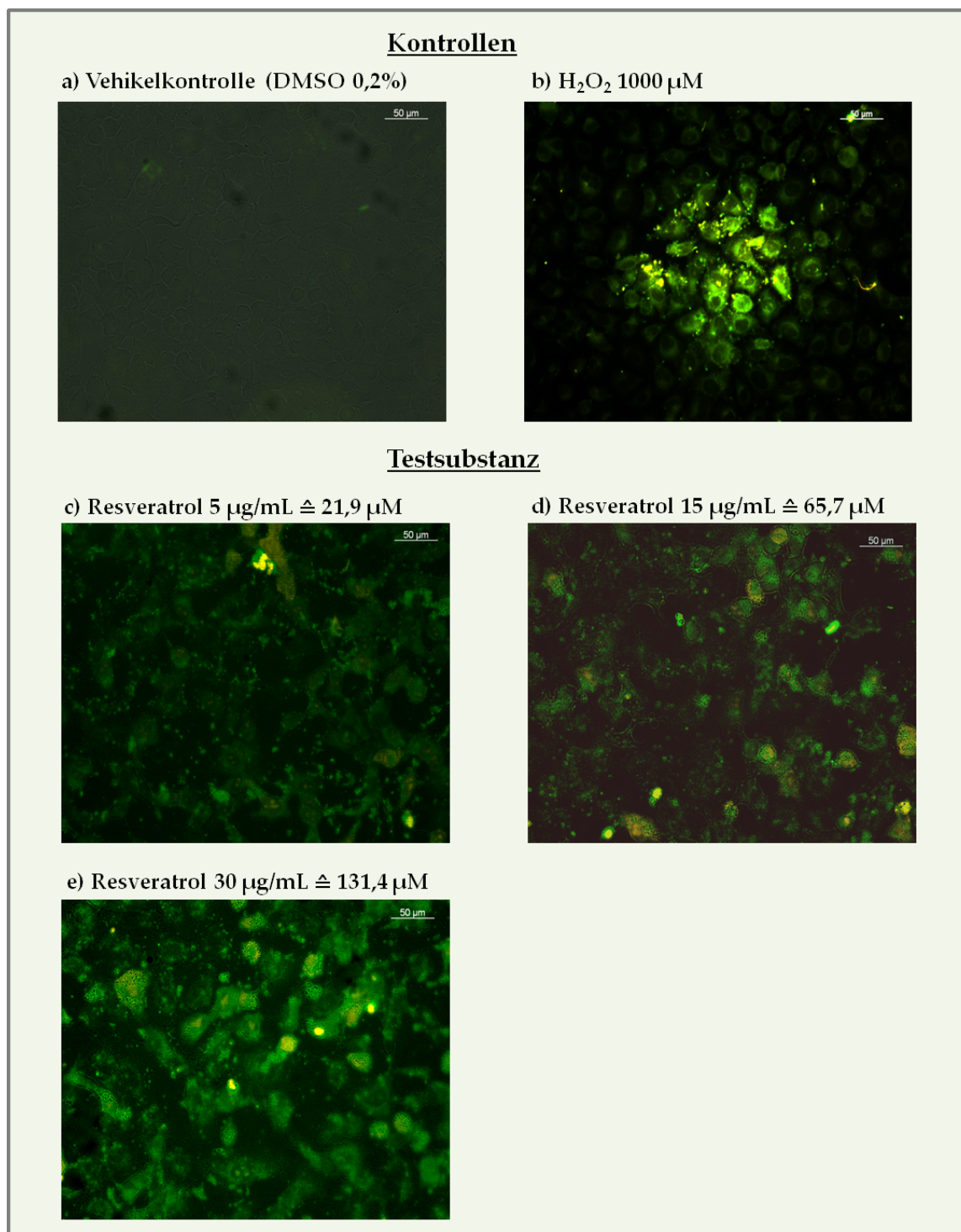


Abb. 3-39: Apoptose-Induktion in A549-Zellen (Resveratrol)

Dargestellt ist die Apoptose-Induktion mit H₂O₂ und Resveratrol in A549-Zellen mittels Annexin-V/PI-Färbung. Die Abbildung zeigt Fluoreszenz-Aufnahmen von drei Versuchsreihen mit ähnlichem Ergebnis (Aufnahmebedingungen: linear, BLZ: 600 ms, Min/Max: 5%). Abgebildet ist ein beispielhaftes Experiment aus drei unabhängigen Testreihen (n=3) mit gleicher Intensität und Verteilung der Fluoreszenz. Die Vehikelkontrolle (Zellen + Medium + 0,2% DMSO) zeigt im Unterschied zu den Resveratrolpräparaten keine Fluoreszenz.

3.13 Zytotoxizität von Resveratrol in A549-Zellen (MTT-Test)

Um einen Einblick in die Zytotoxizität von Resveratrol zu bekommen, wurde nachfolgend die Zellviabilität von A549-Zellen nach Behandlung mit Resveratrol untersucht. **Abb. 3-40** zeigt die Abnahme der Zellviabilität der A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Resveratrol. Für die Behandlung der Krebszellen mit Resveratrol bestätigte sich im MTT-Test das zytotoxische Potential, auf das die Annexin/PI-Färbung bereits hindeutete (vgl. Abschnitt 3.12).

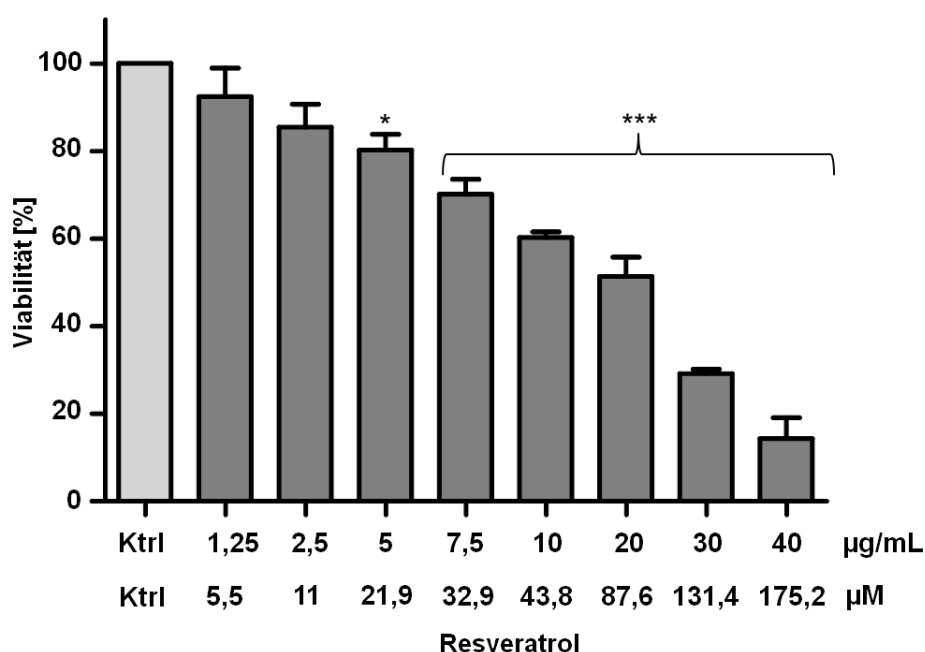


Abb. 3-40: Abnahme der Zellviabilität in A549-Zellen

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität in A549-Zellen nach Behandlung mit Resveratrol. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$) je Konzentration und Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels One-Way-ANOVA mit post hoc Test nach Dunnett. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3.14 Caspase-Induktion in A549-Zellen durch Resveratrol

3.14.1 Caspase 3-Aktivierung (Kolorimetrie)

Um die Apoptose-Induktion genauer charakterisieren zu können, war der Nachweis von Caspasen von zentraler Bedeutung, der in den nachfolgenden Untersuchungen geführt wurde.

Bei der Caspase-abhängigen Apoptose unterscheidet man die Apoptose vom Typ I und vom Typ II. Der extrinsische Weg (Typ I) wird durch den sogenannten Todesrezeptor (CD 95) vermittelt, der direkt die Initiatorcaspase 8 und Effektorcaspase 3 aktiviert (vgl. **Abb. 1-7**). Der intrinsische oder auch mitochondriale Weg (Typ II) führt unter anderem zu einer Aktivierung der Caspase 9 und zur Aktivierung der Caspase 3 (Stennicke *et al.*, 1998, Green und Reed, 1998).

Um zu klären, ob und inwieweit die Apoptose-Induktion durch Resveratrol im Zusammenhang mit der Aktivierung von Caspasen steht, wurde ein kolorimetrischer Assay zur Messung der Caspase-Aktivität eingesetzt.

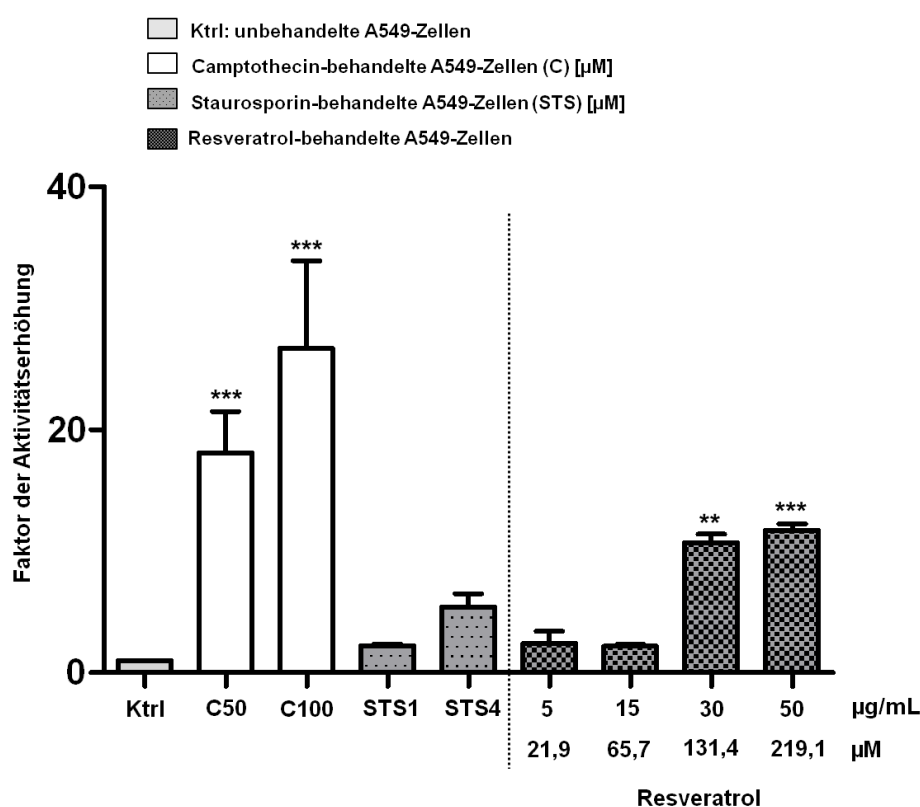


Abb. 3-41: Caspase 3-Aktivität in A549-Zellen

Dargestellt ist die Caspase 3-Aktivität in A549-Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen relativ zur Kontrolle. Die Abbildung zeigt die Auswertung der Absorptionwerte der kolorimetrischen Detektion. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels One-Way-ANOVA mit post hoc Test nach Dunnett. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Der kolorimetrische Caspase 3-Assay basiert auf der Hydrolyse des Peptid-Substrates Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilid (Ac-DEVD-pNA). Die Freisetzung des p-Nitroanilids (pNA) aus dem Peptid ist proportional zur

Caspase 3-Aktivität. Das pNA absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm und kann im ELISA-Reader vermessen werden. Die Konzentration des freigesetzten pNA kann anhand einer Kalibrierkurve über eine definierte pNA-Lösung bestimmt werden.

Die aus den behandelten Zellen hergestellten Lysate wurden auf ihre Caspase 3-Aktivität untersucht. Die 24-stündige Inkubation der A549-Zellen mit der Testsubstanz Resveratrol (5-50 $\mu\text{g}/\text{mL} \cong 21,9\text{-}219,1 \mu\text{M}$) und den Kontrollsubstanzen [Camptothecin (C50: 50 μM , C100: 100 μM) und Staurosporin (STS1: 1 μM , STS4: 4 μM)] zeigte vor allem für Camptothecin eine deutliche Aktivitätssteigerung der Caspase 3. Staurosporin zeigte in den getesteten Konzentrationen eine moderate Aktivitätssteigerung um den Faktor 3-5. Resveratrol zeigte eine um den Faktor 10 erhöhte Aktivitätssteigerung der Caspase 3 ab einer Konzentration von etwa 130 μM (**Abb. 3-41**). Eine Caspase 3-abhängige Apoptose durch Resveratrol wird folglich erst ab höheren Konzentrationen ($\geq 130 \mu\text{M}$) erreicht.

3.14.2 Caspase 8-Aktivierung (Kolorimetrie)

Im folgenden Versuch wurde die Induktion der Caspase 8 für die Kontrollsubstanzen Camptothecin, Staurosporin sowie Resveratrol überprüft. Im Gegensatz zur Caspase 3-Bestimmung ergab sich nur für Camptothecin nach 24-stündiger Inkubationszeit eine moderate Aktivitätssteigerung für die Caspase 8. Für Resveratrol und Staurosporin zeigte sich keine signifikante Aktivitätserhöhung der Caspase 8 (**Abb. 3-42**). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Caspase 8-abhängige Apoptose folglich durch Resveratrol nicht induziert wird.

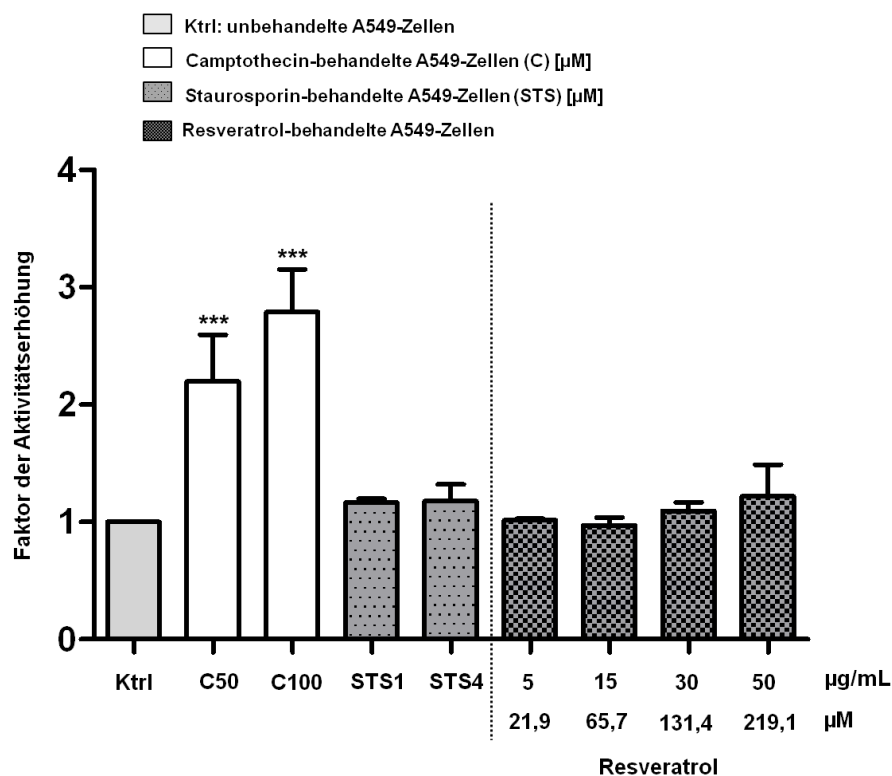


Abb. 3-42: Caspase 8-Aktivität in A549-Zellen

Dargestellt ist die Caspase 8-Aktivität in A549-Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen relativ zur Kontrolle. Die Abbildung zeigt die Auswertung der Absorptionwerte der kolorimetrischen Detektion. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Die statistische Auswertung erfolgte relativ zur unbehandelten Kontrolle mittels One-Way-ANOVA mit post hoc Test nach Dunnett. Als statistisch signifikant gelten: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Resveratrol unter den gegebenen Bedingungen in A549-Zellen Apoptose nicht oder allenfalls geringfügig über den extrinsischen Apoptose-Signalweg vermittelt (keine Aktivierung der Caspase 8). Sehr wahrscheinlich verläuft die Apoptose-Induktion durch Resveratrol bei höheren Konzentrationen über den intrinsischen Weg für welchen die Aktivierung der Caspase 9 eine Voraussetzung wäre. Dieser Mechanismus wurde bereits für Staurosporin beschrieben (Daubrawa 2009).

Dass zudem ROS eine Rolle bei der Apoptose-Induktion spielen, ist sehr wahrscheinlich (vgl. Abschnitt 1.5.5). Eine Beteiligung von ROS an der Auslösung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges ist bereits beschrieben worden (Zamzami *et al.*, 1995, Petit *et al.*, 1996).

3.14.3 Caspase 3-Aktivierung (Western Blot)

Um den Nachweis der Effektorcaspase 3 auf Proteinebene zu führen, wurden die Lysate der A549-Zellen auf Anwesenheit von Caspase 3 sowie der aktivierten Form (Cleaved-Caspase 3) untersucht. Dazu wurde ein Western Blot-basiertes Protokoll entwickelt, um die Proteinexpression zu überprüfen.

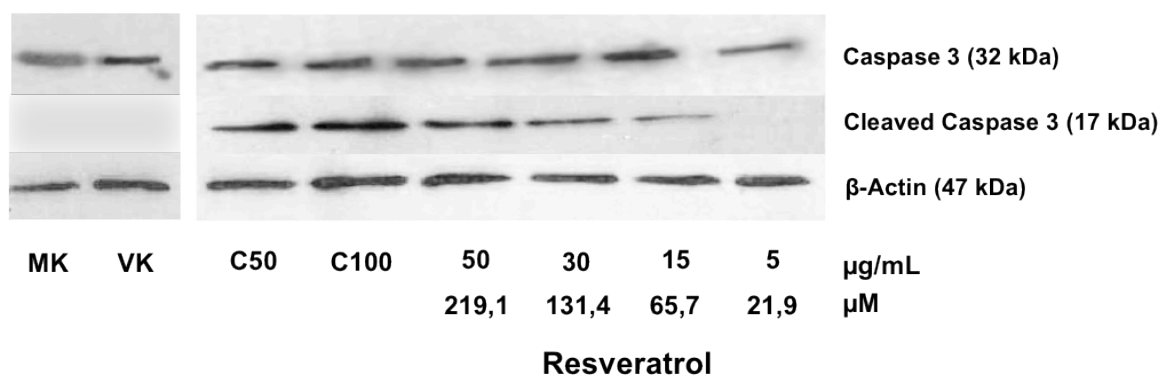


Abb. 3-43: Proteinexpression für Caspase 3 und Cleaved-Caspase 3

Dargestellt ist die Proteinexpression (100 µg Gesamtprotein) für die Caspase 3 und die aktive Caspase 3 in A549-Zellen nach Behandlung mit Resveratrol über 24 h. Die Abbildung zeigt die Mediumkontrolle (MK = A549-Zellen + R5) sowie die Vehikelkontrolle (VK = A549-Zellen + R5-Medium + 0,2% DMSO) im Vergleich zu den behandelten Zellen mit der Kontrollsubstanz Camptothecin (C50 + C100 = Camptothecin 50 µM und 100 µM) und der Testsubstanz Resveratrol (5-50 µg/mL $\hat{=}$ 21,9-219,1 µM). Beta-Actin diente als Ladekontrolle und wurde parallel gefärbt. Dargestellt ist ein Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten (n=3) mit ähnlichem Ergebnis.

Abb. 3-43 zeigt sowohl für Camptothecin (50 µM und 100 µM) als auch für Resveratrol (5-50 µg/mL $\hat{=}$ 21,9-219,1 µM) eine konzentrationsabhängige Aktivierung der aktiven Form der Caspase 3. Bei niedrigen Konzentrationen von Resveratrol (bis ca. 22 µM) gibt es keine Aktivierung der Caspase 3. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus dem kolorimetrischen Assay überein (vgl. Abschnitt 3.14.1 und 3.14.2). Die Caspase 3 wird in allen Lysatproben im nahezu gleichen Ausmaß detektiert. Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 für die Resveratrol-induzierte Apoptose wichtig ist.

Caspase 3-Aktivierung (densitometrische Auswertung)

Um die Proteinbanden auf dem X-ray-Film besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Farbdichten des Western Blots (vgl. Abschnitt 3.14.3) densitometrisch (über Image J 1.47m) ausgewertet. Grundlage der Methode bildet die Linearität zwischen Farbmenge und optischer Dichte. Dabei werden Tonwerte

bestimmt, d. h. die Farbmenge pro Flächeneinheit. In **Abb. 3-44 A** ist die Auswertung der Caspase 3-Bande relativ zur β -Actin-Bande abgebildet. **Abb. 3-44 B** zeigt die Proteinbande der Cleaved-Caspase 3 relativ zur Ladekontrolle β -Actin.

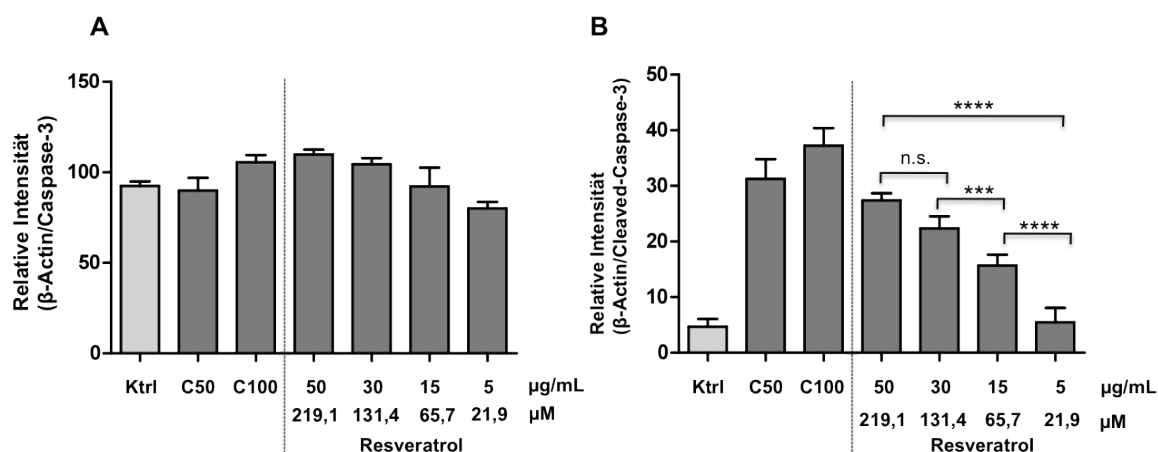


Abb. 3-44: Expressionsmuster der Caspase 3 und der Cleaved-Caspase 3

Dargestellt sind die Expressionsmuster der Caspase 3 und der Cleaved-Caspase 3 in A549-Zellen nach Behandlung mit Resveratrol. Die statistische Analyse wurde als Multiple-Vergleichsanalyse unter Verwendung der Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. N.s. bedeutet nicht signifikant. Als signifikant gelten ***: $p \leq 0,001$ und ****: $p \leq 0,0001$ (Anzahl der ausgewerteten Western Blots = 3).

A: Relative Intensität der Expression der Caspase 3 zur β -Actin-Expression. Die Darstellung ergibt sich aus der densitometrischen Analyse von drei aussagekräftigen Westernblots.

B: Relative Intensität der Cleaved-Caspase 3 zur β -Actin-Expression.

Die Expression der Cleaved-Caspase 3 nimmt mit steigender Konzentration von Resveratrol zu, während die Expressionslevel der Caspase 3 nur moderat steigen. Das Gleiche gilt für Camptothecin (C50 und C100 $\hat{=}$ Camptothecin 50 μ M und 100 μ M). Im Niedrig-Konzentrationsbereich von Resveratrol wurde keine Aktivierung der Caspase 3 detektiert. Eine mögliche Erklärung ist, dass Resveratrol hier apoptose-unabhängige Mechanismen zur Proliferationshemmung anschaltet, während in höheren Konzentrationen eine Aktivierung der Caspase 3 induziert wird (Luo *et al.*, 2013).

3.15 Resveratrol im intrinsischen Apoptose-Signalweg

Da Resveratrol eine vermehrte ROS-Produktion induziert, liegt die Vermutung nahe, dass dadurch der mitochondriale (= intrinsische) Apoptose-Signalweg aktiviert wird. Wie in Abschnitt 3.10.3 bzw. 3.11.2 gezeigt wurde, führte die

Behandlung der A549-Zellen mit Resveratrol mit steigender Konzentration zu einer verstärkten ROS-Bildung. Bei höheren Resveratrol-Konzentrationen ($\geq 65,7 \mu\text{M}$ Western-Blot; $\geq 131,4 \mu\text{M}$ kolorimetrischer Assay) konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Apoptose über die Aktivierung der Caspase 3 ausgelöst wird (vgl. Abschnitt 3.14.3). Eine Aktivierung der Caspase 8 wurde hingegen ausgeschlossen (vgl. Abschnitt 3.14.2). Dies führte zur Frage, ob der induzierte Zelltod durch die intrinsische Kaskade gesteuert wird.

Sollte dies der Fall sein, müsste eine Blockade der Atmungskette mit dem Komplex-I-Inhibitor Rotenon zu einer verminderten ROS-Produktion und damit auch zu einer reduzierten Apoptose-Aktivität führen. Rotenon blockiert wirksam die NADH-Dehydrogenase, eine zentrale ROS-Quelle. Die Inkubation mit Resveratrol nach Blockade der Atmungskette sollte Aufschluss geben, inwieweit die reaktiven Sauerstoffspezies aus dem Mitochondrium stammen, und inwiefern diese an der Apoptose-Induktion beteiligt sind.

Die nachfolgenden Experimente umfassten neben A549-Zellen auch die Makrophagen-Zelllinie J774-G8. Letztere wurde einbezogen, um die Bildung und den Einfluss mitochondrialer ROS-Spezies hinsichtlich einer antiinfektiven Abwehrreaktion besser einschätzen zu können. In den vorangegangenen Untersuchungen wurde herausgestellt, dass die Bildung reaktiver Stickstoff-Spezies wie NO durch die Resveratrol-Behandlung abgeschwächt bzw. blockiert wird (vgl. Abschnitt 3.6.3). Die mitochondriale Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies ist möglicherweise eine alternative Strategie der Makrophagen zur Pathogenabwehr. Um nachzuweisen, dass die ROS dem Mitochondrium entstammen und ihre Produktion durch die Behandlung mit Resveratrol gesteigert wird, wurde Rotenon als wirksamer Komplex-I-Inhibitor der Atmungskette eingesetzt und *vor* einer Resveratrol-Behandlung auf die Zellen gegeben.

In den folgenden Experimenten wurde zunächst die Toxizität von Rotenon auf A549-Zellen und J774-G8-Makrophagen untersucht, um auszuschließen, dass Rotenon selbst zu Vitalitätseinschränkungen und folglich zur Apoptose in den Zelllinien führt. Zudem wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur ROS-Bildung (via $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Färbung) und zur Apoptose-Induktion (via Annexin-V/PI-Färbung) durchgeführt.

3.15.1 Toxizität von Rotenon auf A549-Zellen und J774-G8-Makrophagen

Für den Ausschluss einer möglichen Toxizität von Rotenon auf A549-Zellen bzw. J774-G8-Makrophagen war eine Zellviabilitäts-Bestimmung nötig. Dafür wurde der MTT-Assay ausgewählt.

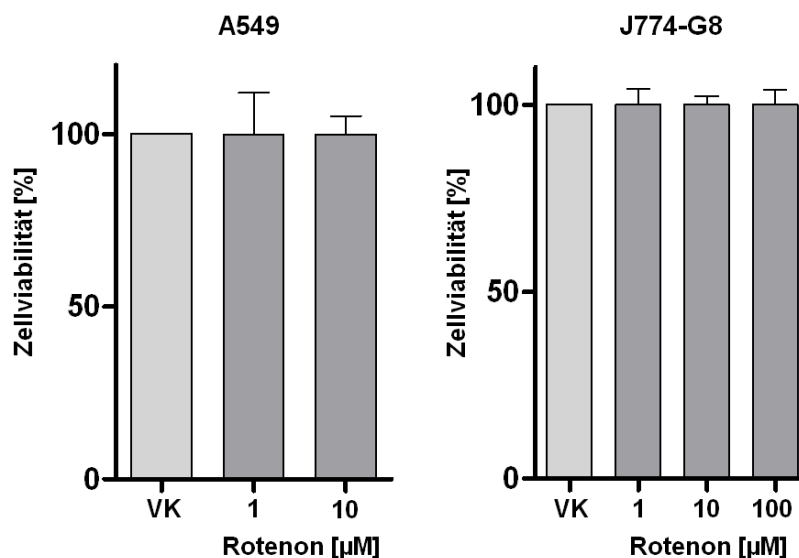


Abb. 3-45: Einfluss von Rotenon auf die Zellviabilität

Dargestellt sind die mit Rotenon über 30 min vorinkubierten A549-Zellen bzw. J774-G8-Makrophagen jeweils im Vergleich zur Vehikelkontrolle (VK = Zellen + R5 + 0,2% DMSO). Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mittels MTT-Test relativ zur Kontrolle und entspricht den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm SD$).

Die Vorinkubation mit den verschiedenen Rotenon-Konzentrationen zeigte, dass alle verwendeten Konzentrationen (1-100 µM) keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatten (**Abb. 3-45**). Der MTT-Test belegte eine normale mitochondriale Aktivität während der Inkubationszeit von 30 min ohne Verlust der Proliferationsaktivität. Folglich konnten die Inkubationsexperimente mit Resveratrol und den Kontrollsubstanzen durchgeführt werden.

3.15.2 Resveratrol-induzierte ROS-Bildung in Gegenwart von Rotenon (I)

A549-Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses von Resveratrol auf die ROS-Bildung nach Blockade der Atmungskette wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zum Nachweis der ROS-Bildung wurde die H_2 -DCF-DA-Färbung, zum Nachweis der Apoptose-Induktion die Annexin-V/PI-Färbung verwendet.

Für alle Präparate eines Färbungsansatzes wurde die gleiche Belichtungszeit verwendet, um die Fluoreszenzintensitäten vergleichen zu können.

Abb. 3-46 zeigt die ROS-Produktion in A549-Zellen. Für die Präparate ohne Vorinkubation mit Rotenon zeigte die H₂-DCF-DA-Färbung für die Positivkontrollen (Camptothecin, Staurosporin) und für Resveratrol die erwartete grüne Fluoreszenz. Damit wurde die Anwesenheit von ROS-Spezies bestätigt. Die Vehikel- und Mediumkontrollen zeigten hingegen keine ausgeprägten Fluoreszenz-Intensitäten. Für die Präparate mit Vorinkubation durch Rotenon ließ sich hingegen eine verminderte Intensität der ROS-Fluoreszenz feststellen. Demzufolge war die ROS-Produktion in den A549-Zellen blockiert und konnte durch Resveratrol nicht gesteigert werden.

Abb. 3-47 zeigt die Effekte der Apoptose-Induktion in A549-Zellen. Für die Präparate ohne Vorinkubation mit Rotenon zeigte die Annexin-V/PI-Färbung für die Positivkontrollen (Camptothecin, Staurosporin) und für Resveratrol die erwartete erhöhte Fluoreszenz-Intensität. Demzufolge fanden frühapoptotische Vorgänge durch die Behandlung mit Resveratrol statt. Die Vehikel- und Mediumkontrollen zeigten hingegen keine ausgeprägten Fluoreszenz-Intensitäten. Für die Präparate mit Vorinkubation durch Rotenon ließ sich dagegen eine verminderte Intensität der Fluoreszenz feststellen. Demzufolge war die Apoptose-Induktion in den A549-Zellen zurückgedrängt und konnte durch Resveratrol nicht mehr ausgelöst werden.

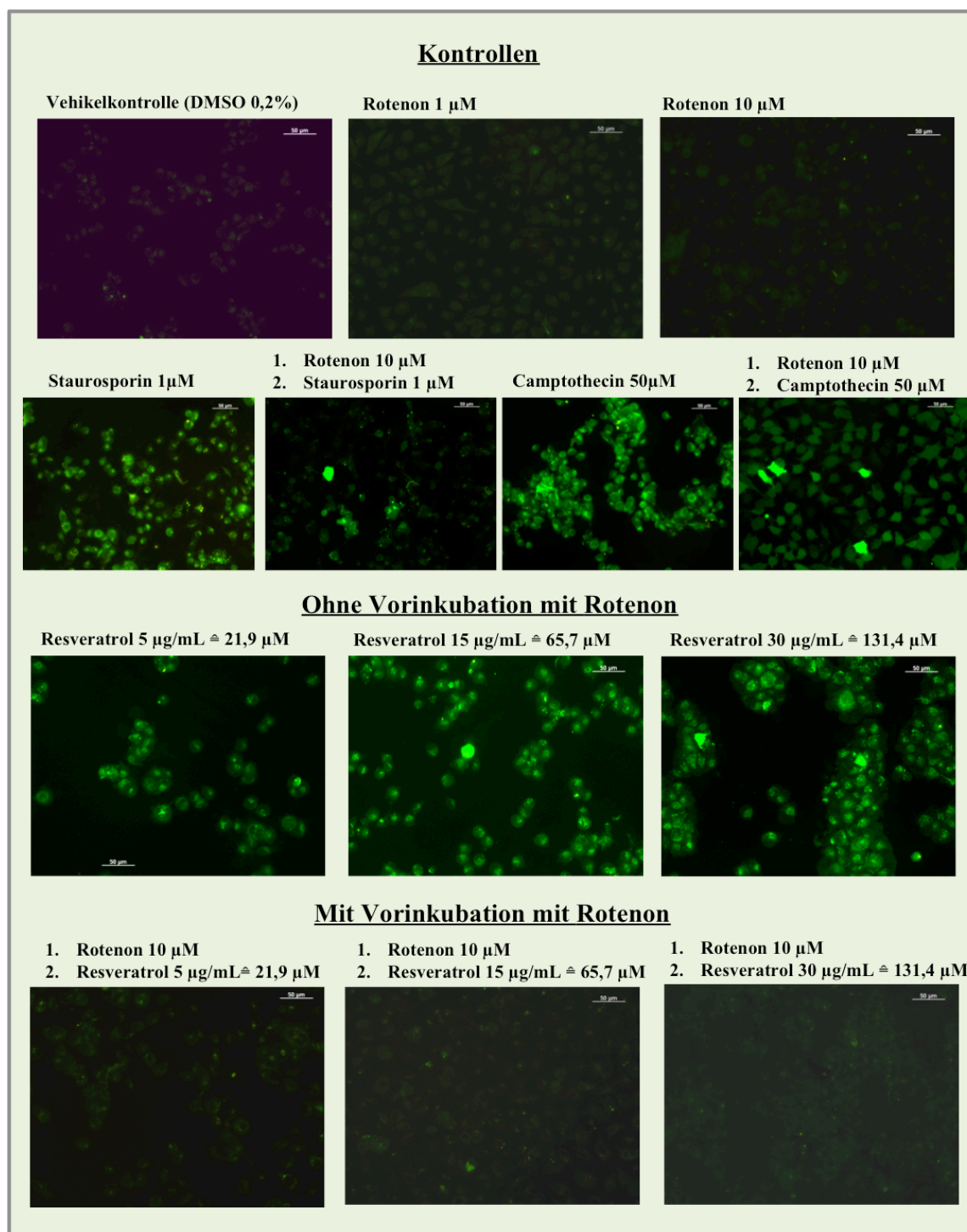


Abb. 3-46: Übersicht ROS-Produktion in A549-Zellen

Dargestellt ist die ROS-Produktion in A549-Zellen mit und ohne Vorinkubation mit Rotenon (30 min) nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol bzw. den Kontrollsubstanzen Camptothecin und Staurosporin ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Färbung). Die Dokumentation erfolgte mit einer Belichtungszeit von 600 ms für den GFP-Kanal (linear, Best Fit 16%). Abgebildet sind beispielhaft die Effekte einer Testreihe aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

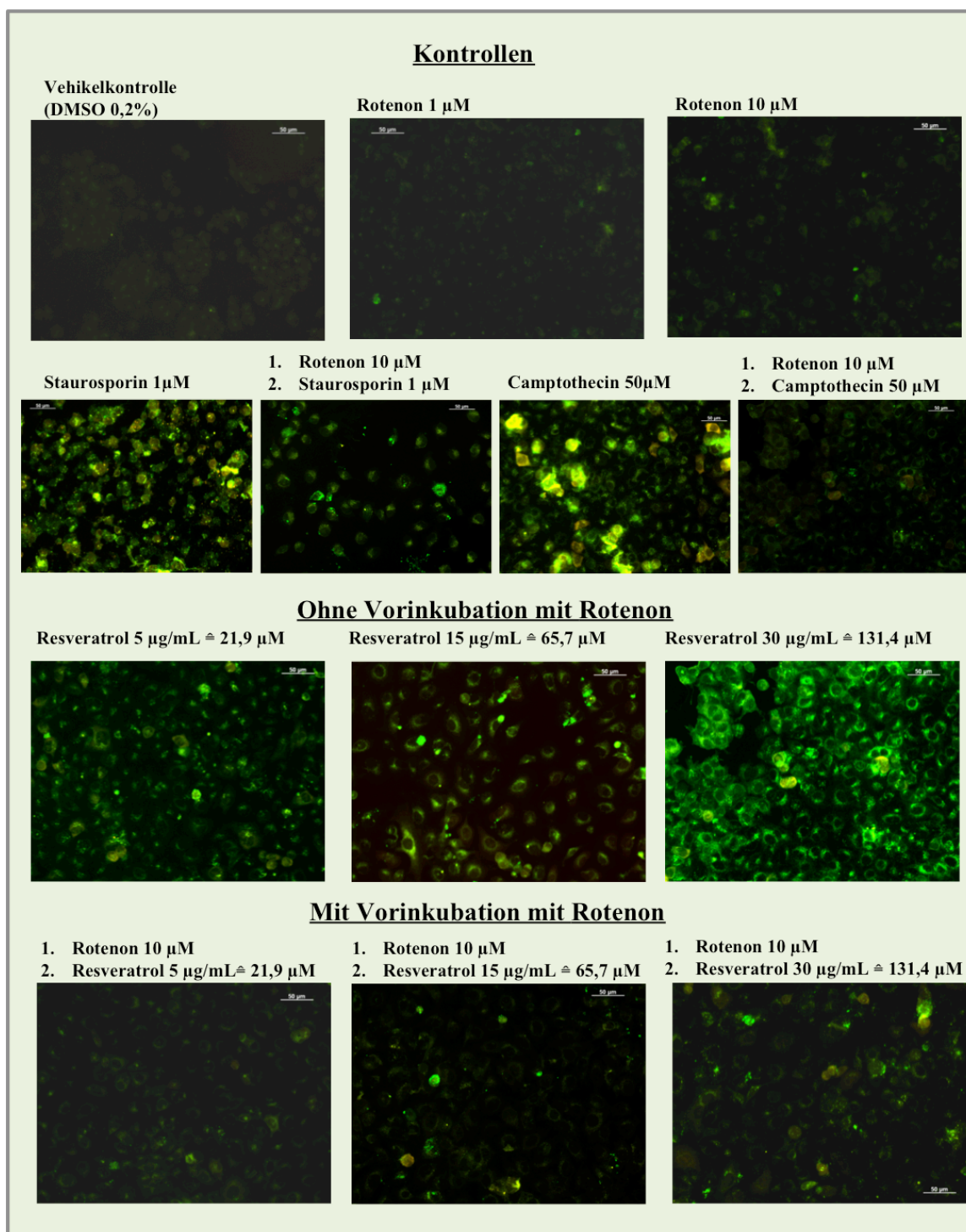


Abb. 3-47: Übersicht Apoptose-Induktion in A549-Zellen

Dargestellt ist die Apoptose-Induktion mit und ohne Vorinkubation mit Rotenon (30 min) nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol bzw. den Kontrollsubstanzen Camptothecin und Staurosporin (Annexin-V/PI-Färbung). Die Dokumentation erfolgte mit einer Belichtungszeit von 800 ms im DsRed-Kanal und mit 340 ms für den GFP-Kanal (linear, Min/Max 16%). Abgebildet sind beispielhaft die Effekte einer Testreihe aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Fazit

Die Untersuchungen zur ROS-vermittelten Apoptose-Induktion zeigen, dass Resveratrol einen Einfluss auf den mitochondrialen Signalweg in A549-Zellen besitzt. Die durch Resveratrol induzierte ROS-Produktion wurde durch die Vorinkubation mit Rotenon abgeschwächt, wie die verminderte Fluoreszenz in **Abb. 3-46** dokumentiert.

Dies bestätigt die Vermutung, dass eine Vorinkubation der Zellen mit Rotenon und anschließender Behandlung mit Resveratrol zu einer verminderten mitochondrialen ROS-Produktion führt (**Abb. 3-46**). Es ist demnach wahrscheinlich, dass die erhöhte ROS-Freisetzung hauptsächlich aus den Mitochondrien der Zellen stammt. Inwieweit darüber hinaus extramitochondriale ROS-Quellen bei der Apoptose-Induktion mit Resveratrol involviert sind, erfordert weitergehende Experimente.

Neben der verminderten mitochondrialen ROS-Bildung zeigt die reduzierte Fluoreszenz-Intensität der Annexin-V/PI-Färbung in den mit Rotenon vorinkubierten und anschließend mit Resveratrol behandelten Präparaten die verminderte Apoptose-Induktion. Es ist somit nachweisbar, dass in dem vorliegenden experimentellen Protokoll ein Zusammenhang zwischen der ROS-Bildung und der resultierenden Apoptose-Induktion besteht.

Welchen Stellenwert eine erhöhte ROS-Bildung besitzt, zeigen verschiedene aktuelle Forschungsergebnisse. ROS sorgt für die Induktion von Apoptose in Krebszellen (Wondrak 2009). Zudem können erhöhte ROS-Spiegel über die Auslösung oxidativer DNA-Schäden Apoptose induzieren und zur vorzeitigen Zellalterung sowie zu einer Proliferationshemmung führen (Wang *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2013).

3.15.3 Resveratrol-induzierte ROS-Bildung in Gegenwart von Rotenon (II)

J774-G8-Makrophagen

Welche Auswirkung die mitochondriale Blockade der Atmungskette in J774-G8-Makrophagen durch Rotenon hat, soll im Folgenden gezeigt werden. Der Versuchsaufbau gleicht dem der A549-Zellen (vgl. Abschnitt 3.15.2).

Die erhöhte ROS-Bildung und -Freisetzung ist neben der Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase als Abwehrstrategie von großer Bedeutung. Die moderaten antileishmaniellen Effekte von Resveratrol in den vorangegangenen

und gezeigten Untersuchungen lassen sich womöglich mit der induzierten ROS-Produktion erklären.

Bei der ROS-Bildung (**Abb. 3-48**) zeigten die Präparate mit Resveratrol (jedoch ohne Vorinkubation mit Rotenon) die erwartete Zunahme der Fluoreszenz-Intensität. Ähnlich wie bei den A549-Zellen nimmt die ROS-Bildung in den mit Rotenon-vorinkubierten und anschließend mit Resveratrol behandelten Präparaten ab. Das Gleiche gilt für die Behandlung mit PMA/Ionomycin. Amphotericin allein zeigt im Vergleich zu dem mit Rotenon vorinkubierten Präparat keine Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität.

Sowohl die vorinkubierten als auch die nicht vorinkubierten Makrophagen-Präparate zeigten eine Reduktion der Fluoreszenz-Intensität. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der A549-Zellen (vgl. **Abb. 3-46** und **3-47**).

Während die Behandlung der Makrophagen mit der Kombination aus PMA und Ionomycin eine Zunahme der grünen Fluoreszenz-Intensität bedingt, führt Amphotericin B allein zu keiner Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität (**Abb. 3-49**). Ebenso nimmt die Fluoreszenz-Intensität in den mit Rotenon vorinkubierten und mit Resveratrol behandelten Zellpopulationen im Vergleich zu den Präparaten ohne Vorinkubation ab.

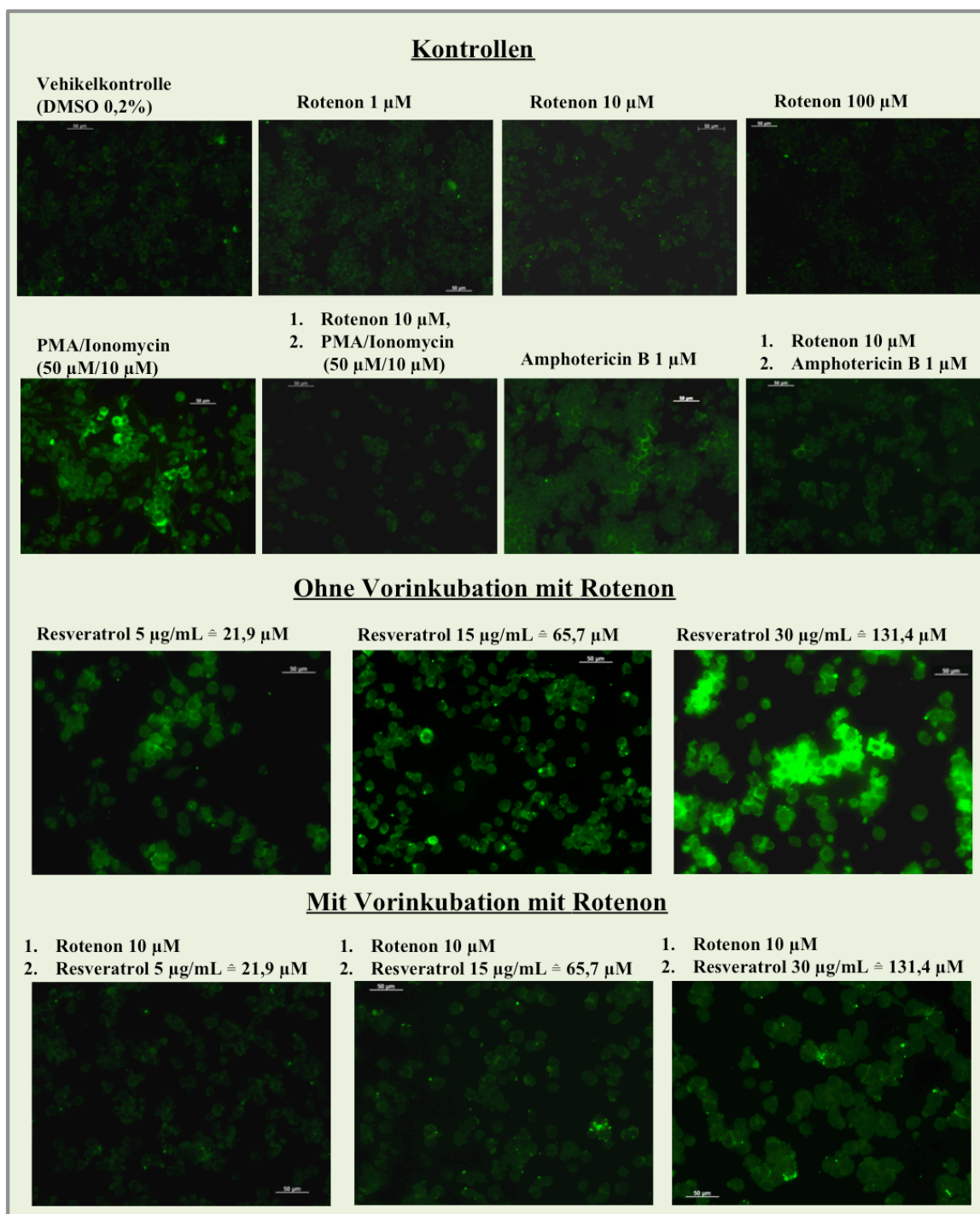


Abb. 3-48: Übersicht ROS-Produktion in J774-G8-Makrophagen

Dargestellt ist die ROS-Produktion in J774-G8-Makrophagen mit und ohne Vorinkubation mit Rotenon (30 min) nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol bzw. den Kontrollsubstanzen PMA/Ionomycin und Amphotericin B ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Färbung). Die Dokumentation erfolgte mit einer Belichtungszeit von 600 ms für den GFP-Kanal (linear, Best Fit 16%). Abgebildet sind beispielhaft die Effekte einer Testreihe aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

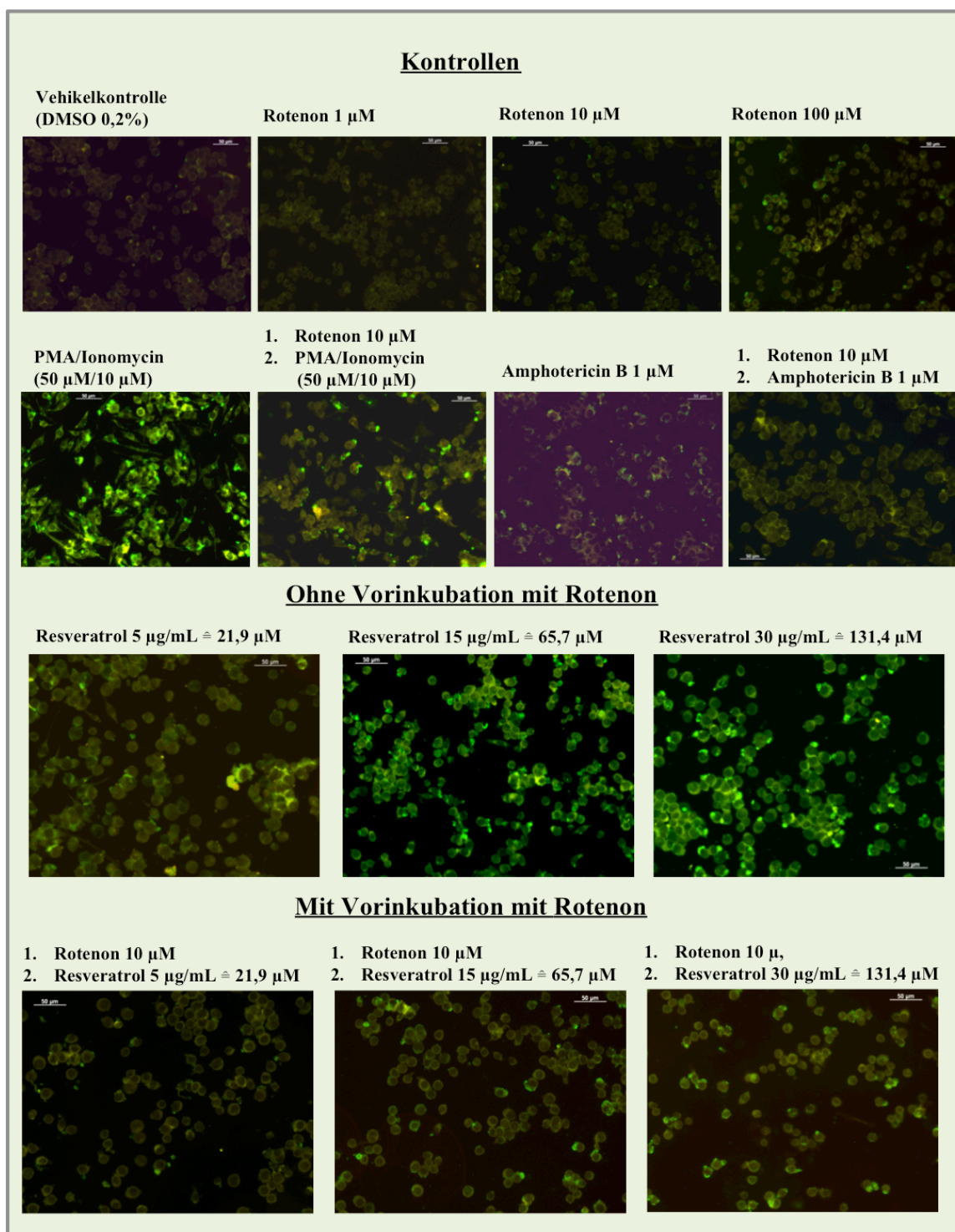


Abb. 3-49: Übersicht Apoptose-Induktion in J774-G8-Makrophagen

Dargestellt ist die Apoptose-Induktion in J774-G8-Zellen mit und ohne Vorinkubation mit Rotenon (30 min) nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol bzw. den Kontrollsubstanzen PMA/Ionomycin und Amphotericin B (Annexin-V/PI-Färbung). Die Dokumentation erfolgte mit einer Belichtungszeit von 800 ms im DsRed-Kanal und mit 340 ms für den GFP-Kanal (linear, Min/Max 16%). Abgebildet sind beispielhaft die Effekte einer Testreihe aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Fazit

PMA/Ionomycin und Resveratrol zeigten eine verstärkte Apoptose-Induktion und ROS-Produktion unter Monobehandlung. In Kombination mit Rotenon (Vorinkubation) zeigten sich für beide Untersuchungen (ROS- und Apoptose-Färbung) abgeschwächte Effekte. Für Amphotericin B ließ sich kein Effekt auf die Apoptose-Induktion und ROS-Produktion in J774-G8-Makrophagen nachweisen.

Die Untersuchungen belegen, dass Rotenon einen Einfluss auf die Resveratrol-induzierte ROS-Bildung in J774-G8-Makrophagen besitzt. Durch die Vorinkubation mit Rotenon wird die ROS-Bildung durch Resveratrol abgeschwächt. Ebenfalls wird die Apoptose-Induktion von Resveratrol durch die Vorinkubation mit Rotenon vermindert.

Die Verminderung der ROS-Bildung durch Rotenon deutet auf einen Einfluss von ROS auf die Wirtszell-Zytotoxizität hin. Wird die ROS-Bildung wie im vorliegenden Fall reduziert, resultiert eine verminderte Toxizität von ROS auf die Wirtszelle. Im Umkehrschluss steht eine erhöhte ROS-Bildung im Zusammenhang mit einer gesteigerten Apoptose-Induktion, vgl. **Abb. 3-49**).

Es ist festzuhalten, dass die durch Resveratrol vermittelten Effekte in den verschiedenen Zelltypen eine Konzentrationsabhängigkeit aufzeigen. Dieser Befund korreliert mit ähnlichen, aktuellen Untersuchungen (Luo *et al.*, 2013).

3.16 Exkurs: Caco-2-Zellen

3.16.1 NO-Modulation in Caco-2-Zellen durch Resveratrol

Im folgenden Versuch sollte die NO-Produktion in Caco-2-Zellen nach Stimulation durch Cytomix sowie nach Behandlung mit Resveratrol untersucht werden.

Caco-2-Zellen dienen als *in-vitro*-Testmodell für Permeabilitäts- und Resorptionsstudien auf Grund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu humanen Darmepithelzellen. Weiterhin dienen diese Zellen zur Erforschung anderer parasitärer Erkrankungen, z. B. der Giardiasis, ausgelöst durch den Parasiten *Giardia duodenalis*, der an Darmepithelzellen adhärirt. Im Folgenden werden die Effekte von Resveratrol auf die NO-Bildung in Caco-2-Zellen gezeigt. Die Experimente sollen weiteren Einblick in induzierte Effekte bei Gewebearten geben, die mit der oralen Einnahme von Resveratrol-haltigen Produkten verknüpft sind. Für die Resorption nach oraler Wirkstoffaufnahme und für die

Metabolisierung von Resveratrol spielt das Dünndarmepithel des Menschen eine zentrale Rolle.

Die Besonderheit von Caco-2-Zellen ist, dass diese Zelllinie erst nach drei Wochen einen voll ausdifferenzierten Monolayer bildet, welcher die wesentlichen Charakteristika der humanen Dünndarmmukosa aufweist (Chantret, 1988). Die für die Differenzierung typische Ausbildung der *Tight Junctions* ist in **Abb. 3-51** dargestellt (vgl. Abschnitt 3.17.2).

Im Folgenden wurde die NO-Produktion von Caco-2-Zellen nach Behandlung mit Resveratrol untersucht. Dazu wurden die Zellkulturüberstände nach Beendigung der Inkubation mittels Griess-Assay auf die Nitritkonzentration überprüft.

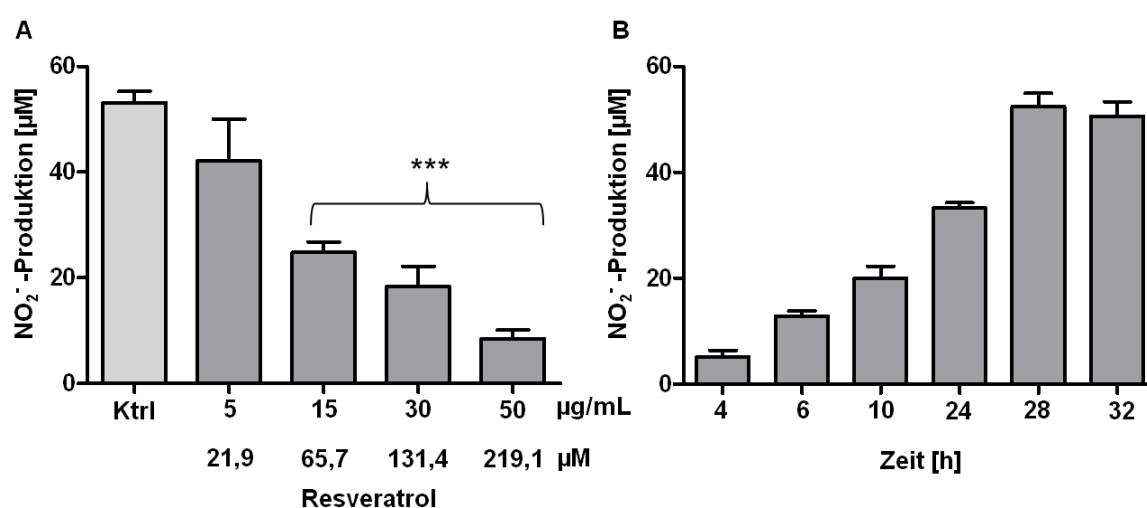


Abb. 3-50: Nitritproduktion in stimulierten Caco-2-Zellen

Dargestellt ist die NO-Produktion von Caco-2-Zellen nach Inkubation. Die Nitritkonzentration wurde mittels Griess-Assay bestimmt.

A: NO₂⁻-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Behandlung mit Resveratrol bei gleichzeitiger Stimulation mit einem Cytomix. Die Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen erfolgte relativ zur stimulierten Kontrolle nach 28 h und entspricht den Mittelwerten \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test. Als signifikant gilt: ***: $p \leq 0,001$.

B: Kinetik der NO₂⁻-Freisetzung in Caco-2-Zellen nach Stimulation mit dem Cytomix. Die Bestimmung der Nitrit-Konzentrationen erfolgte relativ zur stimulierten Kontrolle nach 28 h und entspricht den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten (n=3 \pm SD).

Die NO-Kinetik am Darmepithel zeigte ein Plateau nach 28 h Stimulation mit dem Cytomix (**Abb. 3-50 B**, vgl. Abschnitt 2.16.2). Für die Studien mit Resveratrol wurde die NO-Modulation nachfolgend stets zum Zeitpunkt 28 h untersucht. **Abb. 3-50 A** zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der NO-

Konzentration nach Inkubation mit Resveratrol. Die Ergebnisse spiegeln vermutlich den kombinatorischen Effekt von Resveratrol hinsichtlich der Fähigkeit der Downregulation der iNOS-Proteinexpression und den moderaten Scavenging-Aktivitäten wider. Eine weitere detaillierte Unterscheidung wurde nicht durchgeführt.

Fazit

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Resveratrol einen Effekt auf die NO-Bildung in verschiedenen Gewebearten bzw. Zellarten besitzt. Somit ist eine wichtige Abwehrstrategie in der zellulären Bekämpfung von parasitären Infektionen (z. B. Giardiasis) beeinträchtigt.

3.16.2 Nachweis der Differenzierung der Caco-2-Zellen

Um zu zeigen, dass die Caco-2-Zellen entsprechend ihrer Morphologie ausdifferenziert waren, wurde im nachfolgenden Versuch die ZO-1-Färbung durchgeführt. Caco-2-Zellen lassen sich zwar in Suspension vermehren und in Platten kultivieren, reproduzierbare Ergebnisse werden jedoch nur nach vollständiger Ausdifferenzierung der Darmepithelzellen erhalten.

Abb. 3-51 A zeigt den ausdifferenzierten Monolayer der verwendeten Caco-2-Zellen. Das Übersichtsbild in **Abb. 3-51 B** entstammt einer noch undifferenzierten Zellpopulation kurz nach der Einsaat in die 12-Well-Platten (vgl. Abschnitt 2.4.5). Als Gegenfärbung diente die Kernfärbung mit Bisbenzimid. Die enterozytische Differenzierung geht mit der Bildung eines apikalen Bürstensaums und der Produktion von Bürstensaum-assoziierten Hydrolasen einher. Diese sind sowohl für das Dünndarm- als auch für das Dickdarmepithel spezifisch. Die Ausbildung der *Tight Junctions* ist neben der Produktion weiterer spezifischer Mikrovilli-Proteine (z. B. dem Ca^{2+} -abhängigen Actin-bindenden Protein Villin) charakteristisch für die Differenzierung von Caco-2-Zellen (Chantret *et al.*, 1988).

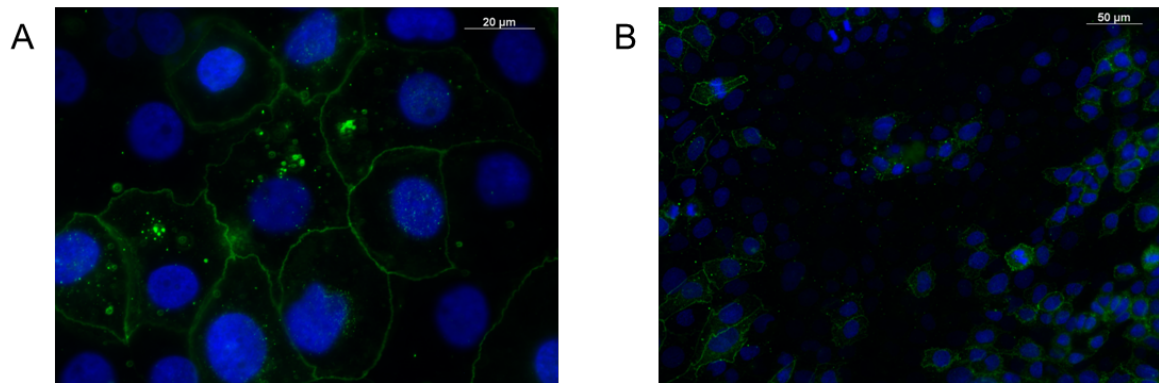


Abb. 3-51: Nachweis der Differenzierung von Caco-2-Zellen

Dargestellt ist die Differenzierung von Caco-Zellen mittels ZO-1-Färbung.

A: Konfluente, über 3 Wochen ausdifferenzierte Caco-2-Zellen im Monolayer mit typisch morphologischer Polarisierung und Ausbildung von tight junctions (grün). Die Kerne sind mit Bisbenzimid gegengefärbt (blau).

B: Nicht vollständig ausdifferenzierte, nicht konfluente Caco-2-Zellen (ZO-1-Färbung: grün, Bisbenzimid-Kernfärbung: blau).

4. Diskussion

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des antileishmaniellen Potentials von Resveratrol. Die Leishmaniose ist laut WHO-Bericht (2010) immer noch eine der weltweit am meisten vernachlässigten Infektionskrankheiten. Sie betrifft weitgehend die Ärmsten der Armen, vor allem in den Entwicklungsländern. Aktuell sind 350 Millionen Menschen von einer Infektion mit Leishmanien bedroht. Jährlich treten etwa zwei Millionen neue Fälle auf. In den vergangenen zehn Jahren sind einige beachtliche Fortschritte bei der Behandlung, der Diagnose und der Prävention von Leishmaniosen erzielt worden (Kedzierski *et al.*, 2009). Zudem konnten die Kosten für Therapien und Medikamente erheblich gesenkt werden. Dennoch geben weltweit steigende Mortalität- und Morbiditätszahlen Anlass zur Sorge (WHO, 2010). Eine ebenso beunruhigende Entwicklung ist die Bildung von Arzneimittelresistenzen bei *Leishmania*-Arten. Dementsprechend groß ist das Bedürfnis nach sicheren und wirksamen Medikamenten, um auch in Zukunft nachhaltige Therapieoptionen zu besitzen. Aus diesem Grund ist die Erschließung neuer Zielstrukturen und Substanzen entscheidend, die insbesondere gegenüber der klinisch relevanten amastigoten Form des Parasiten wirksam sind. Ob Resveratrol ein potentieller Kandidat auf diesem Gebiet ist, wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Beurteilung von Resveratrol auf seine Eignung als antileishmanielle Substanz erfolgte dabei mit einem breiten Methodenspektrum (u. a. MTT-Assay, durchflusszytometrische Analyse, morphologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen). Dabei wurde untersucht, ob Resveratrol eine direkte Wirkung auf den intrazellulären Parasiten besitzt oder ob es einen indirekten Effekt auf Makrophagen aufweist – über eine Immunantwort. Ebenfalls bedeutsam war die Frage nach zytotoxischen Effekten gegenüber Makrophagen als Wirtszellen, um Resveratrol hinsichtlich seiner therapeutischen Eignung beurteilen zu können.

Der Ansatz, Resveratrol auf seine Aktivität gegenüber Parasiten der Gattung *Leishmania* zu untersuchen, fußte auf zwei vorangegangenen Arbeiten aus den Jahren 2007 und 2008. Zum einen gelang unserem Arbeitskreis die Etablierung eines modernen FACS-basierten *in vitro*-Testsystems für die parallele Messung von antileishmaniellen und zytotoxischen Aktivitäten von Naturstoffen (Kram, 2008). Zum anderen war eine Publikation der Arbeitsgruppe um Kedzierski

(Kedzierski *et al.*, 2007) von ausschlaggebendem Interesse. Die Autoren folgten dem Forschungsansatz, leishmanizide Substanzen dergestalt aufzuspüren, indem bereits bekannte Wirkstoffe mit gutem Sicherheitsprofil und oraler Bioverfügbarkeit hinsichtlich ihres antileishmaniellen Potentials gescreent werden. Dank bereits beschriebener Aktivitäten von Resveratrol gegen eine Reihe von Hautpathogenen wie Dermatophyten (Chan, 2002), parasitischen Pilzen (Leiro *et al.*, 2004) und *Herpes simplex*-Viren (Docherty *et al.*, 1999) wurden Resveratrol und 15 strukturelle Analoga in diese Untersuchungen einbezogen. Denn *Leishmania*-Parasiten können sich je nach Art im Hautgewebe ansiedeln und dort verschiedenartige Läsionen wie Bläschen oder Geschwüre hervorrufen.

Kedzierski *et al.* (2007) dokumentierten, dass sowohl Resveratrol als auch die meisten seiner hydroxylierten Struktur-Analoga deutlich zur Reduktion der Vitalität der untersuchten *L. major*-Parasiten beitrugen. Die Publikation beschreibt für Resveratrol eine antileishmanielle Aktivität sowohl gegenüber promastigoten als auch amastigoten Parasiten ohne Beeinträchtigung der Wirtszellviabilität. Der IC₅₀-Wert für die Reduktion der Parasitenviabilität beträgt 45 µg/mL für die begeißelte Form. Die Viabilität von intrazellulären Amastigoten nimmt nach Aussage der Autoren bereits ab einer Konzentration von 20 µg/mL signifikant ab, während dieselbe Konzentration nur moderate Effekte auf die Promastigoten-Viabilität zeigt. In Konzentrationen von 40 µg/mL und 45 µg/mL wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion der intrazellulären Parasiten-Viabilität um ca. 50% beobachtet. Nicht-infizierte Makrophagen wurden parallel mit ≤ 45 µg/mL Resveratrol inkubiert, ohne dass Beeinträchtigungen der Viabilität bzw. Auffälligkeiten in der Morphologie für die Wirtszellen aufgezeigt wurden. Die mikroskopischen Aufnahmen dazu wurden in der Publikation allerdings nicht abgebildet. Auffallend ist zudem, dass bei den Untersuchungen zur Promastigoten-Viabilität einige der untersuchten Resveratrol-Derivate einen biphasischen Effekt aufzeigten. In niedrigen Konzentrationen (≤ 10 µg/mL) war die Parasiten-Viabilität erhöht, in höheren Konzentrationen war eine signifikante Reduktion der Parasitenzahl zu beobachten. Dieser konzentrationsabhängige Effekt wurde in der Arbeit von Kedzierski *et al.* (2007) jedoch nicht diskutiert.

Die Schlussfolgerungen der Autoren wurden letztlich nur aus den Ergebnissen des CellTiter Blue Cell Viability Assays (ähnlich dem MTT-Assays) und den mikroskopischen Untersuchungen abgeleitet. Die infizierten bzw. nicht-infizierten Makrophagen und die promastigoten Parasiten wurden mit den Testsubstanzen inkubiert, mithilfe der Giemsa-Färbung angefärbt und unter dem Mikroskop

ausgezählt. Bei der Untersuchung wurden in einer Doppelbestimmung je 5 Areale à 100 Zellen auf den Deckgläschen ausgezählt und die erhaltenen Werte anschließend graphisch dargestellt (Methode nach Kedzierski *et al.*, 2004). Die Publikation verzichtet jedoch auf die Abbildung mikroskopischer Dokumentation und enthält dem Leser zudem die Grundlage der Auswertung und der zugrundeliegenden Interpretation vor.

4.1 Resveratrol: Korrelation von Aktivität und zytotoxischem Potential

Um die Zytotoxizität von Resveratrol bzw. die Zellviabilität nach Resveratrol-Behandlung zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der etablierte MTT-Assay (Mosman, 1983) verwendet. Zudem wurde die Morphologie von infizierten bzw. nicht-infizierten Makrophagen mittels Diff-Quik®-Schnellfärbung beurteilt. Der Einsatz der modernen Durchflusszytometrie garantierte schließlich eine optimale und zuverlässige Methode zur Detektion von intrazellulären und promastigoten Parasiten.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kedzierski *et al.* (2007) konnten antileishmanielle Effekte (vgl. Abschnitt 3.3.2) von Resveratrol beobachtet werden. Die Viabilitätsmessung der promastigoten Parasiten ergab bei einer Konzentration von 45 µg/mL (197,2 µM) eine signifikante Reduktion der Parasitenzahl um 97% (vgl. Abschnitt 3.3.2). Auffällig waren die lediglich moderaten Abtötungsraten (≤ 10%) bei Probenkonzentrationen ≤ 35 µg/mL (135,3 µM). Dieser Befund kann ein Hinweis auf eine begrenzte Toleranz von *L. major*-GFP gegenüber Resveratrol sein und wäre entscheidend bei der Ermittlung einer geeigneten Wirkstoffdosis gegen die extrazelluläre Form. Die parallel angefertigte PI-Färbung zur Unterscheidung lebender von toten Parasiten bestätigte das leishmanizide Wirkprofil von Resveratrol (vgl. **Abb. 3-9**).

Neben den promastigoten Leishmanien ist das intrazelluläre amastigote Stadium für das Verständnis und die Behandlung der Leishmaniose von großer Bedeutung. Daher wurde in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf die Aktivität von Resveratrol gegenüber infizierten Makrophagen gelegt. Diese klinisch-relevante intrazelluläre Form wurde in zwei verschiedenen Wirtszell-Infektionsmodellen (BMMΦ und J774-G8) untersucht. In beiden Testmodellen korrelierte die antileishmanielle Aktivität stark mit einer zytotoxischen Beeinträchtigung der Wirtszellen. Für die primären Mausmakrophagen BMMΦ ergab sich ein IC₅₀-Wert von 9,9 µg/mL (≅ 43,6 µM) für die antileishmanielle Aktivität. Parallel zur

antileishmaniellen Wirkung stieg jedoch die Wirtszelltoxizität an, was aus dem MTT-Assay ($IC_{50} = 16,35 \mu\text{g}/\text{mL} \cong 71,6 \mu\text{M}$) und der FACS-Messung ersichtlich war. Für die Beurteilung der Eignung von Resveratrol als antileishmanieller Agens eignet sich eine direkte Gegenüberstellung von antileishmanieller Aktivität zur Wirtszelltoxizität mithilfe des empirisch ermittelten Selektivitätsindex (SI). Der SI ist als Quotient der zytotoxischen und antileishmaniellen Aktivität definiert. Für die BMM Φ ergab sich demnach ein SI von 1,6. Folglich liegen erwünschter (antileishmanieller) und unerwünschter (zytotoxischer) Effekt sehr nah beieinander.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden in den Untersuchungen von Kedzierski *et al.* (2007) keine primären Mausmakrophagen eingesetzt, sondern die Makrophagenzelllinie J774. Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden folglich um die J774-G8-Makrophagen erweitert. Möglicherweise stellen Unterschiede in der Anfälligkeit von Wirtszellen gegenüber Resveratrol einen wichtigen Parameter dar, um einen Anhaltspunkt für die beobachtete Diskrepanz zwischen den verschiedenen Zelltypen und der Toxizität bzw. Toleranz zu geben. Daher wurden die Untersuchungen mithilfe des gleichen Methodenspektrums auf die J774-G8-Makrophagen ausgeweitet. Die Ergebnisse hinsichtlich der zytotoxischen ($IC_{50} = 24,5 \mu\text{g}/\text{mL} \cong 107,7 \mu\text{M}$ bzw. MTT-Assay: $29 \mu\text{g}/\text{mL} \cong 127,05 \mu\text{M}$) und leishmaniziden ($IC_{50} = 24,8 \mu\text{g}/\text{mL} \cong 108,6 \mu\text{M}$) Wirkung von Resveratrol auf nicht-infizierte und infizierte Wirtszellen waren denen der BMM Φ sehr ähnlich. Zwar waren die Effekte erst bei höheren Konzentrationen zu beobachten, zytotoxische und antileishmanielle Eigenschaften lagen jedoch noch enger beieinander, was in einem SI von 1,17 deutlich wird.

Der Befund, dass Resveratrol einen moderaten antileishmaniellen Effekt aufweist, kann in Übereinstimmung mit Kedzierski *et al.* (2007) bestätigt werden. Die Autoren beschreiben zudem, dass die Konzentration von $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ folgende Ambiguität aufweist: Auf der einen Seite werde die Amastigoten-Viabilität signifikant reduziert, auf der anderen jedoch nur ein moderater Effekt auf die Promastigoten-Viabilität beobachtet. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Offen blieb in der zitierten Arbeit die Frage nach dem Wirkmechanismus, welcher nach den beobachteten toxischen Effekten von Resveratrol (vgl. Abschnitt 3.4 und 3.5) auf die Wirtszellen zu einem völlig neuen Bild führte.

Bei den BMM Φ liegt der IC₅₀-Wert der antileishmaniellen Aktivität bei 9,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\cong 43,6 μM) für die Reduktion der intrazellulären Parasiten-Viabilität. Im Gegensatz dazu steht die deutlich höhere Konzentration von mindestens 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\cong 175,2 μM) zur Senkung der Promastigoten-Viabilität. Dies erscheint jedoch nur bedingt widersprüchlich: Kiderlen *et al.* (2001) beschreiben für eine Auswahl von 28 Polyphenolen, darunter Gallussäure und dessen Derivate sowie hydrolysierbare Gerbstoffe ebenfalls eine gute antileishmanielle Aktivität gegenüber Amastigoten, jedoch nicht gegenüber promastigoten *Leishmania donovani*-Parasiten. Resveratrol zeigt in den vorliegenden Untersuchungen ein ähnlich ambiges Verhalten gegen beide Formen des Parasiten (*L. major*-GFP).

Eine mögliche Erklärung für diese Doppeldeutigkeit liefern die zellulären und biochemischen Bedingungen in den Makrophagen bzw. die erforderliche morphologische Veränderung der Parasiten beim Infektionsprozess. Werden promastigote Parasiten von Makrophagen phagozytiert, so werden sie zunächst in die Phagosomen aufgenommen. Zusammen mit sekundären Lysosomen fusionieren diese zusammen zu Phagolysosomen. Sie bilden gemeinsam die parasitäre Vakuole aus (Handman und Bullen, 2002). Diese neue Umgebung birgt für die Parasiten jedoch Gefahren: Es herrscht ein niedriger pH-Wert (ca. 4,5-5) und das Innere der Vakuole ist reich an mikrobiziden Peptiden und hydrolytischen Enzymen (Roberts *et al.*, 2000). Unter diesem Einfluss transformieren sich die promastigoten Parasiten zu obligat intrazellulären Amastigoten. Im Zuge dieser morphologischen Veränderung wird auch die Lipophosphoglykan-Expression gehemmt und gleichzeitig der Anteil von Glykoinositolphospholipiden auf der Oberfläche des Parasiten erhöht (Naderer und Mc Conville, 2008). Einerseits kann dieser strukturelle Umbau eine Erklärung für die unterschiedliche Wirksamkeit von Resveratrol auf die beiden Formen des Parasiten sein. Die veränderte Zellmembranzusammensetzung der amastigoten Parasiten könnte anfälliger für Resveratrol oder andere Wirkstoffe sein als die robustere begeißelte Form. Diese unterliegt z. B. starken Temperaturschwankungen beim Wirtswechsel von der Sandmücke in den Menschen. Andererseits könnte die Behandlung mit Resveratrol Makrophagen-spezifische Abwehrmechanismen aktivieren, wie die Produktion von NO oder ROS. Diese stark zytotoxischen Radikale würden dann zusätzlich zum immanenten zytotoxischen Potential von Resveratrol die intrazellulären Parasiten schädigen und schneller abtöten. Der interessante Aspekt, dass geringe Dosen von Resveratrol gegen amastigote Parasiten besser wirksam sind als gegen

promastigote Erreger, könnte also in der Regulation der Immunantwort begründet liegen. Niedrige Dosen von Resveratrol verschieben das Gleichgewicht der Th1/Th2-Immunantwort auf die Seite der Th1-Abwehr in Mäusen (Feng *et al.*, 2002). Zudem wird die Frequenz von IFN- γ produzierenden CD4⁺-T-Zellen *in vitro* erhöht (Falchetti *et al.*, 2001). Die Th1-Immunantwort mit CD4⁺-T-Zellen und den damit verbundenen Zytokinen, wie IFN- γ , ist essentiell bei der Abwehr im Infektionsgeschehen mit *Leishmania*-Parasiten und wird als Schlüsselfaktor in der Immuntherapie sowie bei der Entwicklung von Impfstoffen angesehen (Sacks und Noben-Trauth, 2002). Es wäre daher denkbar, dass Resveratrol einen immunmodulierenden Effekt besitzt, indem es die Th1-Immunantwort fördert. Allerdings wird dieser Einfluss noch kontrovers diskutiert. Denn die Effekte *in vitro* und *in vivo* unterscheiden sich zum Teil erheblich: Auf der eine Seite belegen *in vitro*-Studien, dass Resveratrol einen hemmenden Effekt auf die Induktion zellvermittelter zytotoxischer Abwehrstrategien besitzt, zum Beispiel auf das durch T-Zellen sezernierte IFN- γ (Gao *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite scheint es *in vivo* keine Hinweise auf einen derartigen Einfluss von Resveratrol auf T-Zellen oder gar direkt auf Makrophagen zu geben (Gao *et al.*, 2003).

Die von Kedzierski *et al.* (2007) beschriebene gute Verträglichkeit von Resveratrol ist hingegen gänzlich kritisch zu bewerten. Resveratrol wird von den Autoren als gutverträglich und nicht toxisch dargestellt: Das Phytostilben zeige über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich ($\leq 45 \mu\text{g/mL}$) eine gute Verträglichkeit und keine unerwünschten Effekte auf Viabilität oder Morphologie der nicht-infizierten Makrophagen. Dies stehe den Autoren zufolge im Einklang mit ähnlichen Publikationen, in denen die Gabe von 1,0 g Resveratrol/kg Körpergewicht pro Tag über einen Zeitraum von 28 Tagen in Ratten keine unerwünschten Effekte hervorruft (Juan *et al.*, 2002), obgleich höhere Dosen (ab 1,0 g-3,0 g/kg Körpergewicht pro Tag) mit einer Nierentoxizität verbunden sind (Crowell *et al.*, 2004). Zu berücksichtigen ist zweifelsohne, dass in dem *in vitro*-Modell die Komplexität eines Organismus nicht berücksichtigt wird.

Allerdings werden mögliche zytotoxische Effekte von Resveratrol auf die von Kedzierski *et al.* (2007) verwendeten Wirtszellen (J774-Makrophagen) nur unzureichend bedacht. Einzig mikroskopische Untersuchungen wurden durchgeführt, die Ergebnisse jedoch nicht bildlich dokumentiert. Dies macht eine Überprüfung der Aussagen zum fehlenden zytotoxischen Potential über den gemessenen Konzentrationsbereich unmöglich.

Demgegenüber sind die Beobachtungen zur *in vitro*-Toxizität von Resveratrol in der vorliegenden Arbeit konträr. Die hier durchgeführten Studien zur Morphologie, die durchflusszytometrischen Analysen sowie die Viabilitätstestungen (MTT-Assay) können die Aussagen von Kedzierski *et al.* (2007) nicht bestätigen. Schon ab deutlich geringeren Konzentrationen als 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\cong 87,6 μM) finden sich in beiden untersuchten *in vitro*-Wirtszellmodellen (BMM Φ J774-G8) deutliche Anzeichen für zytotoxische Wirkungen von Resveratrol gegenüber Makrophagen. Der MTT-Test offenbart für BMM Φ einen IC_{50} -Wert von 16,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\cong 71,6 μM), für J774-G8 Zellen einen Wert von 29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\cong 127,05 μM) (vgl. **Abb. 3-12** und **3-15**). In den FACS-Messungen (vgl. Abschnitt 3.4.2 und 3.5.2) zeigte sich ebenfalls eine deutliche Viabilitätsbeeinträchtigung ab Konzentrationen \geq 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\cong 87,6 μM) und in den histologischen Untersuchungen lassen sich morphologische Auffälligkeiten wie Karyopyknose, der Abbau von Zytoskelett, Membran-„Blebbing“ und Vakuolisierung schon ab 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\cong 43,8 μM) beobachten (vgl. **Abb. 3-14** und **3-17**). Diese Resultate verdeutlichen die Korrelation zwischen moderat antileishmanieller Aktivität und zytotoxischer Wirkung von Resveratrol auf die Wirtszellen (Lucas und Kolodziej, 2013).

Eine zellspezifische Verträglichkeit bzw. Anfälligkeit für die Behandlung mit Resveratrol als auch für die Infektion selbst lässt sich dabei nicht bestreiten. Im Unterschied zu den aus Knochenmark differenzierten Makrophagen (BMM Φ) ist die J774-G8-Makrophagenzelllinie aus dem Tumor einer Balb/c-Maus isoliert worden. Die beobachteten ausgeprägten toxischen Effekte von Resveratrol auf die Makrophagen-ähnliche Krebszelllinie könnten aber als weiterer Beleg für das postulierte chemopräventive bzw. antikanzerogene Potential des Stilbenderivates angesehen werden.

Fazit

Die *in vitro*-Testungen zeigen deutlich, dass für einen antileishmaniellen Effekt von Resveratrol hohe Konzentrationen nötig sind. Hohe Konzentrationen beinhalten jedoch gleichzeitig ein zytotoxisches Potential, was Resveratrol als antileishmaniellen Wirkstoff *de facto* ausschließt. Zudem gibt die aufgezeigte Zytotoxizität Anlass für neuerliche Untersuchungen zur Sicherheit von Resveratrol. Denn nicht nur im Kontext einer Leishmanien-Infektion wird Resveratrol als grundsätzlich gut verträglich diskutiert (Kedzierski *et al.*, 2007). Juan *et al.* (2002) beschreiben, dass die tägliche Verabreichung hoher oraler Dosen

von Resveratrol bei Ratten über einen Zeitraum von 28 Tagen nicht schädlich ist. Die Bioverfügbarkeitsstudie von Nunes *et al.* (2009) (vgl. **Tab. 4-1**) bescheinigt Resveratrol (bei einer Einnahmedauer von 4 Tagen) nur unspezifische Effekte und keine Auffälligkeiten im Elektrokardiogramm der Probanden bzw. bei klinischen Labor-Sicherheitstests. Und Patel *et al.* (2010) attestieren Resveratrol über einen Einnahmezeitraum von 8 Tagen bei Darmkrebs-Patienten keine unerwünschten Effekte.

Dies erscheint etwas widersprüchlich, da für Resveratrol ausdrücklich ein chemotherapeutisches bzw. antikanzerogenes Potential beschrieben wird (Jang *et al.*, 1999, Gusman *et al.*, 2001, Pervaiz, 2004). Demnach greift Resveratrol in den Zellzyklus ein bzw. löst Apoptose aus. Um jedoch einen wirksamen und gleichzeitig verträglichen Wirkstoff in der Chemotherapie zu etablieren, sollte der negative Effekt auf gesunde Körper- und Keimzellen auf ein Minimum beschränkt sein. Dies ist nach den vorliegenden Ergebnissen zumindest fragwürdig. Zytotoxizität und Verträglichkeit müssen daher im Zusammenspiel genauer untersucht und lückenlos dokumentiert werden, insbesondere in höheren Konzentrationsbereichen und in Langzeitstudien. Zudem erscheint die Differenzierung zwischen einem chemotherapeutischen und chemopräventiven Potential von Resveratrol in diesem Zusammenhang wünschenswert.

4.2 Sicherheit von Resveratrol

Für den klinischen Einsatz eines Wirkstoffes und einer angestrebten Zulassung als Fertigarzneimittel ist - unabhängig von der Indikation - der Nachweis der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit zu erbringen. Resveratrol hat diese gesetzliche Schwelle bisher nicht überschritten. Gegenwärtig existieren Resveratrol-Spezialitäten lediglich als Nahrungsergänzungsmittel (vgl. Abschnitt 1.2) mit stark differierenden Angaben zu Gehalt und Herkunft des enthaltenen Resveratrols.

Zudem liegen für Resveratrol noch keine wissenschaftlich fundierten Einnahmeempfehlungen vor. Eine aktuelle Studie zeigt, dass eine Resveratrol-Supplementierung von 150 mg/Tag über 30 Tage bei adipösen Patienten metabolische Veränderungen induziert und die Wirkung einer Kalorienreduktion imitieren kann (Timmers *et al.*, 2011). In der Literatur sind bisher keine toxischen oder schädlichen Auswirkungen durch die Einnahme von Resveratrol für den Menschen bekannt. Allerdings gibt es nur wenige kontrollierte klinische Studien zu diesem Sachverhalt. Eine Studie von Boocock *et al.* (2007) mit 10 gesunden

Probanden, die die Sicherheit von oral verabreichtem Resveratrol beurteilen soll, sieht in der Gabe einer Einzeldosis von bis zu 5 Gramm (Testpersonen bekamen zunächst 1 g, dann 2,5 g und schließlich 5 g Resveratrol; die Steigerung auf die nächst höhere Dosis war nur bei Abwesenheit toxischer Effekte angezeigt und mit einer 14-tägigen Wartefrist verbunden) keine Gefahr ernsthafter Nebenwirkungen. Legt man jedoch die in Tierversuchen (Baur *et al.*, 2006) verwendeten Mengen von Resveratrol zugrunde, die zum Beispiel zum Erreichen einer Lebensverlängerung geführt haben, so müsste ein Mensch umgerechnet täglich mindestens 120 mg zu sich nehmen. Diese Menge kann nicht mit der täglichen Nahrung aufgenommen werden und bedarf demnach einer Supplementierung. Ein als akzeptabel definierter Wert (ADI = Acceptable Daily Intake) für den Menschen wurde von Crowell *et al.* (2004) für eine 65 kg-schwere Person auf 390 mg/Tag berechnet.

Die Ergebnisse aus den *in vitro*-Experimenten dieser Arbeit (vgl. Abschnitt 3.4 f. sowie 3.7 und 3.9) und aus Resultaten anderer *in vivo*-Studien weisen jedoch auf das Auftreten unerwünschter Effekte bei hohen Dosen hin (Cottart *et al.*, 2013). Diese betreffen hauptsächlich den Magen-Darm-Trakt und treten ab Dosierungen von ≥ 500 mg/Tag über längere Zeiträume auf. Dabei sind vor allem das Auftreten von Diarrhoe, Oberbauchschmerzen und Übelkeit zu nennen (Howells *et al.*, 2011, la Porte *et al.*, 2010). Die Effekte scheinen aber grundsätzlich eher moderat und bei Absetzen reversibel zu sein. Überdies stehen die beschriebenen unerwünschten Effekte nicht unmittelbar in Zusammenhang mit Resveratrol: Placebo-Gruppen zeigten mitunter ähnliche Symptome (Howells *et al.*, 2011). Allerdings gibt es nur wenige Studien, in denen die Verabreichung hoher Dosen von Resveratrol über einen längeren Zeitraum kontrolliert untersucht wurde. Die maximale Dauer der Einnahme von 2-5 g/Tag (diese Menge entspricht einem 5-10-fach erhöhten ADI) betrug lediglich einen Monat (Cottart *et al.*, 2013).

Untersuchungen zum estrogenen Potential von Resveratrol sollten zudem stärker in den Fokus gerückt werden. Denn mit einer Modulation am ER und verstärkten estrogenen Wirkungen steigt das damit verbundene mutagene Potential bei der Auslösung von Brustkrebs (Gehm *et al.*, 1997).

Fazit

Um die Sicherheit von Resveratrol auch bei einer Langzeit-Behandlung bewerten zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Das Design für diese *in vivo*-Studien muss vor allem die Analyse der Bioverfügbarkeit, die Metabolisierung und die Dosierung von Resveratrol berücksichtigen.

4.2.1 Bioverfügbarkeit von Resveratrol

Eine Reihe von Studien aus den letzten zehn Jahren hat gezeigt, dass Resveratrol aufgrund seiner schnellen Metabolisierung eine sehr niedrige Bioverfügbarkeit aufweist (Goldberg *et al.*, 2003). Dies führte zu der Annahme, dass viele der positiven Wirkungen von Resveratrol, die entweder in Zellmodellen oder biochemischen Assays beobachtet wurden, nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind. Die Frage nach der richtigen Dosis ist deshalb weiterhin schwer zu beantworten. Hierfür ist die Kenntnis über Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Resveratrol wichtig. Dieser Aspekt wurde bereits vielfach sowohl im Menschen als auch in Versuchstieren (v. a. in Nagetieren) untersucht (Gescher und Steward, 2003).

Beim Menschen wird Resveratrol nach oraler Applikation schnell aufgenommen und erreicht etwa 30-60 min nach Einnahme seine Plasma-Höchstkonzentration (Goldberg *et al.*, 2003) unabhängig von der Höhe der Dosis (Cottart *et al.*, 2013). Bis zu 70% des aufgenommenen Resveratrols sind im Menschen bioverfügbar (Walle *et al.*, 2004), bei Ratten etwa 50% (Marier *et al.*, 2002). Sowohl bei Menschen als auch bei Ratten unterliegt Resveratrol dem enterohepatischen Kreislauf. Dies führt zur Zirkulation der vom Organismus gebildeten Glucuronid- und Sulfat-Konjugate. Diese werden in den Darm rücksezerniert, dekonjugiert und reabsorbiert oder mit den Fäzes ausgeschieden (Walle *et al.*, 2004, Marier *et al.*, 2002). Der enterohepatische Kreislauf reduziert demnach die Menge des freien Resveratrols. Insofern ist die niedrige Konzentration des freien Hydroxystilbens im Blut einerseits durch den enterohepatischen Kreislauf und andererseits mit einem schnellen Metabolismus in der Leber zu erklären (Timmers *et al.*, 2012). Die Glucuronid- und Sulfat-Konjugate, einschließlich der Disulfate und der gemischten Sulfat-Glucuronide, werden als Hauptmetabolite gebildet (Wang *et al.*, 2005).

Resveratrol wird im menschlichen Körper, wie in **Abb. 4-1** dargestellt, schnell metabolisiert.

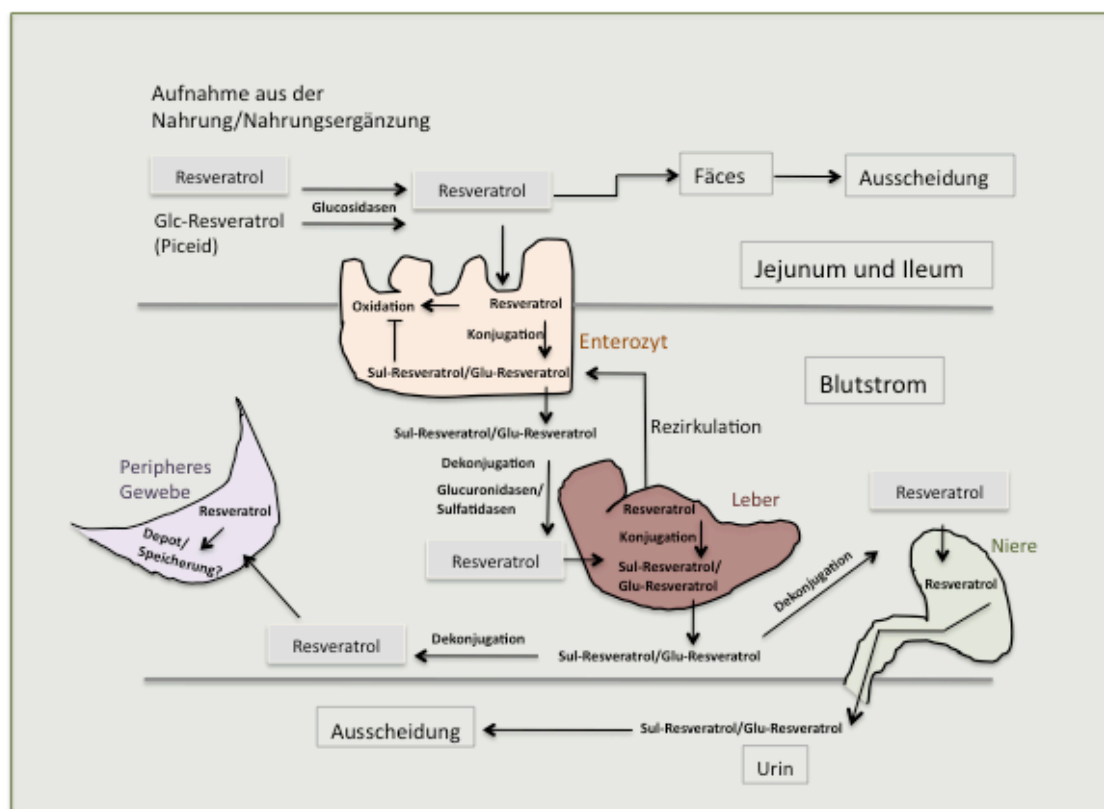


Abb. 4-1: Metabolisierung von Resveratrol

Dargestellt ist der Metabolismus von Resveratrol (modifiziert nach Signorelli und Ghidoni, 2005). Glc-Resveratrol: Resveratrol-3-O- β -glucosid (Piceid); Sul-Resveratrol: Resveratrol-3-Sulfat; Glu-Resveratrol: Resveratrol-3-O- β -glucuronid

Demzufolge gibt es Zweifel an der ausreichenden Bioverfügbarkeit und damit der Relevanz für das angenommene Wirkprofil der freien Substanz. Die Halbwertszeit hängt vom Vehikel ab und beträgt z. B. aus Traubensaft nur etwa 36 min (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Bei i.v.-Applikation wird Resveratrol innerhalb von 30 min größtenteils an Sulfate gebunden. Aufgrund des Darm-Leber-Kreislaufs erreicht nur ein Bruchteil des aufgenommenen Resveratrols die Zielstrukturen in freier Form. Mit der Nahrung werden durch Traubensaft- oder Rotweinkonsum nur selten mehr als 5 mg/L Resveratrol aufgenommen. Diese Menge führt zu sehr geringen Plasmaspiegeln unterhalb der mikromolaren Konzentration. Solche Werte liegen unterhalb der Nachweisgrenze von *in vitro*-Versuchen. Beispielsweise führt die Gabe von etwa 25 mg Resveratrol zu einer Plasmakonzentration von 1-5 ng/mL in der freien Form (Almeida *et al.*, 2009). Erst in höheren Dosen bis zu 5 g Resveratrol wurden Plasma-Spiegel von etwa 500 ng/mL vorgefunden (Boocock *et al.*, 2007).

Während moderate Dosen von 0,5-1 mg Resveratrol/kg Körpergewicht bei Verabreichung an nüchternen Probanden im humanen Plasma nachweisbar waren, konnte bei einer Gabe von geringen Dosen (0,6-1,8 mg Gesamtdosis) kein Resveratrol im Plasma detektiert werden (Baur und Sinclair, 2006).

In der Studie von Vitaglione *et al.* (2005) wurde der Plasmagehalt von freiem Resveratrol und seinen Metaboliten analysiert. Die Probanden wurden in Gruppen aufgeteilt, die verschiedene Ernährungsweisen befolgten und unterschiedliche Mengen an Rotwein konsumierten. Nach bestimmten Zeitintervallen wurde den Probanden Blut abgenommen. Diese Ergebnisse offenbarten eine große interindividuelle Differenz. Bei 14 von 25 Probanden wurde zu keiner Zeit Resveratrol im Blut gefunden, bei 11 von 25 Probanden wurde in mindestens einer Serumprobe Resveratrol oder ein Metabolit gefunden. Es darf hierbei jedoch keine geschlechtsspezifische Verteilung angenommen werden, da Männer und Frauen in den einzelnen Probanden-Gruppen gemischt und nicht gesondert ausgewertet wurden. Auf Basis der Studie scheint die Konzentration von Resveratrol im Plasma sehr niedrig zu sein und mit einer hohen interindividuellen Resorption und einem raschem Metabolismus bzw. einer raschen Clearance verknüpft zu sein. Den Autoren zufolge erklärt sich der protektive Effekt des Rotweins durch die Gesamtheit der Polyphenole und den Alkohol-Anteil, jedoch nicht durch Resveratrol allein (Vitaglione *et al.*, 2005).

Die Tatsache, dass selbst hohe Dosen Resveratrol nur zu niedrigen Plasma-Konzentrationen führen, zeigt, dass die in den verschiedenen Modellen eingesetzten wirksamen *in vitro*-Konzentrationen nicht ohne Weiteres *in vivo* erreicht werden können. In **Tab. 4-1** sind wichtige klinische Studien zur Bioverfügbarkeit von Resveratrol zusammengefasst.

Tab. 4-1: Bioverfügbarkeit von Resveratrol

Übersicht einiger *in vivo*-Studien zur Bioverfügbarkeit von Resveratrol (Resveratrol-Aufnahme aus Nahrungsergänzungsmitteln oder aus Nahrungsmitteln)

Autoren	Probanden/ Patienten	Parameter	Formulierung und Dosierung	Einnahme- dauer	Ergebnis
Vitaglione <i>et al.</i> , 2005	Gesunde Männer (14) und Frauen (11)	Bioverfügbarkeit von Resveratrol aus Rotweinkonsum	3; 4; 7,5 oder 33 μ g Resveratrol/kg Körpergewicht aus 300 oder 600 mL Rotwein mit drei verschiedenen Ernährungskonzepten: Einnahme ohne Mahlzeit, mit Standardmahlzeit oder mit einer Hoch- oder Niedrigfettmahlzeit	Einmaldosis	Freies Resveratrol bis 30 Minuten nach der Einnahme gefunden, später überwiegend Glucuronide. Bioverfügbarkeit unabhängig vom Lipidgehalt der Mahlzeit, starke interindividuelle Bioverfügbarkeitsunterschiede.
Nunes <i>et al.</i> , 2009	Gesunde, junge Männer und Frauen (6+6; Alter: 18-40 Jahre) und gesunde, ältere Männer und Frauen (6+6; Alter: \geq 65 Jahre)	Bioverfügbarkeit von Resveratrol als Nahrungsergänzung	200 mg Kapseln	Einmaldosis, gefolgt von Mehrfachdosen: alle 8 h über 3 Tage; letzte Einmaldosis an Tag 4	Aufnahme von pharmakokinetischen und Metabolisierungsprofilen. Resveratrol ist gut verträglich und das kinetische Profil ist unabhängig von Alter und Geschlecht.
Ortuño <i>et al.</i> , 2010	Gesunde Männer (11)	Bioverfügbarkeit von Resveratrol aus verschiedenen Resveratrolspezifikationen	Randomisierte, crossover-Studie: 250 mL Rotwein oder 1 L Traubensaft oder 10 Tabletten (Rotwein mit <i>trans</i> -Resveratrol angereichert)	Einmaldosis	Plasmakonzentration von <i>trans</i> -Resveratrol erhöht. Trotz Aufnahme ähnlicher Dosierungen ist die Bioverfügbarkeit aus Wein und Traubensaft 6x höher als aus den Tabletten.

Da Resveratrol lipophil ist und leicht mit Lipiden, Membranen und Lipoproteinen interagieren kann, sind die Konzentrationen von Resveratrol im Gewebe möglicherweise höher als im Plasma. Einige der biologischen Wirkungen von Resveratrol wurden zudem bei sehr geringen Konzentrationen beobachtet (Pearce

et al., 2008). Dies stützt die These, dass Resveratrol neben Primäreffekten auf intestinales Gewebe seine positiven Wirkungen auf den Organismus auch durch Sekundäreffekte oder durch seine Metabolite vermittelt (Baur und Sinclair, 2006). Unbeantwortet ist nach wie vor die Frage, ob und in welchem Ausmaß Gewebe in der Lage sind, Resveratrol-Metabolite zu speichern und diese zu einem späteren Zeitpunkt wieder in die freie Form zu überführen und damit bioverfügbar zu machen (Walle *et al.*, 2004).

Fazit

Falls weitere Studien belegen können, dass freies Resveratrol vorrangig die Wirkform darstellt, ist es zwingend erforderlich, seine Bioverfügbarkeit zu optimieren bzw. seine Metabolisierung zu verlangsamen. Interessanterweise belegen Untersuchungen, dass gleichzeitig anwesende Flavonoide, wie z. B. Quercetin, die Verstoffwechslung von Resveratrol (Glucuronidierung, Sulfatierung) hemmen können. Diese noch wenig erforschte Interaktion könnte zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit durch Co-Medikation *in vivo* führen und verdeutlicht erneut den Einfluss von Begleitsubstanzen (de Santi *et al.*, 2000a, de Santi *et al.*, 2000b).

Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine optimierte Bioverfügbarkeit von Resveratrol möglicherweise auch vermehrt zu unerwünschten Effekten führen kann. Die Festlegung einer „idealen Dosis“ setzt daher weitere gründliche Untersuchungen voraus.

4.3 Nahrungsergänzung mit Resveratrol

Um positive Effekte mit Resveratrol unter physiologischen Bedingungen erzielen zu können, sind offensichtlich hohe Dosen erforderlich (s. o.). Die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln mit beträchtlichen Mengen Resveratrol ist bei einigen Grunderkrankungen oder unter bestehender Arzneimitteltherapie mit interaktionsstarken Arzneistoffen jedoch nicht ratsam, wie folgende Beispiele verdeutlichen.

Estrogen-sensitive Krebsarten

Nach derzeitiger Datenlage scheint Resveratrol das Potential zu besitzen, sowohl als ER-Agonist als auch ER-Antagonist zu wirken. Dies hängt vom Zelltyp, ER-

Isoformen und dem Vorhandensein endogener Estrogene ab (Bowers *et al.*, 2000, Bhat *et al.* 2001b).

Bis mehr über die estrogene Aktivität von Resveratrol beim Menschen bekannt ist, sollten Frauen, die an Estrogen-sensitiven Tumoren wie Brust-, Eierstock- oder Gebärmutterkrebs leiden, auf eine Nahrungsergänzung mit Resveratrol verzichten.

Antikoagulative und Plättchenaggregationshemmer

Für Resveratrol wurde *in vitro* eine Hemmung der Thrombozytenaggregation beschrieben (Pace-Asciak *et al.*, 1996, Bertelli *et al.*, 1995). Demnach könnte die Aufnahme einer hohen Menge von Resveratrol im Rahmen einer Nahrungsergänzung das Risiko von Blutungen bei Patienten erhöhen, die unter einer Therapie mit Antikoagulanzen oder Thrombozytenaggregationshemmern stehen oder nicht-steroidale entzündungshemmende Medikamente einnehmen.

Arzneistoff-Metabolismus über CYP3A4

Weiterhin wurde für Resveratrol eine Hemmung des CYP3A4-Enzyms *in vitro* beschrieben (Piver *et al.*, 2001, Regev-Shosdani *et al.*, 2004). Dieser Effekt konnte zwar bisher *in vivo* nicht bestätigt werden. Dennoch ist eine Wechselwirkung bei der Einnahme hoch dosierter Nahrungsergänzungsmittel mit dem CYP-Isoenzymssystem nicht auszuschließen. In der Folge könnte einerseits die Bioverfügbarkeit erhöht sein, andererseits könnten toxische Nebeneffekte dieser Arzneistoffe auftreten, die über CYP3A4 verstoffwechselt werden.

Fazit

Die Toleranz gegenüber Resveratrol unterscheidet sich von Gewebe zu Gewebe und von Zelltyp zu Zelltyp. Negative Effekte auf den menschlichen Körper sind nicht auszuschließen. *In vitro*-Experimente geben lediglich Hinweise auf Toleranz und Verträglichkeit von Substanzen unter den speziellen experimentellen Bedingungen. Diese Beobachtungen müssen durch *in vivo*-Studien ergänzt werden.

Bis heute sind nur wenige *in vivo*-Studien zur Beurteilung von Verträglichkeit, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Resveratrol angefertigt worden (Baur *et al.*, 2006, Edwards *et al.*, 2011, Tomé-Carneiro *et al.*, 2013). Die noch unzureichende wissenschaftliche Beweislage zur Sicherheit von Resveratrol und fehlende Daten

über die Toxizität bei einer langfristigen Einnahme unterstreichen, dass die Anwendung beim Menschen noch nicht völlig frei von Risiken ist.

4.4 Einfluss von Resveratrol auf NO- bzw. ROS-Bildung in Makrophagen

4.4.1 Einfluss auf die induzierbare NO-Synthase und NO-Produktion

Neben der eingangs beschriebenen Zytotoxizität war in den Untersuchungen dieser Arbeit eine moderate antileishmanielle Aktivität von Resveratrol zu verzeichnen. Diese kann mit einem Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen-Effektormechanismen begründet werden. Makrophagen wandeln sich während der immunologischen Abwehr bei einer Leishmanien-Infektionen in leishmanizide Effektorzellen um (Kiderlen und Kaye, 1990, vgl. **Abb. 1-4**). Diese Aktivierung kann *in vitro* durch die Kombination von *rIFN- γ* und LPS erreicht werden. Möglich wäre, dass Resveratrol ähnlich einer kombinierten *rIFN- γ* /LPS-Stimulierung die Steigerung von Wirtszell-Abwehrmechanismen, wie z. B. einer gesteigerten NO-Produktion, fördert. Die Resveratrol-Behandlung wäre folglich ein indirekter Stimulus, der die Auslösung verschiedener Abwehrreaktionen der Makrophagen aktiviert. Im Unterschied zu der in der Arbeit verwendeten Kontrollsubstanz Amphotericin B liegt bei Resveratrol folglich kein direkter Abtötungs-Effekt auf intrazelluläre Leishmanien vor (Sundar und Chatterjee, 2006).

Zur Bekämpfung intrazellulärer Erreger bedienen sich Makrophagen eines breiten Spektrums an Effektor-Funktionen. Eine wesentliche Verteidigungsstrategie gegen intrazelluläre Erreger ist die Bildung von NO. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit Resveratrol die NO-Bildung zu induzieren vermag. Für eine Aktivierung der Makrophagen mit *rIFN- γ* /LPS waren Inkubationszeiten von 48 h nötig, damit eine vollständige Zerstörung der intrazellulären Parasiten erreicht werden konnte (Liew *et al.*, 1990, Kiderlen und Kaye 1990). Allein die Behandlung mit Resveratrol konnte die Makrophagen nicht zur NO-Bildung stimulieren. Im Unterschied zur Kontrolle (*rIFN- γ* /LPS) waren keine erhöhten Nitritspiegel als Maß für die NO-Produktion im Zellkulturüberstand messbar (vgl. **Abb. 3-21**). Damit hat Resveratrol keinen indirekten, stimulierenden Einfluss auf die Makrophagen und löst keine verstärkte NO-Bildung aus.

Nachfolgend wurden weiterführend mögliche NO-Scavenging-Effekte von Resveratrol untersucht, um Auswirkungen auf induzierte NO-Levels

auszuschließen. Für Resveratrol wird ein starkes antioxidatives Potential durch das Abfangen freier Radikale beschrieben (Cíz *et al.*, 2008, Sueshi und Hori, 2013). Dazu gehören u. a. reaktive Stickstoffspezies wie NO, aber auch ROS (Miura *et al.*, 2004) oder andere stabile Radikale wie das DPPH-Radikal (Hung *et al.*, 2002). Für die Versuche wurden zwei verschiedene Versuchs-Protokolle zum NO-Scavenging-Potential von Resveratrol entwickelt. Zunächst wurde in einem zellfreien Ansatz NO mithilfe von SNP generiert und die prozentuale Scavenging-Rate mithilfe des Griess-Assays (vgl. Abschnitt 3.6) bestimmt. Dabei ergaben sich nur moderate Scavenging-Aktivitäten von Resveratrol. Selbst bei Konzentrationen $\geq 30 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 131,3 \mu\text{M}$) wurden die freigesetzten NO-Mengen nur auf bis zu 65% reduziert (bezogen auf den Kontrollwert von 100%, vgl. **Abb. 3-19**). Ein anderes Bild zeigte sich im zellbasierten Assay. Bei J774-G8-Makrophagen, die mittels $r\text{IFN-}\gamma$ /LPS-Kombination zur NO-Produktion stimuliert wurden, zeigte sich schon ab Konzentrationen von ca. $27 \mu\text{M}$ eine signifikante Reduktion der NO-Konzentration im Zellkulturüberstand (um ca. 50%, bezogen auf den Kontrollwert von 100%; vgl. Abschnitt 3.6.2). Eine weitere Absenkung konnte aber auch mit deutlich höheren Konzentrationen nicht erreicht werden (vgl. **Abb. 3-22**). Dieses Phänomen kann mit dem Effekt der NO-Inhibition von Resveratrol erklärt werden (vgl. Abschnitt 3.6.3). Bei höheren Konzentrationen von Resveratrol ($\geq 27 \mu\text{M}$) wird neben dem Scavenging-Effekt die Expression der iNOS und damit die NO-Bildung stark gehemmt (vgl. Abschnitt 3.6.4). Somit ergibt sich bei einer Inkubationszeit von 48 h erwartungsgemäß ein Plateau, welches die Summe beider Effekte widerspiegelt.

Diese begrenzte Scavenging-Aktivität spiegelte sich auch im DPPH-Assay wider (IC_{50} -Wert: $93 \mu\text{M}$). Die Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit einer aktuellen *in vitro*-Studie zum antioxidativen Potential von Resveratrol, Quercetin und Kaffesäure (Kurin *et al.*, 2012). Hier zeigte sich für Resveratrol im Vergleich zu den anderen Polyphenolen die geringste Aktivität (auch in zusätzlichen Testungen wie dem FRAP-Assay u. a.). Im DPPH-Assay war den Autoren zufolge ein IC_{50} -Wert von $98 \mu\text{M}$ und im SNP-Assay für das NO-Scavenging ein IC_{50} -Wert von $95 \mu\text{M}$ für Resveratrol zu verzeichnen. Im Vergleich zu diesen Daten unterscheidet sich nur das Ergebnis der NO-Scavenging-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (Absenkung der NO-Spiegel nur auf 65% bezogen auf die Kontrolle). Dies kann im Versuchsdesign begründet sein. Die 20-fach höher konzentrierte SNP-Lösung produzierte möglicherweise mehr NO-Moleküle und erhöhte die Scavenging-Rate für Resveratrol stärker als die $4,5 \text{ mM}$ SNP-Lösung, die in dieser Arbeit verwendet

wurde. Zudem war die Reaktionstemperatur im Versuchsansatz bei Kurin *et al.* (2012) etwa 5 °C höher.

Um die Resveratrol-induzierte NO-Produktion bei Makrophagen noch eindeutiger beurteilen zu können, wurden die Zellen mit Resveratrol vorinkubiert und anschließend mit *r*IFN- γ /LPS aktiviert. Auffällig war dabei eine starke Hemmung der NO-Bildung (vgl. Abschnitt 3.6.3). Die behandelten Makrophagen waren nach Vorinkubation mit Resveratrol (Konzentrationen $\geq 5 \mu\text{g}/\text{mL} \hat{=} \geq 21,9 \mu\text{M}$) über 48 h nicht mehr in der Lage, auf die Stimulation mit *r*IFN- γ /LPS mit gesteigerter NO-Produktion zu reagieren (vgl. **Abb. 3-22**). Dieser Beobachtung folgend sollte geklärt werden, ob die Inkubation mit Resveratrol zu einer Reduktion der iNOS-Expression führt. Diese Vermutung konnte bestätigt werden: Nach 48-stündiger Inkubation der J774-G8-Makrophagen war schon ab der Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (21,9 μM) eine deutliche Reduktion der iNOS-Expression im Western Blot zu detektieren (vgl. Abschnitt 3.6.4).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Resveratrol-Behandlung *eine* wesentliche Abwehrreaktion von Makrophagen abschwächt: Die Hemmung der iNOS-Expression verhindert die Produktion von NO. Diese gilt jedoch für Immun-Abwehrzellen (z. B. Makrophagen) als wichtiger Mechanismus, eine bestehende Infektion mit intrazellulären Erregern wie Leishmanien zu kontrollieren. Schon Anfang der 1990er Jahre zeigten Liew *et al.* (1990), dass das Abtöten von *Leishmania*-Parasiten durch Makrophagen *in vivo* über die Bildung von NO aus L-Arginin erreicht wird. Dies wurde einerseits über eine spezifische NO-Inhibition (L-NMMA: spezifischer Inhibitor von L-Arginin im NO-Signalweg) und andererseits durch die Konstruktion von iNOS-defizienten Mäusen bewiesen (Wei *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu iNOS-exprimierenden Mäusen waren die defizienten Maus-Mutanten sehr anfällig für die Infektion und nicht in der Lage, die Parasiten in gleichem Maße abzutöten. Resveratrol könnte demnach die Immunabwehr durch die Beeinflussung der iNOS und einer daraus folgenden verminderten Fähigkeit der Makrophagen, NO zu produzieren, abschwächen.

Die durch Aktivierung exprimierte funktionsfähige iNOS kann sehr hohe NO-Konzentrationen produzieren. Dies geschieht sowohl als Reaktion auf die Induktion mit LPS als auch in Kombination mit Zytokinen in diversen Zelltypen (Tsai *et al.*, 1999). Hohe Konzentrationen von NO haben jedoch eine Kehrseite: Sie werden im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen und der Induktion von Zytotoxizität, Gewebeschäden oder DNA-Schäden diskutiert (Nguyen *et al.*, 1992, Koprowski *et al.*, 1993).

Die verminderte iNOS-Expression der Makrophagen, die durch die Inkubation mit Resveratrol verursacht wird, scheint in der Hemmung der NF κ B-Aktivierung begründet zu liegen. Qureshi *et al.* (2012) zeigten, dass die NF κ B-Hemmung eine verminderte Expression von Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und auch der iNOS selbst zur Folge hat, die normalerweise während der Immunantwort durch LPS-Stimulation aktiviert wird. Die Autoren belegen für Resveratrol zudem die Fähigkeit, als Proteasom-Inhibitor die Transkription verschiedener Gene zu modulieren, die bei der Inflammation eine Rolle spielen.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die moderate antileishmanische Aktivität von Resveratrol nicht auf erhöhte NO-Konzentrationen zurückführen lässt. Im Gegenteil - eine Resveratrol-Behandlung schwächt sogar Makrophagentypische Abwehrsysteme und verhindert eine erfolgreiche Zerstörung der intrazellulären Parasiten und damit die zelluläre Kontrolle über die Infektion.

Dennoch kann der antiinflammatorische Effekt von Resveratrol unter Umständen eine positive Auswirkung auf den Organismus haben. So könnte Resveratrol zum Schutz vor überschießenden Immunreaktionen beitragen, indem die stimulierende Wirkung von Substanzen auf die iNOS-Aktivität abgeschwächt oder aufgehoben wird (Tsai *et al.*, 1999). Diese schon seit langer Zeit bekannten antiinflammatorischen Effekte von Resveratrol aus *in vitro*-Experimenten werden aber erst in jüngster Zeit auch am Menschen verstärkt untersucht (Ghanim *et al.*, 2011, Timmers *et al.*, 2011).

4.4.2 Einfluss auf die ROS-Bildung

Nicht nur NO spielt bei der Abwehr von intrazellulären Parasiten eine Rolle. Murray *et al.* (1979) postulierten das Vorhandensein eines sauerstoffabhängigen antimikrobiellen Systems in Makrophagen, welches über die Produktion von Superoxidanion und H₂O₂ eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung des intrazellulären Pathogens *Toxoplasma gondii* spielt. Die gleichen Autoren beschrieben wenige Jahre später ebenfalls für Makrophagen einen sauerstoffabhängigen Abwehrmechanismus bei der Infektion mit *Leishmania donovani*-Parasiten (Murray und Cartelli, 1983).

Ende der 1980er Jahre zeigten Schnittman *et al.* (1988), dass erhöhte Konzentrationen von ROS bei der Immunabwehr im Infektionsgeschehen mit

Mycobacterium avium-Komplex eine wichtige Rolle spielen. Die Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies ist demnach einerseits ein strategisch wichtiges Werkzeug für die erfolgreiche Verteidigung des Wirts gegen eindringende Organismen. Andererseits können ROS bekannterweise auch zelluläre Schäden hervorrufen. Einige Vertreter der ROS, wie z. B. H_2O_2 , können Membranen ohne Weiteres überwinden. Die sensitivste Zielstruktur für ROS ist die DNA. Hier entstehen durch ihre Einwirkung Einzelstrangbrüche und Funktionalitätsverlust (Hoffman und Meneghini, 1979, Bradley und Erickson, 1981, Imlay *et al.*, 1988).

Bis vor ein paar Jahren fokussierten sich die Untersuchungen zu den Wirkungen von ROS meist auf oxidative Schäden. Die reaktiven Moleküle wurden als Auslöser für den Zelltod angesehen. Heute ist belegt, dass die biologischen Funktionen von ROS durch zahlreiche Variablen, wie z. B. die Konzentration, die chemische Art und ihre zelluläre Lokalisation, bestimmt wird. Zum Beispiel können ROS unter bestimmten Umständen den induzierten Zelltod sogar unterbrechen, indem sie in die Redoxregulation induzierbarer Caspase-Aktivität eingreifen (Sen und Roy, 2001). Bei niedrigen Konzentrationen scheinen ROS das Überleben von Zellen überdies zu schützen und keine Schäden hervorzurufen. Das Gegenteil tritt bei hohen ROS-Konzentrationen auf (Feinendegen, 2002).

Demnach war die Untersuchung zum ROS-modulierenden Potential von Resveratrol in dieser Arbeit ein wichtiger Schritt bei der Identifizierung möglicher antileishmanieller oder zytotoxischer Ursachen. Bei einer Inkubation der J774-G8-Makrophagen zeigte sich eine starke ROS-Induktion in den Zellen. Schon Resveratrol-Konzentrationen von $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 21,9 \mu\text{M}$) verursachten eine deutliche ROS-Bildung, die mittels H_2 -DCF-DA-Fluoreszenz am Lichtmikroskop dokumentiert werden konnte (vgl. Abschnitt 3.10.2).

ROS werden von antimikrobiellen Effektorzellen auf unterschiedlichen Wegen gebildet. Phagozyten erzeugen reaktive Intermediate über NADPH-Oxidasen oder Myeloperoxidasen. Die im Rahmen der Immunabwehr produzierten ROS dienen sowohl zum Schutz vor intrazellulären Pathogenen, können aber auch nach außen abgegeben werden, um extrazelluläre Erreger abzutöten. Ebenfalls können ROS aus der mitochondrialen Atmungskette antimikrobielle Wirkungen besitzen (Bogdan *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit beobachtete moderate antileishmanische Aktivität von Resveratrol lässt sich womöglich auf eine erhöhte Produktion von ROS zurückführen. Gleichmaßen können die erhöhten ROS-Konzentrationen auch zu Zellschädigungen und Apoptose-Induktion führen. Zur Überprüfung dieser

Folgereaktion der Makrophagen auf eine Behandlung mit Resveratrol wurde die Fluoreszenzdoppelfärbung Annexin-V/PI (vgl. Abschnitt 3.9.1) eingesetzt, um frühe apoptotische Veränderungen an den Zellmembranen der Makrophagen zu detektieren. Die Ergebnisse der Färbung zeigten eindeutige apoptotische Veränderungen nach Behandlung mit Resveratrol (vgl. **Abb. 3-28**). Konzentrationen ab $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\hat{=} 21,9 \mu\text{M}$) führten zu einer Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität durch einen zunehmenden Anteil Annexin-V-positiver Zellen. Bei höheren Konzentrationen ($\geq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ $\hat{=} \geq 65,7 \mu\text{M}$) führten stärkere Schädigungen auch zur Abrundung und Ablösung der Zellen vom Zellkulturplastik. Zudem stieg der Anteil PI-positiver Zellen an.

Fazit

Dass hohe ROS-Konzentrationen einen Einfluss auf die Apoptose-Induktion von Zellen haben, wurde bereits ausgeführt. Die ausgeprägten toxischen Effekte von Resveratrol auf die Makrophagen-ähnliche Krebszelllinie J774-G8 limitieren jedoch den Einsatz im Kontext einer Makrophagen-Infektion. Allerdings sind die Effekte möglicherweise auf andere Zelllinien übertragbar, z. B. auf die aus humanen Lungenkarzinomzellen gewonnenen A549-Zellen. Die toxischen Effekte könnten sich hierbei gezielt ausnutzen lassen, um das antikanzerogene Potential von Resveratrol zu untersuchen. In den folgenden *in vitro*-Experimenten wurden die genannten humanen Lungenkarzinomzellen kultiviert, um die zytotoxischen Wirkungen von Resveratrol und ihre nachgeschalteten Effekte (z. B. Auslösung von Apoptose) zu untersuchen.

4.5 Einfluss auf die Apoptose-Induktion *in vitro*

Neben der antileishmaniellen Aktivität und der Prüfung auf therapeutische Eignung, die im ersten Abschnitt der Arbeit beleuchtet wurden, sollte im zweiten Teil der Arbeit das chemotherapeutische bzw. chemopräventive Potential von Resveratrol untersucht. Hierzu wurde die humane Lungenkrebszelllinie A549 als *in vitro*-Modell ausgewählt.

Trotz der Fortschritte in der Lungenkrebstherapie ist die Chance auf Heilung oder Lebensverlängerung weiterhin gering. Die Entwicklung und Erforschung neuer Wirkstoffe bzw. Strategien für den gezielten Eingriff in die Onkogenese ist daher von großer Bedeutung.

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien hat gezeigt, dass der tägliche Verzehr von Obst und Gemüse, die reich an sekundären Pflanzenstoffen sind, das Risiko

für verschiedene Krankheiten vermindern kann. Als sicher gilt, dass pflanzliche diätetische Substanzen positive biologische Aktivitäten besitzen. Unklar ist jedoch weiterhin, auf welche Weise und in welchem Umfang Nahrungsmittelbestandteile gesundheitsfördernde Effekte vermitteln (Murakami, 2013).

Resveratrol ist als Bestandteil von Nahrungs- und Genussmittel leicht zugänglich. In der Vergangenheit erregte der Stoff einige Aufmerksamkeit als mögliches chemopräventives Mittel bzw. Chemotherapeutikum. Zahlreiche Studien unter Verwendung von *in vitro*- und *in vivo*-Modellsystemen stellen Resveratrol als effektives Agens dar, welches die Krebserkrankung in der Initiations-, Promotions- und Progressionsphase zu hemmen vermag und eine Vielzahl von Signalwegen modulieren kann, die mit Zellwachstum, Zellteilung und Apoptose assoziiert sind (Jang *et al.*, 1997, Ignatowicz und Baer-Dubowska, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte exemplarisch bestätigt werden, dass Resveratrol Apoptose in Krebszellen auszulösen vermag. In A549-Zellen wurde die Aktivierung der Caspase 3 in Konzentrationen $\geq 65,7 \mu\text{M}$ via Western Blot und in einem kolorimetrischen Assay nachgewiesen (vgl. Abschnitt 3.14.1 und 3.14.3). Die Aktivierung der Caspase 8 konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.14.2). In geringeren Konzentrationen erfolgte zwar keine Aktivierung der Caspase 3, diese Befunde stehen jedoch in Einklang mit einer aktuellen *in vitro*-Studie zur Resveratrol-induzierten vorzeitigen Alterung in Lungenkrebszellen. Luo *et al.* (2013) zeigten, dass niedrige Konzentrationen von Resveratrol das Wachstum der Lungenkrebszelllinie durch einen Apoptose-unabhängigen Mechanismus hemmen. Die Aktivierung der Caspase 3 bleibt bis zu einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ aus. Der zugrundeliegende Mechanismus scheint die Auslösung der vorzeitigen Seneszenz zu sein. Diese wird durch zytotoxische DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst und führt in der Folge zum Zelltod oder zum Zellzyklusarrest. Die Arbeitsgruppe um Luo führte den Nachweis über das Histon γH2AX , welches als sensitiver Marker für DNA-Doppelstrangbrüche fungiert (Rogakou *et al.*, 1998, Olive, 2004). Die Autoren zeigten, dass mit Resveratrol behandelte A549-Tumorzellen erhöhte Anteile an γH2AX -positiven Zellen aufwiesen. Sie schlussfolgerten daher, dass die Behandlung mit geringen Konzentrationen von Resveratrol das Wachstum von Lungenkrebs-Zellen über eine durch DNA-Schädigung induzierte vorzeitige Seneszenz unterdrückt.

Diese Beobachtungen zu Apoptose-unabhängigen Effekten in der A549-Linie im Niedrigkonzentrationsbereich ($\leq 60 \mu\text{M}$) sowie die in dieser Arbeit gezeigten Caspase 3-abhängigen Apoptose-Induktion bei höheren Konzentrationen

($\geq 65,7 \mu\text{M}$; vgl. Abschnitt 3.14.3) von Resveratrol zeigen, dass die *in vitro*-Effekte konzentrationsabhängig sind und offensichtlich unterschiedliche Signaltransduktionswege in Gang setzen.

4.5.1 ROS-Bildung in A549-Zellen nach Blockade der Atmungskette

Resveratrol zeigte, wie in den Abschnitten 3.10.3 und 3.11.2 beschrieben, in der vorliegenden Arbeit ein ROS-Induktionsvermögen in A549-Zellen. Um die Herkunft der ROS genauer beschreiben zu können, wurden die A549-Zellen einer Vorbehandlung mit Rotenon (Inhibitor am Komplex I der mitochondrialen Atmungskette) unterzogen. In einem experimentellen Protokoll wurde durch Resveratrol zunächst die Bildung von ROS induziert (Kontrollpräparate), was zu einer Intensitätserhöhung der grünen Fluoreszenz ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Färbung) führte (vgl. Abschnitt 3.15.2). Nach Vorinkubation mit Rotenon war die Resveratrol-induzierte Fluoreszenzintensität verringert (vgl. **Abb. 3-45**). In gleicher Weise ließ sich durch die Blockade der Atmungskette die Induktion der Apoptose in den A549-Zellen vermindern (vgl. **Abb. 3-46**). Dies lässt den Schluss zu, dass das Mitochondrium als wesentliche Quelle für die erhöhte ROS-Produktion anzusehen ist. Darüber hinaus ist die erhöhte ROS-Produktion auch für eine verstärkte Apoptose-Induktion verantwortlich. Dass eine erhöhte ROS-Produktion im Mitochondrium im Zusammenhang mit einer Apoptose-Induktion steht, wurde schon Mitte der neunziger Jahre festgestellt (Zamzami *et al.*, 1995, Petit *et al.*, 1996). Die Ergebnisse zur Blockade der Atmungskette zeigen, dass Resveratrol sein Apoptose-induzierendes Potential in A549-Zellen über eine Interaktion mit dem mitochondrialen Signalweg bewirkt (vgl. Abschnitt 3.15.2).

Interessanterweise gibt es aktuelle Studien, in denen Resveratrol die Produktion von ROS vermindert: Mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierte A549-Zellen produzieren wie erwartet als Abwehrantwort auf den infektiösen Prozess reaktive Sauerstoffspezies (Cerqueira *et al.*, 2013). Überwiegt der oxidative Stress jedoch die zellulären Entgiftungskapazitäten, so hat dies zerstörerische Folgen - in diesem Fall für die Lungenzellen. Als antioxidative Substanz senkt Resveratrol die durch die Infektion hervorgerufene ROS-Produktion in A549-Zellen und hemmt nachfolgend die Aktivierung von Caspasen. Cerqueira *et al.* (2013) postulieren daher, dass Resveratrol Lungenzellen vor einer übermäßigen ROS-Produktion mit schädlichen Auswirkungen bei einer *P. aeruginosa*-Infektion schützen kann. Halicka *et al.* (2012) zeigten zudem, dass Resveratrol in A549-Zellen im Vergleich

zur Kontrollprobe intrazelluläre ROS-Spiegel absenken und auch den Anteil γ H2AX-positiver Zellen reduzieren kann. γ H2AX wird als Fokus direkt um den Doppelstrangbruch der DNA herum, also nach einer Schädigung, gebildet. Die Arbeitsgruppe beschreibt, dass die durch ROS-Bildung geschädigte DNA eine der Hauptursachen des Alterns darstellt. Resveratrol als antioxidative Substanz senkt die intrazellulären ROS-Spiegel. In der Folge wird weniger H2AX phosphoryliert (γ H2AX) und die DNA-Schädigung verhindert.

Fazit

Die aufgeführten unterschiedlichen Ergebnisse der eigenen und die aus der Literatur zu entnehmenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass das ROS-Induktionsvermögen und die antioxidativen Eigenschaften von Resveratrol bei der Behandlung von Lungenkrebszellen miteinander gekoppelt sind. Dass Resveratrol moderate antioxidative Eigenschaften aufweist, konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.6.1 und 3.8). Um den Mechanismus dieses biphasischen Effekts von Resveratrol besser erklären zu können, bedarf es weiterer Studien. Auch ist eine Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf *in vivo*-Verhältnisse nur bedingt möglich. Inwieweit sich daher Resveratrol zur Krebstherapie durch seine Beteiligung an der ROS-Homöostase eignet, ist gegenwärtig nicht eindeutig zu beantworten.

4.5.2 ROS-Bildung in Makrophagen nach Blockade der Atmungskette

Ergänzend zu den Untersuchungen an A549-Zellen wurde das Experiment um den Einfluss von Resveratrol auf die ROS-Bildung in J774-G8-Makrophagen erweitert. Hier zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Die durch Resveratrol hervorgerufene ROS-Bildung war nach Rotenon-Vorinkubation zur Blockade der Atmungskette signifikant verringert (s. **Abb. 3-47**). Auch die durch Resveratrol induzierte Apoptose (Annexin-V-Färbung) wurde deutlich vermindert (vgl. Abschnitt 3.15.3 und **Abb. 3-48**). Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten ROS-Produktion und der Induktion von Apoptose lässt sich in diesem Zusammenhang auch mit der Beteiligung von Gluthation (GSH) erklären. GSH ist ein häufig vorkommendes intrazelluläres niedermolekulares Thiol, das zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxgleichgewichtes beiträgt. Diese Schutzwirkung erfolgt über die Oxidation der Thiol-Gruppe des Cysteinrestes, was zur Bildung von oxidiertem Glutathion (GSSG) führt. GSSG kann katalytisch

durch die GSH-Reduktase zwar wieder in GSH zurückgeführt werden (Meister und Anderson, 1983). Unter oxidativem Stress kann GSH aber auch aus den Zellen ausgeschleust werden, was insgesamt zu einer Verminderung an intrazellulärem GSH führt (Reed, 1990). Intrazellulärer GSH-Verlust ist ein frühes Zeichen eines fortschreitenden Zelltods in Reaktion auf verschiedene apoptotische Stimuli (Hammond *et al.*, 2004, Franco und Cidlowski, 2006, Honda *et al.*, 2004). Guha *et al.* (2010) zeigten, dass Resveratrol in der U937-Zelllinie (humane Zellen, aus histozytärem Lymphom mit Eigenschaften und Morphologie von Makrophagen) die Produktion von ROS stimuliert, was zu einer Caspase-abhängigen Apoptose führt. Diese ROS-Produktion wird in Folge einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch mitochondriale pro-apoptotische Proteine moduliert (Kirkland and Franklin, 2007).

Für Resveratrol ist eine verstärkte Bildung dieser pro-apoptotischen mitochondrialen Proteine beschrieben worden (Mohan *et al.*, 2006). Der Zusammenhang zwischen GSH-Verlust, ROS-Produktion und mitochondrialer Translokation pro-apoptotischer Proteine scheint demnach von entscheidender Bedeutung zu sein. Guha *et al.* (2011) fassen die Effekte für Resveratrol derart zusammen: Resveratrol erhöht die ROS-Produktion (Änderung von $\Delta\Psi_m$, also dem Membranpotential), provoziert darüber GSH-Verlust, induziert nachfolgend die Bildung pro-apoptotischer Proteine und sorgt schließlich für Apoptose.

Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde die mitochondriale ROS-Produktion durch die Blockade der Atmungskette mit Rotenon unterdrückt und der Effekt der Apoptose-Induktion durch Resveratrol vermindert. Die Ergebnisse in Abschnitt 3.15.3 zeigen deutlich, dass Resveratrol einen Einfluss auf die in der Atmungskette entstehenden ROS besitzt, indem es ihre Bildung erhöht. Durch die Blockade der Atmungskette bleibt die durch Resveratrol erhöhte ROS-Produktion aus. In der Folge ist auch die Apoptose-Induktion, die mit einer erhöhten ROS-Konzentration in Zusammenhang steht, reduziert. Dies belegt, dass ebenfalls im Mausmakrophagen-Modell ein wesentlicher Teil der Resveratrol-induzierten ROS-Bildung dem Mitochondrium entstammt. Diese Erkenntnisse bekräftigen die oben beschriebenen Effekte (Guha *et al.*, 2011) und lassen sich demnach gleichartig für das vorliegende *in vitro*-Modell (J774-G8-Makrophagen) annehmen. Um dies endgültig bestätigen zu können, müssten weitergehende Untersuchungen zur Up-

Regulation von pro-apoptotischen Proteinen durch Resveratrol in J774-G8-Makrophagen durchgeführt werden.

4.6 Resveratrol und Krebs: *in vivo*-Studien

Jüngste Studien, die Resveratrol im Krebsgeschehen untersuchen, beziehen sich auf Patienten mit diagnostizierter Krebserkrankung (Howells *et al.*, 2011), Patienten mit einem erhöhten Krebs-Risiko (Zhu *et al.*, 2012) und Gesunde (Brown *et al.*, 2010). Diese Untersuchungen konzentrieren sich dabei nicht auf Resveratrol als Heilmittel oder lebensverlängerndes Agens, sondern legen den Fokus auf die Effekte von Resveratrol in Krebs-Signalwegen und deren Verteilung im Zielgewebe. Da angenommen wird, dass hohe Konzentrationen von Resveratrol benötigt werden, um im Tumor eine ausreichende Wirkung initiieren zu können und da Resveratrol zudem schnell metabolisiert wird, wurde die Gabe hoher Dosen von bis zu 5 g täglich untersucht (Howells *et al.*, 2011, Brown *et al.*, 2010). Diese hohen Dosen zeigten zwar erhöhte Apoptose-Raten in hepatischem Tumorgewebe, waren aber unauffällig bei der Modulation verschiedener tumorspezifischer Protein-Regulationen. Eine Dosis von 2,5 g/Tag Resveratrol erwies sich als effizienteste Dosierung. Bei Patienten mit einem Kolon-Karzinom hingegen verursachte die Einnahme von täglich 0,5 oder 1,0 g Resveratrol eine reduzierte Zellproliferation (Patel *et al.*, 2010).

Fazit

Die Ergebnisse der Studien sind trotz aller Euphorie kritisch zu bewerten. Zum einen war die Verabreichungsdauer von maximal einem Monat nur sehr kurz. Zum anderen stellen die sehr kleinen Patientenkohorten keine verlässliche Interpretationsgrundlage dar (Howells *et al.*, 2011, untersuchten nur 7 Patienten mit fortgeschrittenem Darmkrebs, Patel *et al.*, 2010, inkludierten 20 Darmkrebs-Patienten bzw. Zhu *et al.*, 2012, analysierten die Daten von 39 Frauen mit Brustkrebs).

4.7 Resveratrol und Anti-Aging

Neben den zuvor beschriebenen biologisch-pharmakologischen, antioxidativen, zellproliferationshemmenden und ROS-modulierenden Eigenschaften, wird Resveratrol die Fähigkeit zur Aktivierung von Sirtuinen attestiert. Sirtuine sind Enzyme, die ubiquitär vorkommen. Biochemisch betrachtet handelt es sich bei

Sirtuinen um Histondeacetylasen (HDAC), die acetylierte Lysinreste in Proteinsubstraten über einen NAD⁺-abhängigen Mechanismus deacetylieren. Derzeit sind 7 Sirtuine (SIRT 1 bis 7) bekannt und charakterisiert, wobei SIRT 3, 4 und 5 ausschließlich im Mitochondrium vorkommen. Die Zuordnung der Sirtuine zu speziellen zellulären Kompartimenten lässt die Vermutung zu, dass ihre spezifischen biologischen Funktionen, etwa die Deacetylierung von Zielproteinen, gezielt beeinflusst werden können. Sirtuine regulieren den Stoffwechsel, Stressreaktionen und Alterungsprozesse. Ihnen wird eine Beteiligung an der zellvermittelten Alterung bescheinigt, genauer gesagt an der Verlängerung der Lebensdauer von Zellen. Zudem besitzen sie im aktivierten Zustand einen Effekt auf den Stoffwechsel, der einer kalorienarmen Ernährung gleichkommt (Gertz *et al.*, 2012).

Wegen seines Einflusses auf Sirtuine wird Resveratrol auch als CR-Mimetikum bezeichnet. Die Kalorienrestriktion (CR = calorie restriction) gehört zu den am längsten bekannten, am besten untersuchten und umfassendsten dokumentierten Therapieansätzen der Anti-Aging-Medizin (Kleine-Gunk, 2007). Bis heute ist sie die einzige interventionelle Maßnahme, für die experimentell eine tatsächliche Lebensverlängerung nachgewiesen werden konnte. Resveratrol ist in der Lage, spezifisch Sirtuine zu aktivieren, und somit die Lebensdauer von Zellen zu verlängern sowie Stoffwechselerkrankungen zu lindern. Dabei wird kontrovers diskutiert, ob Resveratrol SIRT1 *in vitro* direkt oder indirekt aktiviert. Die Erkenntnis, dass der Aktivierung eine Substratsequenz-Spezifität zugrunde liegt, ist dabei ein gänzlich neuer Aspekt (Lakshminarasimhan *et al.*, 2013).

Während Resveratrol in den vergangenen zehn Jahren in vielen *in vitro*- und *in vivo*-Studien untersucht und als gesundheitsförderndes Polyphenol beschrieben wurde, sind klinische Studien am Menschen nicht vollumfänglich durchgeführt worden. Darüber hinaus gibt es große Schwierigkeiten, Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit von Resveratrol aus Tiermodell-Studien in präklinischen Studien am Menschen zu reproduzieren (Mohar und Malik, 2012). Eine Beteiligung an der Regulation von Altersvorgängen scheint für Resveratrol dennoch wahrscheinlich.

4.8 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeichnen ein ambivalentes Bild von Resveratrol. Resveratrol scheint ungeeignet für den Einsatz bei einer Leishmanien-Infektion zu sein. Und damit ist auch ein Einsatz bei anderen infektiösen Erkrankungen

fraglich, bei denen Makrophagen die Wirtszellen darstellen. Dabei trägt die unterdrückte Immunantwort, die vor allem die Down-Regulation der iNOS und ihre Folgen betrifft, maßgeblich zur eingeschränkten Einsatzfähigkeit von Resveratrol bei. Dennoch lässt sich diese antiinflammatorische Fähigkeit möglicherweise bei chronisch-entzündlichen Prozessen ausnutzen.

Eine vielversprechende Eigenschaft von Resveratrol ist die Fähigkeit, modulierend in den Zellzyklus einzugreifen. Die Caspase-Aktivierung bzw. die Triggerfunktion im mitochondrialen Apoptoseweg durch eine erhöhte ROS-Konzentration kann einen möglichen Therapieansatz darstellen. Zudem sind die Sirtuin-Modulation und die damit verbundene Lebensverlängerung ein Charakteristikum, das bisher nur für wenige Substanzen beschrieben wurde.

Dennoch sind die gesundheitsfördernden Wirkungen von Resveratrol nach wie vor umstritten oder nur von geringem Ausmaß (Cottart *et al.*, 2013). Zudem unterscheiden sich die interindividuellen Werte und Parameter häufig sehr deutlich. Auch sind die Ergebnisse der verschiedenen Studien aufgrund der unterschiedlichen Protokolle nur schwer vergleichbar und lassen sich kaum verallgemeinern. Daher sind weitere umfassende Untersuchungen erforderlich, um die positiven Wirkungen von Resveratrol zu validieren und die Sicherheit beurteilen zu können. Dies scheint vor allem nötig, wenn hohe Dosen über längere Zeiträume verabreicht werden. Überdies sind Derivate und Analoga von Resveratrol, die derzeit noch im Schatten von Resveratrol stehen, aussichtsreiche Alternativen zur Muttersubstanz und verdienen weitere Aufmerksamkeit in wissenschaftlichen Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Resveratrol (3,4',5-Trihydroxy-trans-stilben) ist ein natürlich vorkommendes Phytoalexin. Es kommt in Nahrungsmitteln wie Maulbeeren und Erdnüssen vor, wird aber vor allem in den Schalen von Weintrauben gebildet. Das Hydroxystilben wird in der Pflanze als Reaktion auf UV-Strahlung, Mikrobenbefall, bei Gewebeerstörung (z. B. durch Herbivore) sowie bei Ozoneinwirkung gebildet. Resveratrol zählt zu den für den Menschen bedeutsamen polyphenolischen Substanzen, für die eine Reihe gesundheitsfördernder Eigenschaften entdeckt wurden. Resveratrol ist vor allem deshalb von großem Interesse, da es ein mit der Ernährung leicht zugängliches diätetisches Phytopharmakon ist, dem eine Vielzahl positiver Wirkungen auf den Organismus zugeschrieben wird. Hierzu zählen die antioxidative Aktivität, die Eigenschaft als Radikalfänger, die Modulation von Stoffwechselprozessen einschließlich des Fettstoffwechsels, eine Förderung der Vasorelaxation, chemopräventive bzw. antikanzerogene Effekte und eine estrogene Aktivität. Über eine antiparasitäre Wirkung – konkret über eine antileishmanielle Aktivität – gibt es indes nur eine einzige richtungsweisende Untersuchung. Diese antileishmanielle Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit mit Blick auf den Wirkmechanismus evaluiert.

Die Leishmaniose ist eine Infektionskrankheit, die vor allem in tropischen Regionen weit verbreitet ist. Doch auch in subtropischen und gemäßigten Gebieten, wie z. B. dem Mittelmeerraum und Asien, steigt die Zahl der Erkrankungen stetig an.

Eine zunehmende Resistenz-Entwicklung gegenüber bestehenden Arzneimitteln sowie eine stärkere Verbreitung der Infektionskrankheit unterstreicht die Notwendigkeit zur Entwicklung von sicheren und innovativen Arzneistoffen gegen die Leishmaniose, um auch in Zukunft nachhaltige Therapieoptionen zu besitzen. Aus diesem Grund ist es wichtig, neue Zielstrukturen und Substanzen zu erschließen, die eine effektive Bekämpfung insbesondere gegen die klinisch relevante amastigote Form des Parasiten sicherstellt.

Resveratrol wurde in dieser Arbeit mithilfe eines breiten Methodenspektrums (MTT-Assay, durchflusszytometrische Analyse, mikroskopische Untersuchungen) hinsichtlich seiner antileishmaniellen Aktivität gegenüber *Leishmania major*-GFP beurteilt. Diese transfizierten Parasiten exprimieren ein grün fluoreszierendes

Protein (GFP), welches als Parameter für die Viabilität genutzt werden kann. Die FACS-Analyse zeigte eine nur moderate Aktivität gegenüber promastigoten Parasiten im Konzentrationsbereich $\leq 35 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong \leq 153,2 \mu\text{M}$), jedoch deutliche antileishmanielle Effekte bei höheren Testkonzentrationen $\geq 45 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong \geq 197,2 \mu\text{M}$). Zudem konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion des GFP-Signals bei infizierten Makrophagen (BMM Φ und J774-G8) beobachtet werden (IC_{50} -Werte: BMM Φ $9,9 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 43,6 \mu\text{M}$) und J774-G8: $24,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 108,6 \mu\text{M}$)). Abweichungen in den IC_{50} -Werten lassen sich mit der unterschiedlichen Gewinnung und der daraus resultierenden Zelldisparität erklären.

Überraschenderweise schwächte Resveratrol eine wichtige Abwehrstrategie der Makrophagen gegen intrazelluläre Erreger ab, die NO-Bildung. Neben dem Nachweis, dass Resveratrol nur moderate direkte NO-Scavenging-Aktivitäten im zellfreien (SNP) und zell-basierten Assay aufwies, zeigte der Western Blot eine reduzierte Expression der iNOS-Proteinmengen nach Behandlung der Makrophagen mit Resveratrol. Ähnlich unerwartet war die Beobachtung einer reduzierten Viabilität der Wirtszellen im MTT-Test, in FACS-Analysen mit Propidiumiodid zur Diskriminierung lebender von toten Zellen sowie in mikroskopischen Aufnahmen. Diese zytotoxischen Effekte traten verstärkt mit zunehmender Konzentration von Resveratrol auf.

Auf der Suche nach dem Zusammenhang zwischen antileishmanieller Wirkung und gleichzeitig auftretenden zytotoxischen Effekten war die Untersuchung zum ROS-modulierenden Potential von Resveratrol ein wichtiger Ansatz. Dabei zeigte sich bei einer Inkubation der J774-G8-Makrophagen mit Resveratrol eine starke ROS-Induktion in den Zellen. Schon Konzentrationen von $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 21,9 \mu\text{M}$) verursachten eine deutliche ROS-Bildung, die mittels $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ -Fluoreszenz am Lichtmikroskop dokumentiert werden konnte. Die moderate antileishmanielle Aktivität lässt sich demnach unter Umständen auf das ROS-induzierende Potential zurückführen. Gleichzeitig können aber auch die zytotoxischen Effekte durch die verstärkte ROS-Bildung ausgelöst werden und damit pro-apoptotisch wirken.

Die Beobachtung der mit zunehmender Resveratrol-Konzentration verstärkten zytotoxischen Effekte führen auf der einen Seite zu der Erkenntnis, dass Resveratrol kein geeignetes antileishmaniell Agens darstellt. Auf der anderen Seite kann die Zytotoxizität eine geeignete Stoffeigenschaft und Voraussetzung

für die Behandlung von anderen sich auf dem Vormarsch befindlichen Krankheiten sein, wie z. B. Krebs. Demzufolge waren Untersuchungen zur antikarzinogenen Aktivität von Resveratrol unverzichtbar und stellen einen weiteren wesentlichen Aspekt dieser Arbeit dar.

Krebs hat sich zu einer weit verbreiteten Erkrankung unserer Zeit entwickelt. Auch hier ist die Forschung auf der Suche nach wirksamen und sicheren Arzneistoffen. Für Resveratrol ist in *in vitro*-Studien eine Vielzahl von Zelllinien untersucht worden. Dabei wurden die Hemmung der Karzinogenese und verschiedene Stadien in der Ätiologie von Krebs beschrieben. Nur wenige Studien legten jedoch den Focus auf die antikanzerogenen Eigenschaften von Resveratrol bei Lungenkrebs. Die A549-Zelllinie diente daher in der vorliegenden Arbeit als ein Modell, die chemoprotektiven bzw. antikanzerogenen Eigenschaften von Resveratrol zu untersuchen. Hierbei wurde auch der Zusammenhang zwischen der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und deren Auswirkung auf Krebszellen evaluiert. Resveratrol löste in der A549-Zelllinie in Konzentrationen $\geq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 65,7 \mu\text{M}$) den programmierten Zelltod aus. Die Resveratrol-induzierte Apoptose verlief dabei Caspase-abhängig, nachgewiesen durch Aktivierung der Caspase 3 sowohl in einem kolorimetrischen Assay als auch mittels Western Blot-Analyse. Eine Aktivierung der Caspase 8 konnte nicht aufgezeigt werden, was den extrinsischen Apoptoseweg als Hauptweg ausschließt. In Konzentrationen $\leq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 65,7 \mu\text{M}$) konnte hingegen keine Aktivierung der Caspase 3 nachgewiesen werden. Neben der Modulation der Caspase-Aktivität löste Resveratrol jedoch über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich ($5\text{-}45 \mu\text{g}/\text{mL} \cong 21,9\text{-}197,2 \mu\text{M}$) eine erhöhte ROS-Bildung in den Lungenkrebszellen aus. Die Apoptose-Induktion in A549-Zellen konnte trotz der ausgebliebenen erhöhten Caspase-Aktivität dennoch auch bei geringeren Resveratrol-Konzentrationen mittels einer fluoreszenzmikroskopischen Methode (Annexin-V/PI-Färbung) nachgewiesen werden. Dass eine Caspase 3-Aktivierung erst ab höheren Konzentrationen nachweisbar ist, die ROS-Bildung jedoch schon bei geringeren Konzentrationen neben morphologischen Veränderungen der Zellen zu belegen war, deutet auf konzentrationsabhängige Effekte bei der Behandlung mit Resveratrol hin. Auf jeden Fall ist die erhöhte ROS-Konzentration ein wichtiger Faktor sowohl bei der Caspase-unabhängigen als auch bei der Caspase-abhängigen Apoptose.

Neben Erkenntnissen über das Zusammenspiel zwischen einer erhöhten ROS-Konzentration und der Apoptose-Induktion konnte zudem die Herkunft der ROS-Spezies im verwendeten A549-Zellmodell geklärt werden. Dafür wurde die mitochondriale Atmungskette mit Rotenon blockiert, was sowohl die Apoptose-Induktion als auch die ROS-Bildung verminderte. Dies lässt den Schluss zu, dass Resveratrol in der Lage ist, die Produktion mitochondrialer ROS-Spezies zu erhöhen und darüber eine Apoptose-Induktion in A549-Zellen zu vermitteln.

Der Einsatz von Resveratrol als chemopräventives bzw. antikanzerogenes Agens erscheint nach Auswertung der *in vitro*-Experimente vergleichsweise sinnvoller als die antileishmanielle Eigenschaft im zuvor beschriebenen *in vitro*-Infektionsmodell. Die hier dokumentierten positiven Effekte sind jedoch aus *in vitro*-Studien abgeleitet worden. Diese vielversprechenden gesundheitsfördernden Effekte von Resveratrol sind demnach nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar und müssen durch entsprechende *in vivo*-Studien ergänzt werden. Denn es existieren im physiologischen Geschehen weit mehr zelluläre Mechanismen und Strategien, die in unterschiedlicher Weise voneinander abhängen und vielfältiger sind als die Gegebenheiten, die in der Zellkulturschale simulierbar sind. Zudem ist es dringend nötig, die in mehreren Studien beschriebene gute Verträglichkeit von Resveratrol als Chemotherapeutikum eindeutiger zu belegen. Schließlich zeigen die verschiedenen *in vivo*-Studien aufgrund unterschiedlicher Studien-Designs große interindividuelle Schwankungen innerhalb der einbezogenen Probanden- bzw. Patientengruppen. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die positiven Wirkungen und die Sicherheit von Resveratrol zu bestätigen, insbesondere dann, wenn hohe Dosen für einen längeren Zeitraum verabreicht werden sollen.

6. Summary

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene), a naturally occurring phytoalexin, can be found in various dietary and herbal sources such as mulberries and peanuts but is mainly produced in the skin of grapes. The hydroxystilbene is generated in plants in response to UV radiation, microbes, tissue destruction (e.g. by herbivores), and ozone impact. It is one of the most important polyphenolic substances for which a number of health-promoting properties were discovered. Resveratrol has been receiving increasing interest particularly because it is easily available with the diet. In fact, resveratrol-rich 'dietary' phytopharmacoins are suggested to exert beneficial pleiotropic health effects. These include antioxidant activity, radical-scavenging, modulation of metabolic processes (including lipid metabolism), vasorelaxation, chemopreventive, and anti-carcinogenic effects as well as estrogenic activity. However, there is only one meaningful study concerning its antiparasitic activity, especially in terms of its antileishmanial effects. In the present study, this particular activity was evaluated against *Leishmania major*-GFP with regard to the mode of action.

Leishmaniasis is an infectious disease that is mainly prevalent in tropical regions. But also in subtropical and temperate areas, such as the Mediterranean region and Asia, the number of cases is constantly rising. Due to increasing resistance to existing therapies and the dramatic propagation of the disease, there is an urgent need for the development of new drugs to secure sustainable treatment options in the future. Therefore it is important to acquire new target structures and substances that are safe and effective against the clinically relevant amastigote form of the parasite.

In this work resveratrol has been evaluated for its antileishmanial activity against *Leishmania major*-GFP using a broad range of methods (MTT assay, flow cytometric analysis i.e. FACS, microscopic investigations). The transfected parasites express a green fluorescent protein (GFP) that may be used as a parameter to discriminate living from dead pathogens. The FACS analysis showed only moderate activity against promastigotes in concentrations $\leq 35 \mu\text{g/mL}$ ($\cong \leq 153.2 \mu\text{M}$), but significant effects at concentrations $\geq 45 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 197.2 \mu\text{M}$). In addition, a concentration-dependent reduction of the GFP-signal was observed in infected macrophages (BMM Φ : IC₅₀ value was $9.9 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 43.6 \mu\text{M}$) and J774-G8: IC₅₀ value was $24.8 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 108.6 \mu\text{M}$)). Differences in the IC₅₀ values can be

explained by the different protocols to obtain the cell cultures and the resulting cell disparity.

Resveratrol unexpectedly diminished an important defence strategy of macrophages against intracellular pathogens, i.e. the production of NO. In addition, resveratrol showed only moderate direct NO-scavenging activity in cell-free (SNP) and cell-based assays, while Western blots indicated reduced expression levels of iNOS protein after treatment with resveratrol. Similarly surprising was the observation of a reduced viability of host cells as evident from MTT assay, FACS analysis using propidium iodide to discriminate between living and dead parasites as well as microscopic images. With increasing concentrations of resveratrol enhanced cytotoxic effects on host cells were evident.

To explain the antileishmanial effects associated with concurrent cytotoxic effects on host cells, the ROS-modulating potential of resveratrol was investigated. When incubating the J774-G8 macrophages with resveratrol, a strong induction of ROS production in the cells was detected. Even concentrations of 5 $\mu\text{g/ml}$ ($\cong 21.9 \mu\text{M}$) caused a significant ROS formation, as evidenced by a fluorescence staining method ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$). It is therefore reasonable that the moderate antileishmanial activity may be attributed, at least in part, to the ROS-inducing potential of resveratrol. Conversely, the cytotoxic effects can be due to increased ROS formation acting as pro-apoptotic modulators.

On the one hand, the concentration-dependent cytotoxic effects suggest that resveratrol is not a suitable antileishmanial agent. On the other hand, the cytotoxic potential may be useful for the treatment of other diseases on the rise such as cancer, provided tumour cells are selectively impaired. Consequently, studies on the anti-carcinogenic activity of resveratrol appeared essential and represent a further major piece of this work.

Cancer has become one of the most widespread diseases of our time. Again, screening for effective and safe drugs is more important than ever. A number of *in vitro* studies on resveratrol using a variety of cancer cell lines indicated positive effects. The inhibition of carcinogenesis at different stages of cancer has been documented. However, only few studies focussed on the anticancer properties of resveratrol in lung cancer. Therefore, the A549 cell line was used in the present study as a model to investigate the chemoprotective and anti-carcinogenic properties of resveratrol. In addition, the correlation between the formation of reactive oxygen species (ROS) and their impact on the development of cancer was

evaluated. Resveratrol induced programmed cell death in A549 cells at concentrations $\geq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 65.7 \mu\text{M}$). Apoptosis was associated with a significant increase of caspase 3 activity, evidenced by a colorimetric assay and Western blotting. It should be noted that the caspase 3 activity was only detectable at concentrations $\leq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($\cong 65.7 \mu\text{M}$). The activation of caspase 8 was missing even at the highest concentration used, which excludes the extrinsic apoptotic pathway as a major signalling route. Besides the modulation of caspase activity, resveratrol induced an increased ROS production in lung cancer cells over the concentration range of 5-45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\cong 21.9$ -197.2 μM). Although caspase activity appeared absent in low concentration ranges, the resveratrol-induced apoptosis in A549 cells could be demonstrated by a fluorescence-based microscopic method (Annexin-V/PI-Staining). This method provided independent support of ROS formation and morphological changes in treated cells. Accordingly, resveratrol-induced effects on A549 cells appeared to be strongly concentration-dependent. Increased ROS production is apparently an important factor for both the caspase-dependent and -independent apoptosis in either concentration range.

In addition to insights into the dependency of ROS production and induction of apoptosis, the origin of the ROS species was clarified in the A549 cell model. For this, the mitochondrial respiratory chain was blocked with rotenone, resulting in a decrease of ROS production and concurrent apoptosis. This suggests that resveratrol is able to increase the production of mitochondrial ROS species and acts as a pro-apoptotic agent by cell death induction in A549 cells.

The use of resveratrol as a chemopreventive or anti-carcinogenic agent appears therefore reasonable and is more promising than its use as an antileishmanial compound. However, the documented positive effects were obtained from *in vitro* studies. Clearly, these promising health-promoting effects of resveratrol cannot simply be transferred to humans. Additional clinical studies are necessary since complex cellular control mechanisms and signalling pathways are involved in the human body under physiological conditions. In addition, there is an urgent need to demonstrate that resveratrol is indeed well-tolerated, as commonly claimed. Finally, *in vivo* studies showed large inter-individual variability of treated probands or patient groups due to different study designs. Therefore, further studies are needed to confirm the positive effects and the safety of resveratrol *in vivo*, particularly when high dosages shall be administered for longer periods.

7. Literaturverzeichnis

- ADHAMI VM, AFAG F, AHMAD N (2003). Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF- κ B in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia* 5: 74-82.
- ALMEIDA L, VAZ-DA-SILVA M, FALCAO A, SOARES E, COSTA R, LOUREIRO AI, FERNANDES-LOPES C, ROCHA JF, NUNES T, WRIGHT L, SOARES-DA-SILVA P (2009). Pharmacokinetic and safety profile of *trans*-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*. 1: 7-15.
- ALMEIDA TF, PALMA LC, MENDEZ LC, NORONHA-DUTRA AA, VERAS PS (2012). *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunol*. 34: 492-498.
- ANCEREWICZ J, MIGLIAVACCA E, CARRUPT, PA, TESTA B, BRÉE F, ZINI R, TILLEMENT JP, LABIDALLE S, GUYOT D, CHAUVET-MONGES AM, CREVAT A, LE RIDANT A (1998). Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 25: 113-20.
- ASHBY J, TINWELL H, PENNIE W, BROOKS, AN, LEFEVRE PA, BERESFORD N, SUMPTER JP (1999). Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects. *J Appl Toxicol*. 19: 39-45.
- AUSTIN MB, BOWMAN ME, FERRER JL, SCHRÖDER J, NOEL JP (2004). An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chem Biol*. 11: 1179-1194.
- BASLY JP, MARRE-FOURNIER F, LE BAIL JC, HABRIOUX G, CHULIA AJ (2000). Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci*. 66: 769-777.
- BHAT KPL, KOSMEDER JW II, PEZZUTO JM (2001a). Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal*. 3: 1041-1064.
- BHAT KPL, LANTVIT D, CHRISTOV K, MEHTA RG, MOON RC, PEZZUTO JM (2001b). Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res*. 61: 7456-7463.
- BAUR JA, SINCLAIR DA (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev*. 5: 493-506.
- BAUR JA, PEARSON KJ, PRICE NL, JAMIESON HA ET AL. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444: 337-342.

- BEDARD K, KRAUSE KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87: 245-313.
- BERENS L, MARR JJ (1978). An easily prepared defined medium for cultivation of *Leishmania donovani* promastigotes. *J Parasitol.* 64: 160.
- BERTELLI AA, GIOVANNINI L, GIANNESI D, MIGLIORI M, BERNINI W, FREGONI M, BERTELLI A (1995). Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React.* 17: 1-3.
- BLOIS MS (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 26: 1199-1200.
- BODE AM, DONG Z (2004). Targeting signal transduction pathways by chemopreventive agents. *Mutat Res.* 555: 33-51.
- BOGDAN C, RÖLLINGHOFF M, DIEFENBACH A (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol.* 12: 64-76.
- BOLHASSANI A, TAHERI T, TASLIMI Y, ZAMANILUI S, ZAHEDIFARD F, SEYED N, TORKASHVAND F, VAZIRI B, RAFATI S (2011). Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. *Exp Parasitol.* 127: 637-645.
- BOOCOCK DJ, FAUST GE, PATEL KR, SCHINAS AM, BROWN VA, DUCHARME MP, BOOTH TD, CROWELL JA, PERLOFF M, GESCHER AJ, STEWARD WP, BRENNER DE (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16: 1246-1252.
- BOWERS JL, TYULMENKOV VV, JERNIGAN SC, KLINGE CM (2000). Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 141: 3657-3667.
- BRADLEY MO, ERICKSON LC (1981). Comparison of the effects of hydrogen peroxide and X-ray irradiation on toxicity, mutation, and DNA damage/repair in mammalian cells (V-79). *Biochim Biophys Acta.* 654: 135-141.
- BROWN VA, PATEL KR, VISKADURAKI M, CROWELL JA ET AL. (2010). Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res.* 70: 9003-9011.

- BURKITT MJ, DUNCAN J (2000). Effects of *trans*-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.* 381: 253-263.
- BUSQUETS S, AMETLLER E, FUSTER G, OLIVAN M, RAAB V, ARGILÉS JM, LÓPEZ-SORIANO FJ (2007). Resveratrol, a natural diphenol, reduces, metastatic growth in an experimental cancer model. *Cancer Lett.* 245: 144-148.
- BUTTERY LD, EVANS TJ, SPRINGALL DR, CARPENTER A, COHEN J, POLAK JM (1994). Immunochemical localization of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-treated rats. *Lab Invest.* 71: 755-764.
- CAI H, HARRISON DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87: 840-844.
- CARVALHO EM, BACELLAR O, BROWNELL C, REGIS T, COFFMAN RL, REED SG (1994). Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 152: 5949-5956.
- CHANTRET I, BARBAT A, DUSSAULX E, BRATTAIN MG, ZWEIBAUM A (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res.* 48: 1936-1942
- CÍZ M, PAVELKOVÁ M, GALLOVÁ L, KRÁLOVÁ J, KUBALA L, LOJEK A (2008). The influence of wine polyphenols on reactive oxygen and nitrogen species production by murine macrophages RAW 264.7. *Physiol Res.* 57: 393-402.
- CENTENO-BAEZ C, DALLAIRE P, MATRETTE A (2011). Resveratrol inhibition of inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle involves AMPK but not SIRT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301: E922-E930.
- CERQUEIRA AM, KHAPER N, LEES SJ, ULANOVA M (2013). The antioxidant resveratrol down-regulates inflammation in an in-vitro model of *Pseudomonas aeruginosa* infection of lung epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 91: 248-255.
- CHAN MM (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol.* 63: 99-104.
- COOKE MS, EVANS MD, DIZDAROGLU M, LUNEC J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17: 1195-1214.
- COTTART CH, NIVET-ANTOINE V, BEAUDEUX JL (2013). Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol Nutr Food Res.* doi: 10.1002/mnfr.201200589 [Epub ahead of print]

- CROWELL JA, KORYTKO PJ, MORRISSEY RL, BOOTH TD, LEVINE BS (2004). Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci.* 82: 614-619.
- CURRIE GA, BASHAM C (1978). Differential arginine dependence and the selective cytotoxic effects of activated macrophages for malignant cells *in vitro*. *Br J Cancer.* 38: 653-659.
- DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVÁ E, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN BREUSEGEM F (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 57: 779-795.
- DAUBRAWA M (2009). Aktivierung eines neuartigen Apoptose-Signalweges durch den Proteinkinaseinhibitor Staurosporin. *Dissertationsschrift*, Universität Hohenheim.
- DAVIS AJ, KEDZIERSKI L (2005). Recent advantages in antileishmanial drug development. *Curr Opin Invest Drugs.* 6: 163-169.
- DELMAS D, LANCON A, COLIN D, JANNIN B, LATRUFFE N (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting against cancer. *Curr Drug Targets.* 7: 423-442.
- DI MAMBRO VM, AZZOLINI AE, VALIM YM, FONSECA MJ (2003). Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *Int J Pharm.* 262: 93-99.
- DOCHERTY JJ, FU MM, STIFFLER BS, LIMPEROS RJ, POKABLA CM, DELUCIA AL (1999). Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* 43: 145-155.
- DKFZ 2002 - Wissenschaftlicher Ergebnisbericht 2000/2001 Forschungsschwerpunkt C, Krebsrisikofaktoren und Krebsprävention S. 109-162.
- EDWARDS JA, BECK M, RIEGGER C, BAUSCH J (2011). Safety of resveratrol with examples for high purity, *trans*-resveratrol, resVida®. *Ann N Y Acad Sci.* 1215: 131-137.
- EMERIT I (1994). Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 16: 99-109.
- FALCHETTI R, FUGGETTA MP, LANZILLI G, TRICARICO M, RAVAGNAN G (2001). Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci.* 70: 81-96.

- FAN E, JIANG S, ZHANG L, BAI Y (2008). Molecular mechanism of apoptosis induction by resveratrol, a natural cancer chemopreventive agent. *Int J Vitam Nutr Res.* 78: 3-8.
- FEINENDEGEN LE (2002). Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol.* 21: 85-90.
- FENG YH, ZHOU WL, WU QL, LI XY, ZHAO WM, ZOU JP (2002). Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. *Acta Pharmacol Sin.* 23: 893-897.
- FESTJENS N, VANDEN BERGHE T, VANDENABEELE P (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 1757: 1371-1387.
- FINKEL TH, PABST MJ, SUZUKI H, GUTHRIE LA, FOREHAND JR, PHILLIPS WA, JOHNSON RICHARD B JR. (1987). Priming of neutrophils and macrophages for enhanced release of superoxide anion by the calcium ionophore ionomycin. *J Biol Chem.* 262: 12589-12596.
- FRANCO R, CIDLOWSKI JA (2006). SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 281: 29542-29557.
- FRANKEL EN, KANNER J, GERMAN JB, PARKS E, KINSELLA JE (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 341: 454-457.
- FRUEHAUF JP, MEYSKENS FL JR. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res.* 13: 789-794.
- FULDA S, DEBATIN KM (2006). Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: A mini-review. *Cancer Detect Prev.* 30: 217-223.
- FÜßER MARKUS (2010). Einfluss von Resveratrol auf oxidative DNA-Schäden und Mutagenese *in vivo*. *Dissertationsschrift*, Universität Mainz.
- GAO X, XU YX, JANAKIRAMAN N, CHAPMAN RA, GAUTAM SC (2001). Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol.* 62: 1299-1308.
- GAO X, DEEB D, MEDIA J, DIVINE G, JIANG H, CHAPMAN RA, GAUTAM SC (2003). Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant *in vitro* and *in vivo* immunological effects. *Biochem Pharmacol.* 66: 2427-2435.

- GATSON JW, ABDELFAHATTAH K, WIGGINTON JG, SMITH S, WOLF S, MINEI JP (2013). Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury). *J Trauma Acute Care Surg.* 74: 470-474.
- GEHM BD, MC ANDREWS JM, CHIEN PY, JAMESON JL (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 94: 14138-14143.
- GERTZ M, NGUYEN GT, FISCHER F, SUENKEL B, SCHLICKE C, FRÄNZEL B, TOMASCHESKI J, ALADINI F, BECKER C, WOLTERS D, STEEGBORN C (2012). A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One.* 7: e49761. doi: 10.1371/journal.pone.0049761.
- GESCHER AJ, STEWARD WP (2003). Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12: 953-957.
- GHANIM H, SIA CL, KORZENIEWSKI K, LOHANO T ET AL. (2011). A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal. *J Clin Endocrinol Metab.* 96: 1409-1414.
- GIEMSA G (1902). Färbemethoden für Malariaparasiten. *Zentralbl. f. Bakt.,* Bd. XXXI.
- GIEMSA G (1904). Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Zentralbl. f. Bakt.,* I Abteilung 32: 307-313.
- GOLDBERG DM, YAN J, SOLEAS GJ (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem.* 36: 79-87.
- GRANADOS-SOTO V, ARGÜELLES CF, ORTIZ MI (2002). The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacology.* 43: 917-923.
- GRIESS P (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der H. N. Weselsky und Benedikt 'Über einige Azoverbindungen'. *Ber dt chem Ges.* 12: 426-428.
- GREEN SJ, MELZER MS, HIBBS JB, JR, NCY CA (1990). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol.* 144: 278-283.
- GREEN DR, REED JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.

- GUHA P, DEY A, DHYANI MV, SEN R, CHATTERJEE M, CHATTOPADHYAY S, BANDYOPADHYAY SK (2010). Calpain and caspase orchestrated death signal to accomplish apoptosis induced by resveratrol and its novel analog hydroxystilbene-1 in cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 334: 381-394.
- GUHA P, DEY A, SEN R, CHATTERJEE M, CHATTOPADHYAY S, BANDYOPADHYAY SK (2011). Intracellular GSH depletion triggered mitochondrial Bax translocation to accomplish resveratrol-induced apoptosis in the U937 cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 336: 206-14.
- GULLETT NP, RUHUL AMIN ARM, BAYRAKTAR S, PEZZUTO JM, SHIN DM, KHURI FR, AGGARWAL BB, SURH Y-J, KUCUK O (2010). Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol.* 37: 258-281.
- GUSMAN J, MALONNE H, ATASSI G (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis.* 22: 1111-1117.
- GÜLÇİN I (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.* 86: 345-391.
- HA DS, SCHWARZ JK, TURCO SJ, BEVERLY SM (1996). Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 77: 57-64.
- HALICKA HD, ZHAO H, LI J, LEE YS, HSIEH TC, WU JM, DARZYNKIEWICZ Z (2012). Potential anti-aging agents suppress the level of constitutive mTOR- and DNA damage- signaling. *Aging (Albany)* 4: 952-965.
- HALLIWELL B, WHITEMAN M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142: 231-255.
- HANDMAN E (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* 14: 229-243.
- HANSEN MB, NIELSEN SE, BERG K (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 119: 203-210.
- HAMMOND CL, MADEJCZYK MS, BALLATORI (2004). Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 195: 12-22.
- HANDMAN E (2001). Leishmaniasis: current state of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.* 14: 229-243.

- HARIKUMAR KB, AGGARWAL BB (2008). Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*. 15: 1020-1035.
- HENDERSON LM, CHAPPEL JB (1996). NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 1273: 87-107.
- HOFFMANN ME, MENEGHINI R (1979). Action of hydrogen peroxide on human fibroblast in culture. *Phytochem Photobiol*. 30: 151-155.
- HONDA T, COPPOLA S, GHIBELLI L, CHO SH, KAGAWA S, SPURGERS KB, BRISBAY SM, ROTH JA, MEYN RE, FANG B ET AL. (2004). GSH depletion enhances adenoviral bax-induced apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Gene Ther*. 11: 249-255.
- HOWELLS LM, BERRY DP, ELLIOTT PJ, JACOBSON EW ET AL. (2011). Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases-safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev Res*. 4: 1419-1425.
- HOWITZ KT, BITTERMAN KJ, COHEN HY, LAMMING DW, LAVU S, WOOD JG, ZIPKIN RE, CHUNG P, KISIELEWSKI A, ZHANG LL, SCHERER B, SINCLAIR DA (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 425: 191-196.
- HUNG LM, SU MJ, CHU WK, CHIAO CW, CHAN WF, CHEN JK (2002). The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *Br J Pharmacol*. 135: 1627-33.
- IDE T, TSUTSUI H, KINUGAWA S, UTSUMI H, KANG D, HATTORI N, UCHIDA K, ARIMURA KI, EGASHIRA K, TAKESHITA A (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 85: 357-363.
- IGNATOWICZ E, BAER-DUBOWSKA W (2001). Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol J Pharmacol*. 53: 557-69.
- IMLAY JA, CHIN SM, LINN S (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*. 240: 640-642.
- JANG M, CAI L, UDEANI GO, SLOWING KV, THOMAS CF, BEECHER CW, FONG HH, FARNSWORTH NR, KINGHORN AD, MEHTA RG, MOON RC, PEZZUTO JM (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-20.
- JANG M, PEZZUTO JM (1999). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp. Clin. Res*. 25: 65-77.

- JANG DS, KANG BS, RYU SY, CHANG IM, MIN KR, KIM Y (1999). Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem Pharmacol.* 57: 705-712.
- JEANDET P, BESSIS R AND BERNARD GAUTHERON (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 41-46.
- JOE AK, LIU H, SUZUI M, VURAL ME, XIAO D, WEINSTEIN IB (2002). Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 8: 893-903.
- JUAN ME, VINARDELL MP, PLANAS JM (2002). The daily oral administration of high doses of *trans*-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr.* 132: 257-60.
- KEDZIERSKI L, MONTGOMERY J, BULLEN D, CURTIS JM, GARDINER E, JIMENEZ-RUIZ A, HANDMAN E (2004). A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J Immunol.* 172: 4902-4906.
- KEDZIERSKI L, CURTIS JM, KAMINSKA M, JODYNIS-LIEBERT J, MURIAS M (2007). *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Res.* 120: 91-97.
- KEDZIERSKI L, SAKTHIANANDESWAREN A, CURTIS JM, ANDREWS PC, JUNK PC, KEDZIERSKA K (2009). Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr Med Chem.* 16: 599-614.
- KEEDWELL RG, ZHAO Y, HAMMOND LA, WEN K, QIN S, ATANGAN LI, SHURLAND DL, WALLACE DM, BIRD R, REITMAIR A, CHANDRARATNA RA, BROWN G (2004). An antagonist of retinoic acid receptors more effectively inhibits growth of human prostate cancer cells than normal prostate epithelium. *Br J Cancer.* 91: 580-588.
- KHANDUJA KL, BHARDWAJ A, KAUSHIK (2004). Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice. *J Nutr Sci Vitamino (Tokyo).* 50: 61-65.
- KIDERLEN AF, KAYE PM (1990). A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxicity against *Leishmania* parasites. *J Immunol Methods.* 127: 11-18.
- KIDERLEN AF, KAYSER O, FERREIRA D, KOLODZIEJ H (2001). Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages *in vitro*. *Z Naturforsch C.* 56: 444-454.

- KIM T, SUH ES (2012). Retinal protective effects of resveratrol via modulation of nitric oxide synthase on oxygen-induced retinopathy. *Korean J Ophthalmol.* 24: 108-118.
- KIMURA Y, OKUDA H, ARICHI S (1995). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta.* 837: 209-212.
- KIRKLAND RA, FRANKLIN JL (2007). Bax affects production of reactive oxygen by the mitochondria of non-apoptotic neurons. *Exp Neurol.* 204:458-461.
- KLEINE-GUNK, B (2006). Resveratrol – ein Polyphenol mit vielfältigen Wirkungen. *FRAUENARZT.* 47: 1114-1118.
- KLEINE-GUNK, B (2007). Schlüssel für ein langes Leben? *Pharmazeutische Zeitung* 29/2007.
- KOHNEN S, FRANCK T, VAN ANTWERPEN P, BOUDJELTIA KZ ET AL. (2007). Resveratrol inhibits the activity of equine neutrophil myeloperoxidase by a direct interaction with the enzyme. *J Agric Food Chem.* 55: 8080-8087.
- KOŁODZIEJ H, KAYSER O, KIDERLEN AF ITO H, HATANO T, YOSHIDA T, FOO LY (2001). Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha-release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biol Pharm Bull.* 24: 1016-1021.
- KOŁODZIEJ H, KIDERLEN AF (2005). Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitized RAW 264.7 cells. *Phytochemistry.* 66: 2056-2071.
- KOOPMAN G, REUTELINGSPERGER CP, KUIJTEN GA, KEEHNEN RM, PALS ST, VAN OERS MH (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 84: 1415-1420.
- KOPROWSKI H, ZHENG YM, HEBER-KATZ E, FRASER N, RORKE L, FU ZF, HANLON C, DIETZSCHOLD B (1993). *In vivo* expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 3024-3027.
- KRAM D, THÄLE C, KOŁODZIEJ H, KIDERLEN AF (2008). Intracellular parasite kill: Flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between antileishmanial activity and macrophage activation. *J Immunol Methods.* 333: 79-88.
- KRAM D (2008). Etablierung eines *in vitro*-Testsystems zur Untersuchung von Naturstoffen auf antileishmanielle Effekte. *Dissertationsschrift*, Berlin.

- KULSHRESTHA A, SINGH R, KUMAR D, NEGI NS, SALOTRA P (2011). Antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* are susceptible to paromomycin and sitamaquine. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 2916-2921.
- KURIN E, MUČAJI P, NAGY M (2012). *In vitro* antioxidant activities of three red wine polyphenols and their mixtures: an interaction study. *Molecules.* 17: 14336-14348.
- LAEMMLI UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- LAKSHMINARASIMHAN M, RAUH D, SCHUTKOWSKI M, STEEBORN C (2013). Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. *Aging (Albany NY).* 5: 151-154.
- LANGCAKE P, PRYCE RJ (1977) The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry.* 16: 1193-1196.
- DE LA LASTRA CA, VILLEGAS I (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* 35: 1156-1160.
- LEBEL CP, ISCHIROPOULOS H, BONDY SC (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 5: 227-231.
- LEIRO J, CANO E, UBEIRA FM, ORALLO F, SANMARTÍN ML (2004). *In vitro* effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2497-2501.
- LEMESRE JL, SERENO D, DAULOUÈDE S, VEYRET B, BRAJON N, VINCENDEAU P (1997). *Leishmania spp.*: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote form. *Exp Parasitol.* 86: 58-68.
- LEONARD SS, XIA C, JIANG BH, STINEFELT B, KLANDORF H, HARRIS GK, SHI X (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 309: 1017-1026.
- LEWIS JG, ADAMS DO (1987). Inflammation, oxidative DNA damage, and carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 76: 19-27.
- LIEW FY, MILLOTT S, PARKINSON C, PALMER RMJ, MONCADA S (1990). Macrophage killing of *leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol.* 144: 4794-4797.

- LODGE R, DESCOTEAUX A (2006). Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *Eur J Immunol.* 36: 2735-2744.
- LOW IC, CHEN ZX, PERVAIZ S (2010). Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signal.* 13: 807-819.
- LUCAS IK, KOLODZIEJ H (2013). *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol originates from its cytotoxic potential against host cells. *Planta Med.* 79: 20-26.
- LUO H, YANG A, SCHULTE BA, WARGOVICH MJ, WANG GY (2013) Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. *PLoS ONE* 8(3): e60065. doi: 10.1371/journal.pone.0060065.
- MA ZH, MA QY, WANG LC, SHA HC, WU SL, ZHANG M (2005). Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res.* 54: 522-527.
- MARIER JF, VACHON P, GRITSAS A, ZHANG J, MOREAU JP, DUCHARME MP (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 369-373.
- MARTIN SJ, REUTELINGSPERGER CP, MCGAHON AJ, RADER JA, VAN SCHIE RC, LAFACE DM, GREEN DR (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182: 1545-1556.
- MARTINEZ FO, HELMING L, GORDON S (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 27: 451-483.
- MARXEN K, VANSELOW KH, LIPPEMEIER S, HINTZE R, RUSER A, HANSEN U-P (2007). Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors.* 7: 2080-2095.
- MCCORD JM, FRIDOVICH I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244: 6049-6055.
- MEISTER A, ANDERSON ME (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 52: 711-60.

- MENG XL, YANG JY, CHEN GL, WANG LH, ZHANG LJ, WANG S, LI J, WU CF (2008). Effects of resveratrol and its derivatives on lipopolysaccharide-induced microglial activation and their structure-activity relationships. *Chem Biol Interact.* 174: 51-59.
- MIKI H, UEHARA N, KIMURA A, SASAKI T, YURI T, YOSHIZAWA K, TSUBURA A (2012). Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 40: 1020-1028.
- MIRALLES GD, STOECKLE MY, MCDERMOTT DF, FINKELMAN FD, MURRAY HW (1994). Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 62: 1058-63.
- MIURA D, MIURA Y, YAGASAKI K (2003). Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci.* 73: 1393-1400.
- MIURA D, MIURA Y, YAGASAKI K (2004). Resveratrol inhibits hepatoma cell invasion by suppressing gene expression of hepatocyte growth factor via its reactive oxygen species-scavenging property. *Clin Exp Metastasis.* 21: 445-451.
- MIZUTANI K, IKEDA K, KAWAI Y, YAMORI Y (2000). Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol. (Tokyo)* 46: 78-83.
- MOHAN J, GANDHI AA, BHAVYA BC, RASHMI R, KARUNAGARAN D, INDU R, SANTHOSHKUMAR TR (2006). Caspase-2 triggers Bax-Bak-dependent and -independent cell death in colon cancer cells treated with resveratrol. *J Biol Chem.* 281: 17599-17611.
- MODELELL M, CORRALIZA IM, SOLER G, EICHMANN K (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by Th1 and Th2 cytokines. *Eur J Immunol.* 25: 1101-1104.
- MOHAR DS, MALIK S (2012). The sirtuin system: The holy grail of resveratrol? *J Clin Exp Cardiol.* 3: 216.
- MONTSKO G, POUR NIKFARDIJAM MS, SZABO Z, BODDI K, LORAND T, OHMACHT R, MARK L (2008). Determination of products derived from *trans*-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC-APCI-MS. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 196: 44-50.
- MOSMANN TJ (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63.

- MUNDER M, EICHMANN K, MODOLELL M (1998). Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol.* 160: 5347-5354.
- MUNIZ-JUNQUEIRA MI, DE PAULA-COELHO VN (2008). Meglumine antimonite directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. *Int Immunopharmacol.* 8:1633-1638.
- MURAKAMI A (2013). Modulation of protein quality control systems by food phytochemicals. *J Clin Biochem Nutr.* 52: 215-227.
- MURRAY HW, JUANGBHANICH CW, NATHAN CF, COHN ZA (1979). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J Exp Med.* 150: 950-64.
- MURRAY HW, CARTELLI DM (1983). Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest.* 72: 32-44.
- MURRAY HW, NATHAN CF (1999). Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med.* 189: 741-746.
- NACY CA, DIGGS CL (1981). Intracellular replication of *Leishmania tropica* in mouse peritoneal macrophages: comparison of amastigote replication in adherent and nonadherent macrophages. *Infect Immun.* 34: 310-313.
- NADERER T, MCCONVILLE MJ (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 10: 301-308.
- NAKATA R, TAKAHASHI S, INOUE H (2012). Recent advances in the study on resveratrol. *Biol Pharm Bull.* 35: 273-279.
- NGUYEN T, BRUNSON D, CRESPI CL, PENMAN BW, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89: 3030-3034.
- NUNES T, ALMEIDA L, ROCHA JF, FALCÃO A, FERNANDES-LOPES C, LOUREIRO AI, WRIGHT L, VAZ-DA-SILVA M, SOARES-DA-SILVA P (2009). Pharmacokinetics of *trans*-resveratrol following repeated administration in healthy elderly and young subjects. *J Clin Pharmacol.* 49:1477-82.

- OLIVE PL (2004). Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol.* 75:355-373.
- OTT M, GOGVADZE V, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 12: 913-922.
- ORTUÑO J, COVAS MI, FARRE M, PUJADAS M, FITO M, KHYMENETS O, ANDRES-LACUEVA C, ROSET P, JOGLAR J, RM L-R (2010). Matrix effects on the bioavailability of resveratrol in humans. *Food Chem.* 120: 1123-1130.
- PACE-ASCIAC CR, ROUNOVA O, HAHN SE, DIAMANDIS EP, GOLDBERG DM (1996). Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta.* 246: 163-182.
- PASTORKOVA E, ZAKOVA T, LANDA P, NOVAKOVA J, VADLEIJCH J, KOKOSKA L (2013). Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 161: 209-213.
- PATEL KR, BROWN VA, JONES DJ, BRITTON RG ET AL. (2010). Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 70: 7392-7399.
- PEARCE VP, SHERRELL J, LOU Z, KOPELOVICH L, WRIGHT WE, SHAY JW (2008). Immortalization of epithelial progenitor cells mediated by resveratrol. *Oncogene* 27: 2365-2374.
- PERVAIZ S (2004). Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Updat.* 7: 333-344.
- PETIT PX, SUSIN SA, ZAMZAMI N, MIGNOTTE B, KROEMER G (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.* 396: 7-13.
- PIVER B, BERTHOU F, DREANO Y, LUCAS D (2001). Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol Lett.* 125 (1-3): 83-91.
- LA PORTE C, VODUC N, ZHANG G, SEGUIN I ET AL. (2010). Steady-state pharmacokinetics and tolerability of *trans*-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. *Clin Pharmacokinet.* 49: 449-454.
- POZO-GUISADO E, MERINO JM, MULERO-NAVARRO S, LORENZO-BENAYAS MJ ET AL. (2005). Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int J Cancer.* 115: 74-84.

- QURESHI AA, GUAN XQ, REIS JC, PAPASIAN CJ, JABRE S, MORRISON DC, QURESHI N (2012). Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor. *Lipids Health Dis.* 11: 76. doi: 10.1186/1476-511X-11-76.
- RAKICI O, KIZILTEPE U, COSKUN B, ASLAMACI S, AKAR F (2005). Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *Int J Cardiol.* 105: 209-215.
- REED DJ (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30: 603-631.
- REGEV-SHOSHANI G, SHOSEYOV O, BILKIS I, KEREM Z (2003). Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem J.* 374: 157-163.
- REGEV-SHOSHANI G, SHOSEYOV O, KEREM Z (2004). Influence of lipophilicity on the interactions of hydroxy stilbenes with cytochrome P450 3A4. *Biochem Biophys Res Commun.* 323: 668-673.
- REILE H (1991). Entwicklung von Testkonzepten zur Untersuchung der Wirkung isomerer 1,2-Bis(fluorphenyl)ethylen-diaminplatin(II) Komplexe am menschlichen Mamma- und Ovariakarzinom, *Dissertationsschrift, Universität Regensburg.*
- RENAUD, S, DE LORGERIL, M. WINE (1992). Alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 339: 1523-1526.
- RICHARD JL (1987). Coronary risk factors. The French paradox. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 80: 17-21.
- ROBERTS LJ, HANDMAN E, FOOTE SJ (2000). Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ.* 321: 801-804.
- ROGAKOU EP, PILCH DR, ORR AH, IVANOVA VS, BONNER WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 273: 5858-5868.
- ROY S, NICHOLSON DW (2000). Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med.* 192: F21-F25.
- ROY S, SANNIGRAHI S, MAJUMDAR S, GHOSH B, SARKAR B (2011). Resveratrol regulates antioxidant status, inhibits cytokine expression and restricts apoptosis in carbon tetrachloride induced rat hepatic injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2011: 703676doi: 10.1155/2011/703676.

- RUPPRICH N, KINDL H (1978). Stilbene synthases and stilbenecarboxylate synthases, Enzymatic syntheses of 3,5,4-trihydroxystilbene from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 359: 165-172.
- DE SANTI C, PIETRABISSA A, MOSCA F, PACIFICI GM (2000a). Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica.* 30: 1047-1054.
- DE SANTI C, PIETRABISSA A, SPISNI R, MOSCA F, PACIFICI GM (2000b). Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavanoids. *Xenobiotica.* 30: 857-866.
- SACKS D, NOBEN-TRAUTH N (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2: 845-858.
- SARASTE A (1999). Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz.* 24: 189-195.
- SCHÄFER, ANGELIKA INGRID (2007). Effekte von Bestandteilen und Metaboliten eines Rindenextraktes von *Pinus maritime* (Pycnogenol®) auf pathophysiologische Aspekte des metabolischen Syndroms. *Dissertationsschrift, Universität Würzburg.*
- SCHNITTMAN S, LANE HC, WITEBSKY FG, GOSEY LL, HOGGAN MD, FAUCI AS (1988). Host defense against *Mycobacterium-avium* complex. *J Clin Immunol.* 8: 234-243
- SCHMANDKE H (2002). Resveratrol und Piceid in Weintrauben und Erdnüssen sowie daraus hergestellte Produkte. *Ernährungs-Umschau.* 49: 349-352.
- SHERMAN MP, LEHRER RI (1985). Oxidative metabolism of neonatal and adult rabbit lung macrophages stimulated with opsonized group B streptococci. *Infect Immun.* 47: 26-30.
- SEN CK, ROY S (2001). Redox control of caspases. *Environ Toxicol Pharmacol.* 10: 215-220.
- SIGNORELLI P, GHIDONI R (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem.* 16: 449-466.
- SIMON HU, HAJ-YEHIA A, LEVI-SCHAFFER F (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 5: 415-418.
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85.

- SOELL M, LETT E, HOLYECK F *ET AL.* (1995). Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan binding protein inhibits TNF- α release. *J Immunol.* 154: 851-860.
- STENNICKE HR, JÜRGENSMEIER JM, SHIN H, DEVERAUX Q, WOLF BB, YANG X, ZHOU Q, ELLERBY HM, BREDENSEN D, GREEN DR, REED JC, FROELICH CJ, SALVESEN GS (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem.* 273: 27084-27090.
- STUEHR DJ, KWON NS, NATHAN CF, GRIFFITH OW, FELDMAN PL, WISEMAN J (1991). N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem.* 266: 6259-6263.
- SUBBARAMAIAH K, CHUNG WJ, MICHALUART P, TELANG N, TANABE T, INOUE H, JANG M, PEZZUTO JM, DANNENBERG AJ (1998). Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 273: 21875-21882.
- SUEISHI Y, HORI M (2013). Nitric oxide scavenging rates of solubilised resveratrol and flavanoids. *Nitric Oxide.* 29: 25-29; doi: 10.1016/j.niox.2012.12.002. Epub 2012 Dec 11.
- SUKALA KB, KATTA VK, GOTTUMUKKALA VS (2005). Estimation of *trans*-resveratrol in herbal extracts and dosage forms by high-performance thin-layer chromatography. *Chem Pharm Bull.* 53: 691-693.
- SUNDAR S, CHATTERJEE M (2006). Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res.* 123: 345-352.
- SURH YJ, HURH YJ, KANG JY, LEE E, KONG G, AND LEE SJ (1999). Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett.* 140: 1-10.
- SURH YJ (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 3: 768-780.
- S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) in Zusammenarbeit mit der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG) und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (2010): Diagnostik und Therapie der kutanen und mukokutanen Leishmaniasis in Deutschland. AWMF-Register Nr. 042/007.
- S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG, 2012): Diagnostik und Therapie der viszeralen Leishmaniasis in Deutschland (Kala Azar). AWMF-Register Nr. 042/004.

- TADOLINI B, JULIANO C, FRANCONI F, CABRINI L (2000). Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 33: 105-114.
- TAKAOKA MJ (1940). Of the polyphenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.). *J Faculty Sci.* 3: 1-16.
- TIMMERS S, KONINGS E, BILET L, HOUTKOOPER RH ET AL. (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* 14: 612-622.
- TIMMERS S, AUWERX J, SCHRAUWEN P (2012). The journey of resveratrol from Yeast to human. *Aging.* 4: 146-158.
- TOMÉ-CARNEIRO J, LARROSA M, YÁÑEZ-GASCÓN MJ, DÁVALOS A, GIL-ZAMORANO J, GONZÁLVIZ M, GARCÍA-ALMAGRO FJ, RUIZ ROS JA, TOMÁS-BARBERÁN FA, ESPÍN JC, GARCÍA-CONESA MT (2013). One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res.* 72: 69-82.
- TORRES-LÓPEZ JE, ORTIZ MI, CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ G, ALONSO-LÓPEZ R, ASOMOZA-ESPINOSA R, GRANADOS-SOTO V (2002). Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci.* 70: 1669-1676.
- TSAI SH, LIN-SHIAU SY, LIN JK (1999). Suppression of nitric oxide synthase, and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol.* 126: 673-680.
- TSAN MF, WHITE JE, MAHESHWARI JG, BREMNER TA, AND SACCO J (2000). Resveratrol induces Fas signaling-independent apoptosis in THP-1 human monocytic leukemia cells. *Br J Haematol.* 109: 405-412.
- ULRICH S, WOLTER F, STEIN JM (2005). Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 49: 452-461.
- UPHOFF CC, DREXLER HG (2002). Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 38: 79-85.
- VALENZANO DR, TERZIBASI E, GENADE T, CATTANEO A, DOMENICI L, CELLERINO A (2006). Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol.* 16: 296-300.

- VAN ASSCHE T, DESCHACHT M, DA LUZ RA, MAES L, COS P (2011). *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 51: 337-351.
- VANG O, AHMAD N, BAILE CA, BAUR JA, BROWN K ET AL. (2011). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS ONE* 6: 1-11.
- VICINELLI V, CERONI P, MAESTRI M, LAZZARI M, BALZANI V, LEE SK, VAN HEYST J, VÖGTLE F (2004). Photochemical and photophysical properties of a poly(propylene amine) dendrimer functionalised with E-stilbene units. *Org Biomol Chem.* 2: 2207-2213.
- VITAGLIONE P, SFORZA S, GALAVERNA G, GHIDINI C, CAPORASO N, VESCOVI PP, FOGLIANO V, MARCHELLI R (2005). Bioavailability of *trans*-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res.* 49: 495-504.
- WADSWORTH TL, KOOP DR (1999). Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol.* 57: 941-949.
- WALLE T, HSIEH F, DELEGGE MH, OATIS JE JR, WALLE UK (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 32: 1377-1382.
- WALLERATH T, DECKERT G, TERNE T, ANDERSON H, LI H, WITTE K, FÖRSTERMANN U (2002). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 106: 1652-1658.
- WANG D, HANG T, WU C, LIU W (2005). Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 829: 97-106.
- WANG L, LIU X, WU Y, WU W, WU Y (2010). Involvement of ROS in the inhibitory effect of thermotherapy combined with chemotherapy on A549 human lung adenocarcinoma cell growth through the Akt pathway. *Oncol Rep.* 28: 1369-1375.
- WANG S, QIAN Y, GONG D, ZHANG Y, FAN Y (2011). Resveratrol attenuates acute hypoxic injury in cardiomyocytes: Correlation with inhibition of iNOS - NO signalling pathway. *Eur J Pharm Sci.* 44: 416-421.
- WEI XQ, CHARLES I, SMITH A, URE J, FNG GJ, HUANG FP, XU D, MULLER W, MONCADA S, LIEW FY (1995). Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 375: 408-411.

- WENZEL E, SOLDI T, ERBERSDOBLER H, SOMOZA V (2005). Bioactivity and metabolism of *trans*-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol Nutr Food Res.* 49: 482-494.
- WONDRAK GT (2009). Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 11: 3013-3069.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010): Control of the leishmaniasis. *WHO technical report series* No. 949, WHO, Genf.
- WRIGHT SD, RAMOS RA, TOBIAS PS ET AL. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 249: 1431-1433.
- YAN N, SHI Y (2003). Histone H1.2 as a trigger for apoptosis. *Nat Struct Biol.* 10: 983-985.
- YOON K, PELLARONI L, RAMAMOORTHY K, GAIDO K, SAFE S (2000). Ligand structure-dependent differences in activation of estrogen receptor alpha in human HepG2 liver and U2 osteogenic cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 162: 211-220.
- YU SM, WU JF, LIN TL, KUO SC (1997). Inhibition of nitric oxide synthase expression by PPM-18, a novel anti-inflammatory agent, *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J.* 328: 363-369.
- ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, DECAUDIN D, MACHO A, HIRSCH T, SUSIN SA, PETIT PX, MIGNOTTE B, KROEMER G (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med.* 182: 367-377.
- ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN (RKI): „Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland“ Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Lunge – C33-C34, S. 61 ff.
- ZERN TL, WEST KL, FERNANDEZ ML (2003). Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J Nutr.* 133: 2268-2272.
- ZINI R, MORIN C, BERTELLI AA, TILLEMENT JP (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res.* 25: 87-97.
- ZHU W, QIN W, ZHANG K, ROTTINGHAUS GE ET AL. (2012). *Trans*-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. *Nutr Cancer.* 64: 393-400.

8. Publikationsverzeichnis

Originalarbeit

Lucas IK, Kolodziej H (2013). *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol originates from its cytotoxic potential. *Planta Med.* 79: 20-26.

Poster

Lucas IK, Laube U, Kiderlen AF, Kolodziej H. Resveratrol, a naturally occurring stilbene with antileishmanial activity. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Berlin, August/September, 2010.

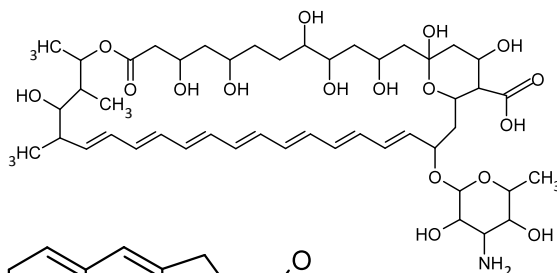
Lucas IK, Laube U, Kiderlen AF, Kolodziej H. Antileishmanial activity and host cell cytotoxicity of resveratrol. Tag der Pharmazie, Freie Universität Berlin. Berlin, September 2010.

Lucas IK, Laube U, Kolodziej H. *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol appears associated with cell cytotoxicity rather than antiparasitic properties. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Antalya, September 2011.

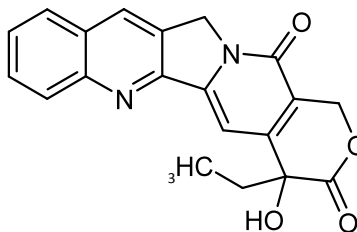
9. Anhang

Strukturformeln einiger wichtiger Test- und Referenzsubstanzen.

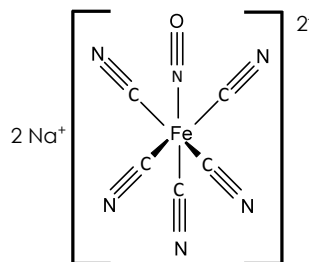
Amphotericin B



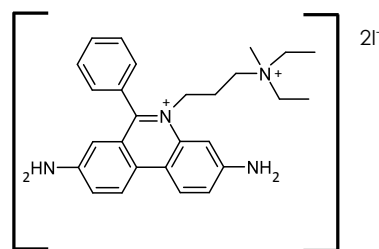
Camptothecin



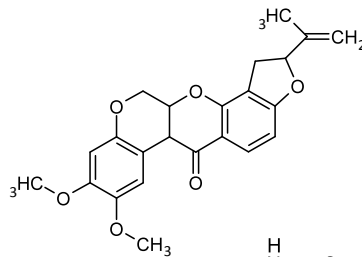
Nitroprussid-Natrium



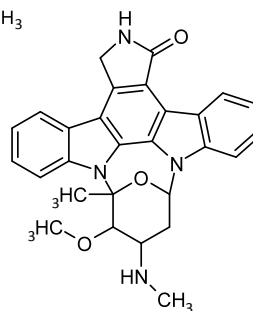
Propidiumjodid



Rotenon



Staurosporin



10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt wurde. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, 6. August 2013

Ina Katharina Lucas