

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III Kardiologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

**Inhibierung  $\beta$ -PDGF-Rezeptor-vermittelter Signalwege durch Rotwein in glatten  
Gefäßmuskelzellen der Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Maxime Ndolumingo**  
aus Wuppertal

promoviert am: 12. Juni 2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. S. H. Rosenkranz

2. Berichterstatterin: Frau Universitätsprofessor Dr. med. S. A. Eming

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswertung des Materials sowie bei der Durchsicht des Manuskripts habe ich Unterstützung von folgenden Personen erhalten:

Professor Dr. med. S. Rosenkranz

Dr. med. J. Sparwel

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 27.09.2012

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. med. S. Rosenkranz und der medizinisch-technischen Assistentin Frau Jessika Schnitker durchgeführt worden.

Die quantitativen Analysen der Weininhaltsstoffe wurden von Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Dietrich (Institut für Önologie und Getränkeforschung, Forschungsanstalt Geisenheim) durchgeführt.

## Danksagungen:

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus und Herrn Universitätsprofessor Dr. med. E. Erdmann danke ich für die Möglichkeit, die Laborarbeit, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit anfiel, in den Laboren der von ihnen geleiteten Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. S. Rosenkranz danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die hervorragende Betreuung zu jedem Zeitpunkt, sowie die konstruktive Kritik und die vielen Verbesserungsvorschläge im Laufe der Arbeiten und die Unterstützung bei der Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. med. J. Sparwel und der medizinisch-technischen Assistentin Frau J. Schnittker möchte ich für ihre freundliche Einarbeitung in die dieser Arbeit zugrunde liegenden Methoden danken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihr hilfreiches Beiseitestehen bei auftretenden Fragen und die nette Arbeitsatmosphäre danken.

Meiner Mutter, meinem Bruder und Katharina...

## Inhaltsverzeichnis:

### **Abkürzungsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Koronare Herzkrankheit (KHK)	1
1.2. Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Signalübertragung durch PDGF-Rezeptoren	4
1.3. Bedeutung von Platelet-Derived Growth Factor für die Atherogenese	6
1.4. Low-Density Lipoprotein (LDL), LDL-Rezeptor (LDLR) und LDLR-Knockout-Mäuse als Atherosklerosemodell	8
1.5. Effekte von Rotwein auf Atherosklerose-Entstehung und KHK-assoziierte Mortalität	10
1.6. Zielsetzung	13
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1. Material	14
2.1.1. Verwendete Substanzen	14
2.1.2. Antikörper	15
2.1.3. Andere Materialien	15

2.2	Methoden	16
2.2.1.	Zellkultur	16
2.2.2.	Immunpräzipitation des $\beta$ -PDGF-Rezeptors und Western Blotting	16
2.2.3.	Aktivierung von „downstream targets“-MAP-Kinase (Erk 1/2) und Akt	18
2.2.4.	DNA-Synthese	19
2.2.5.	Chemotaxis	19
2.2.6.	Quantitative Analyse der Weinkomponenten	20
2.2.7.	Statistik	21
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1.	Rotwein inhibiert die PDGF-BB-induzierte Tyrosinphosphorylierung des $\beta$ -PDGF-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR <sup>-/-</sup> Maus	21
3.2.	Inhibition von PDGF induzierten „downstream“ Signaltransduktionskaskaden durch Rotwein	22
3.3.	Inhibition PDGF-BB vermittelter zellulärer Reaktionen in glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR <sup>-/-</sup> Maus durch Rotwein	25
3.3.1.	Proliferation	25
3.3.2.	Chemotaxis	27
3.4.	Analyse der nichtalkoholischen Weinhaltstoffe des Rot- und Weißweins	29
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>31</b>
4.1.	Mechanismus und Bedeutung der Inhibition der $\beta$ -PDGF- Rezeptor induzierten Signalübertragung durch Rotwein	32

4.2.	Weitere Effekte von Rot- und Weißweinen auf molekulare Mechanismen der Atherogenese und das Lipidprofil im Serum	34
4.3.	Bedeutung und Mechanismen der kardioprotektiven Effekte von Rotwein und seiner Komponenten <i>in vivo</i>	35
4.4.	Fazit: Inhibierung $\beta$ -PDGF-Rezeptor-vermittelter Signalwege durch Rotwein in glatten Gefäßmuskelzellen-Eine Erklärung für das „French Paradoxon“?	37
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>60</b>

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ApoB100	Apolipoprotein B-100
ApoE	Apolipoprotein E
BrdU	Pyrimidinanalogs 5-Bromo-2-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CRP	C-reaktives Peptid
CURL	Compartment for Uncoupling of Receptor and Ligand
DMEM	Dublecco's MOD Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin Gallate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin Gallate
E3L	ApoE*3Leiden
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELK-1	E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1
eNOS	endothelialen NO Synthase
Erk 1/2	extracellular regulated kinase 1/2
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fetal Calf Serum
GCG	Gallocatechingallate
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HDL	High-Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICAM 1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
MAP-Kinasen	Mitogen-Activated Protein-Kinasen
MCP-1	Zytokin Monocyte Chemoattractant Protein-1



MMPs	Matrix-Metallo-Proteinasen
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	$\beta$ -PDGF Rezeptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC $\gamma$ -1	Phospholipase C $\gamma$ -1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
PY	Phosphotyrosin
RasGAP	das GTPase-aktivierende Protein von Ras
RT	Raumtemperatur
RTK	transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinasen
SDS	Dodecylsulfat Na-Salz
SDS-PAGE	Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Gel
SD	Standardabweichung
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
Shc	Src homology 2 domain containing
SHP-2	Phosphotyrosinphosphatase-2
SMC	Smooth Muscle Cells
SOS Gen	Son of Sevenless Gen
Src Kinase	Sarc (sarcoma) Kinase
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM 1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Gen
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
WB	Western Blot

# 1. Einleitung

## 1.1 Koronare Herzkrankheit ( KHK )

Mit 358.985 Todesfällen waren Erkrankungen des Herz/Kreislaufsystems die häufigsten Todesursachen im Jahr 2007 in Deutschland. Ihnen erlag fast jeder zweite Gestorbene (43,4 %). Die wichtigste spezifische Todesursachengruppe war dabei die der ischämischen Herzkrankheiten (139.808 Sterbefälle), darunter insbesondere der akute sowie der rezidivierende Myokardinfarkt mit insgesamt 61.040 Gestorbenen (Quelle: Deutsches Statistisches Bundesamt).

Begünstigend auf die Entstehung der Koronarsklerose wirken mehrere Risikofaktoren. Zu den Hauptrisikofaktoren zählen vor allem der Nikotinabusus, die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, familiäre/genetische Disposition und erhöhtes Lebensalter (23).

Die koronare Herzkrankheit ist eine degenerative Veränderung der Intima und Media der koronaren Gefäße. Hierbei kommt es durch Koronarstenosen zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot. Dies resultiert in einer Myokardischämie. Sie ist eine Manifestation der Atherosklerose in den Koronarien und kann über Jahre bis Jahrzehnte symptomlos verlaufen, bis sie sich durch Angina pectoris, Herzinfarkt oder plötzlichen Herztod manifestiert.

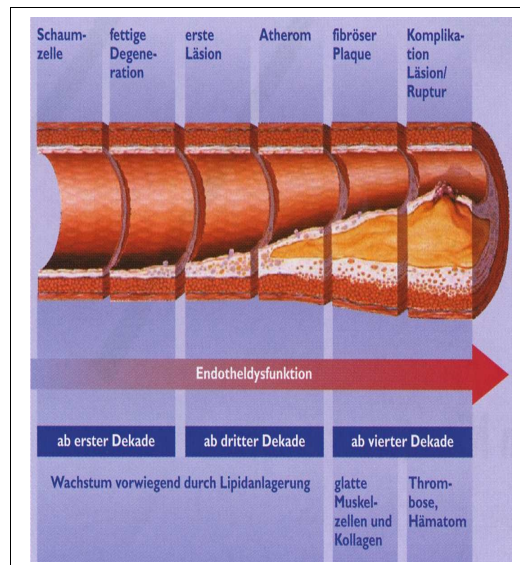
Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle, systemische und chronisch inflammatorische Erkrankung der Gefäßwände (74). Im Rahmen ihrer Entstehung und Progression spielen entzündliche und immunologische Reaktionen eine entscheidende Rolle (88). Grundlage der Erkrankung ist eine endotheliale Dysfunktion, auf Grund derer es zu komplexen Interaktionen zwischen zirkulierenden Wachstumsfaktoren, Zytokinen und diversen Zelltypen, wie Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen kommt (114). Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels, welche vor allem bei Hyperlipidämie eine Ablagerung von oxidierten Lipoproteinen zur Folge hat. Hier spielt vor allem oxidiertes Low density Lipoprotein (LDL) eine entscheidende Rolle (34, 54). Die Einlagerung von oxidiertem LDL hat eine Entzündungsreaktion zur Folge, welche zu einer transkriptionellen Akti-

vierung des Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) 1 Gens und somit zu einer Überexpression von VCAM1 führt (32, 30). Dieses Adhäsionsmolekül bindet zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten, was zu einer Einwanderung dieser Zellen in die Gefäßintima führt. Die Monozyten differenzieren sich dann zu ortsständigen Makrophagen aus. Dies kann bereits im Kindesalter als Lipidfleck (fatty streak), einer entzündlichen Veränderung aus Makrophagen und T-Lymphozyten (98, 126) beobachtet werden. Das abgelagerte oxidierte LDL wird durch die eingewanderten Makrophagen und andere Zellen phagozytiert. Goldstein bezeichnete diese Makrophagen mit intrazellulärem oxidiertem LDL als erster als „Schaumzellen“ (foam cells) (54). Die beteiligten Zellen sezernieren zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche auto-/ parakrin auf das umliegende Gewebe einwirken, was schließlich zur Progression der atherosklerotischen Läsionen vom Atherom bis zum Fibroatherom führt. Das Zytokin Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) wirkt beispielsweise chemotaktisch auf Leukozyten und bewirkt so deren weitere Einwanderung in die Intima (88). Die durch Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) vermittelte Einwanderung von glatten Gefäßmuskelzellen in die Intima und ihre Proliferation spielen in den Folgestadien eine entscheidende Rolle (41, 88). Glatte Gefäßmuskelzellen sind Hauptproduzenten der Extrazellulärmatrix innerhalb der Gefäßwand und modifizieren die Art der sezernierten Matrixproteine nach atherogenen Stimuli (41). Sie sind außerdem in der Lage diverse Rezeptoren für die Lipoproteinaufnahme und Adhäsionsmoleküle wie VCAM 1 oder intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) zu exprimieren (41). Zusätzlich sind sie in der Lage Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie PDGF, Transforming Growth Factor-beta, Interferon gamma, und MCP-1 zu produzieren, welche die Entzündungsreaktion initiieren und propagieren (41). Die entstandenen Atherome können sich schließlich entweder nach luminal oder nach abluminal ausdehnen.

Die primär luminale Ausdehnung führt zu einer progredienten Stenosierung des Gefäßes, die zu verminderter Koronardurchblutung unter Belastung mit entsprechender Ischämiereaktion und somit zur klinischen Manifestation, der stabilen Angina pectoris führt.

Die primär abluminale Ausdehnung hat zunächst keine Symptome zur Folge. Die Einwanderung und Aktivierung von Entzündungszellen, apoptotische Vorgänge und die Bildung von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) führen zur

Entwicklung von so genannten „instabilen Plaques“ (Abb. 1). Die Ruptur dieser atherosklerotischen Plaques führt durch die Freisetzung von thrombogenen Substanzen wie „tissue Factor“ oder von Willebrand-Faktor zu einer partiellen oder kompletten Gefäßokklusion und somit zu einem akuten Koronarsyndrom bzw. Myokardinfarkt (52, 85).



**Abb.:1: Entstehung, Verlauf und Folgeerscheinungen der Atherosklerose.**  
*Schematische Darstellung der Bildung, Progression und Ruptur einer atherosklerotischen Läsion. (Modifiziert nach Stary HC et al. 1994(126))*

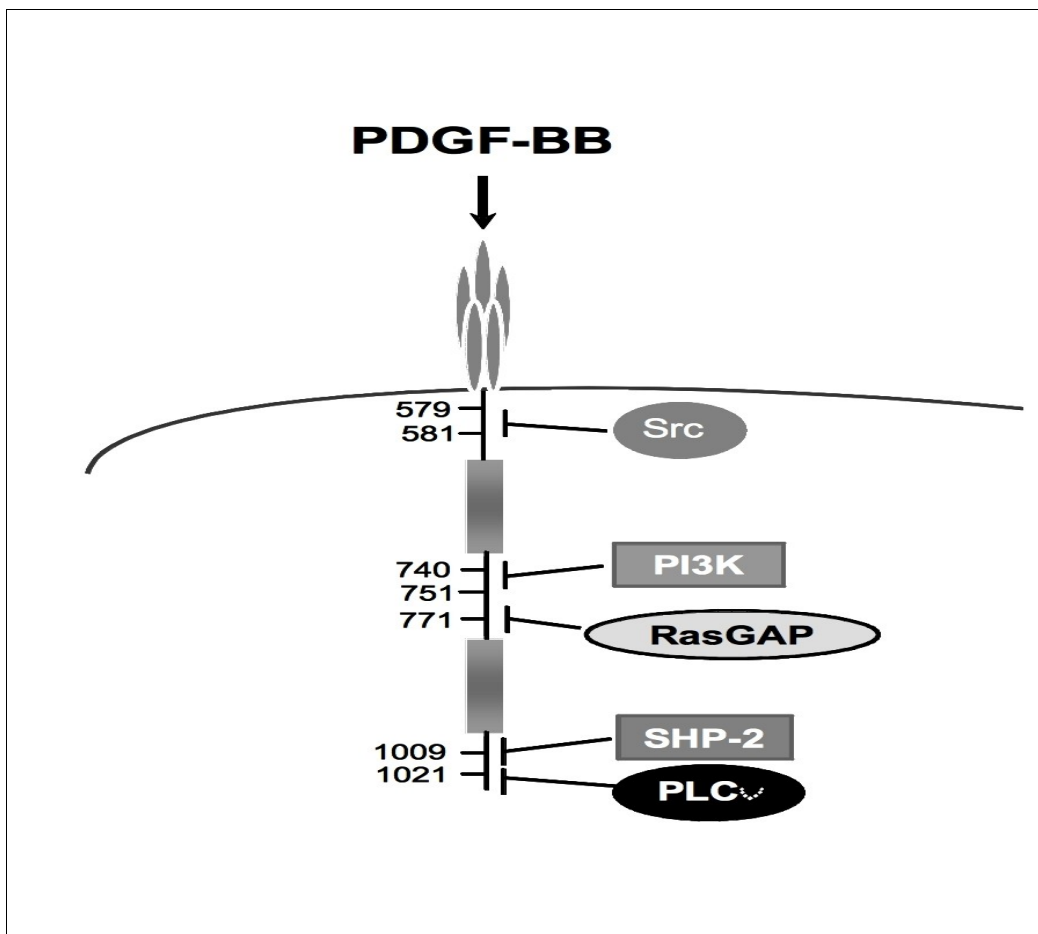
## 1.2 Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Signalübertragung durch PDGF-Rezeptoren

PDGF ist ein dimeres Protein, welches von zahlreichen Zelltypen produziert und sezerniert wird. Es besteht aus zwei von vier bekannten PDGF Ketten (A, B, C und D), die über Disulfidbrücken verbunden sind (19, 63, 70, 87, 112). Dabei bilden die PDGF-Ketten sowohl Homo- (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD) als auch Heterodimere (PDGF-AB). Die verschiedenen PDGF-Isoformen binden an PDGF-Rezeptoren, spezifische, transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) (19, 63, 70, 87, 112). Es existieren zwei PDGF-Rezeptor Subtypen, die als  $\alpha$ - und  $\beta$ -PDGF Rezeptor (PDGFR) bezeichnet werden. Es liegen hierbei unterschiedliche Affinitäten der einzelnen Isoformen zu den Rezeptor-Subtypen vor. An den  $\alpha$ -PDGFR bindet ausschließlich die PDGFA-Kette, während die B-Kette sowohl an den  $\alpha$ - als auch an den  $\beta$ -Rezeptor bindet. PDGF-CC und -DD stellen insofern Sonderformen dar, als sie zunächst in einer inaktiven Form sezerniert werden und daher noch proteolytisch gespalten werden müssen, bevor sie PDGF-Rezeptoren aktivieren können (19, 71, 84). Dabei bindet die C-Kette nur an den  $\alpha$ -Rezeptor, während die D-Kette vorwiegend an den  $\beta$ -Rezeptor bindet.

Der  $\beta$ -PDGFR ist ein monomeres Protein. Durch die Bindung der dimeren Liganden kommt es jedoch zu einer Dimerisierung des Rezeptors und zu einer Erhöhung der intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität, mit der Folge einer Trans-/Autophosphorylierung des Rezeptors an verschiedenen Tyrosinresten (70). Es kommt dabei zu einer Transphosphorylierung zwischen den beiden intrazellulären Anteilen der Rezeptormoleküle (72). Die phosphorylierten Tyrosinreste der intrazellulären Anteile des aktivierten  $\beta$ -PDGFR dienen nun downstream gelegenen zytoplasmatischen Signaltransduktionsmolekülen als spezifische Bindungsstellen (26). Bisher sind Src-Kinasen (Src), die Phosphotyrosinphosphatase SHP-2, das GTPase-aktivierende Protein von Ras (RasGAP), Phospholipase  $C\gamma$ -1 (PLC $\gamma$ ) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) als solche Signaltransduktionsproteine bekannt (130). Die Bindung und Aktivierung dieser Signaltransduktionsmoleküle aktiviert weiter downstream

gelegene Signalkaskaden und hat beispielsweise die Phosphorylierung von MAP-Kinasen (Erk 1/2, p38, JNK) zur Folge (62, 146).

Die PDGFR-Subtypen unterscheiden sich in ihren biologischen Eigenschaften und in ihren Signaltransduktionskaskaden. Der  $\beta$ -PDGFR spielt eine entscheidende Rolle bei der Atherogenese, der Neubildung von Gefäßen und der Bildung von Neointima nach Gefäßläsionen (12, 33, 60, 78, 117). Er wird unter anderem von glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten exprimiert. In atherosklerotischen Plaques, Neointima, bei Wundheilungsprozessen oder bei chronischen Entzündungsreaktionen lässt sich eine Heraufregulation des PDGFR beobachten (106, 107).

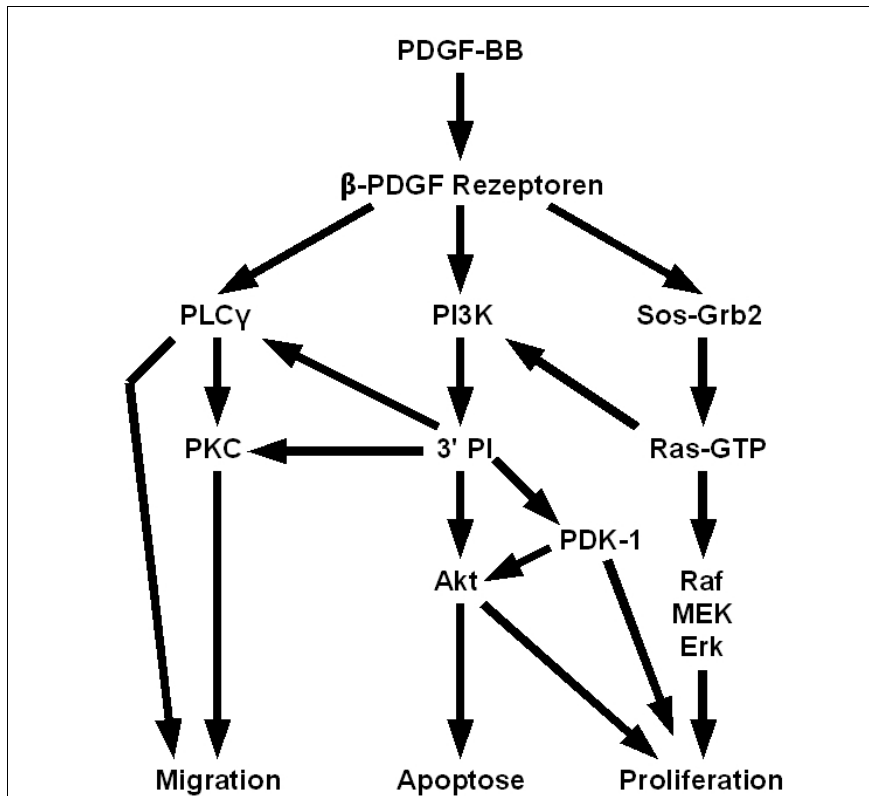


**Abb. 2:** Signalübertragung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors über intrazelluläre Rezeptor-assoziierte Signaltransduktionsmoleküle. (modifiziert nach Rosenkranz und Kazlauskas 1999 (112))

### 1.3 Bedeutung von Platelet-derived Growth Factor für die Atherogenese

Der peptidische Wachstumsfaktor PDGF ist über die Aktivierung von  $\beta$ -PDGF Rezeptoren an allen Stadien der Atherosklerose beteiligt (12, 89, 119). In atherosklerotischen Läsionen zeigt sich sowohl eine erhöhte Expression von PDGF und PDGF Rezeptoren als auch eine erhöhte Phosphorylierung des  $\beta$ -PDGF Rezeptors (1, 112). Entscheidende Faktoren bei der Atherogenese sind die  $\beta$ -PDGFR-vermittelte Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen in die Gefäßintima.

Verschiedene Signalkaskaden des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors vermitteln die Proliferation. Die Aktivierung von Ras, zum einen über den Grb2-Sos-Komplex und zum anderen über Shc und Grb2, führt zu einer Proliferationszunahme (116, 118). Mit Hilfe pharmakologischer Inhibitoren der Signalmoleküle PI3K und PLC $\gamma$ , als auch mittels mutierter PDGF-Rezeptoren, konnte die Bedeutung dieser Signalmoleküle für die PDGF-induzierte Proliferation von Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (21, 133, 139). Diese Untersuchungen zeigten auch, dass für die PDGF-vermittelte Chemotaxis ein koordiniertes Zusammenspiel von PI3K, PLC $\gamma$  und Sre notwendig ist (64, 111, 144). Wichtige Downstream-Mediatoren sind Akt, Ras, MAP-Kinase (Erk 1/2) und RasGAP (75, 79, 80). Die Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den  $\beta$ -PDGF-Rezeptor hatte in einem Affen-Modell im Gegensatz zur Behandlung mit einem  $\alpha$ -PDGF-Rezeptorantikörper eine 37%ige Reduktion der Intimaläsion zur Folge (53). Weitergehend zeigte die Inhibition von PDGF-Rezeptoren durch Antikörper oder spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren in Atherosklerose-Tiermodellen eine Hemmung der Proliferation, und somit der Atherogenese und Restenose-Bildung (16, 18, 44, 45, 69). Gleichzeitig zeigte sich in einem genetischen Modell, dass die Ausschaltung der  $\beta$ -PDGR-vermittelten PI3K- und PLC $\gamma$ -Aktivität in vivo zu einer deutlichen Reduktion der Neointima-Bildung führte (21).



***Abb. 3:*** Schematische Darstellung der PDGF-BB induzierten Signalkaskaden und ihre Bedeutung für PDGF-induzierte zelluläre Effekte.



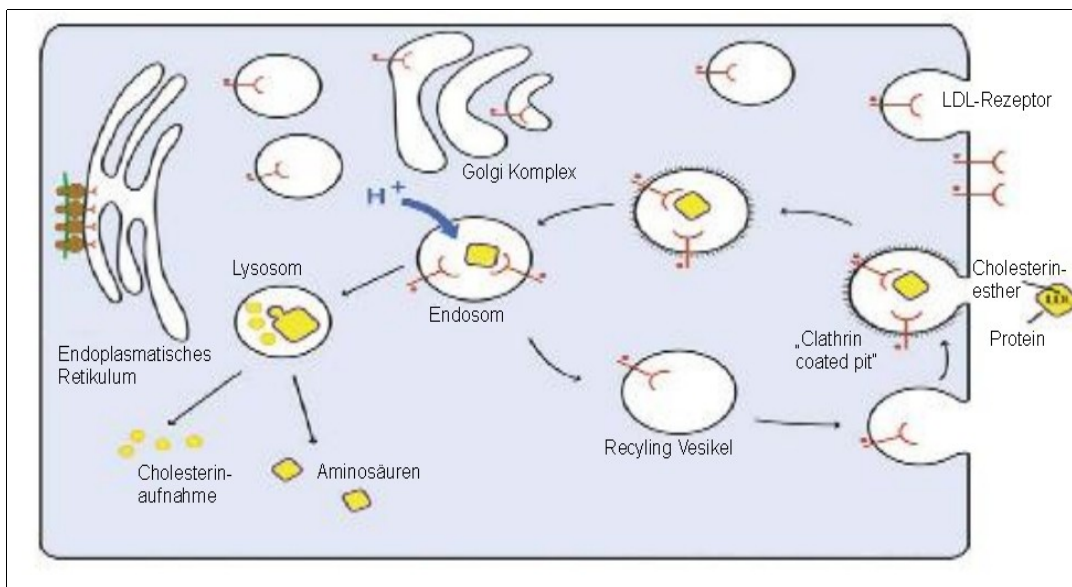
## **1.4 Low-Density Lipoprotein (LDL), LDL-Rezeptor (LDLR) und LDLR-Knockout-Mäuse als Atherosklerosemodell**

Low-Density Lipoprotein (LDL) ist ein Vertreter von mehreren Klassen der Lipoproteine. Lipoproteine sind nicht kovalente Aggregate aus Lipid und Protein. LDL dient dem Transport von hydrophoben Lipiden im Blut. Die Lipoproteine werden auf Grund ihres Verhaltens in der Elektrophorese oder die durch Ultrazentrifugation bestimmbare Dichte in fünf Gruppen unterteilt: Chylomikronen, Very Low-Density Lipoprotein (VLDL), Intermediate-Density Lipoprotein (IDL), Low-Density Lipoprotein und High-Density Lipoprotein (HDL) (4, 54, 66). Jedes LDL Molekül enthält ein Apolipoprotein B-100 (ApoB100), welches als Enzym, Co-Faktor, Rezeptor-Ligand und Lipid-Transporter dient (120). Bisher sind zwei LDL-Subtypen bekannt, welche sich in Dichte und Größe unterscheiden. Das LDL-B, welches kleiner und dichter ist als LDL-A und einen verringerten Triglycerid- und Cholestringehalt hat, ist insbesondere mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (129).

Lipoproteine dienen dem Transport von hydrophoben Substanzen. Dabei dienen die unterschiedlichen Lipoproteine auch unterschiedlichen Transportwegen. LDL transportiert Cholesterin von der Leber in die peripheren Gewebe. In diesen Zellen wird es vor allem für den Einbau in die Zellmembran und als Vorstufe für Gallensäuren und Steroidhormonen benötigt. Da dieser Transportweg auch bei der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielt und das durch LDL transportierte Cholesterin den größten Anteil des im Blut zirkulierenden Cholesterins ausmacht, wird es oft als böses Cholesterin bezeichnet. Da das an HDL transportierte Cholesterin von der Peripherie zu der Leber transportiert wird, wird dieses als gutes Cholesterin bezeichnet.

LDL wird über zwei Wege, den sogenannten „Scavenger-Pathway“ (15%) und über den LDL-Rezeptor aus der Blutbahn eliminiert. Makrophagen, aber auch andere Zellen wie glatte Gefäßmuskelzellen, fungieren als sogenannte Scavenger Zellen, die durch Scavenger-Rezeptoren, chemisch modifiziertes (oxidiertes) LDL ungehemmt und konzentrationsunabhängig aufnehmen und speichern.

Der LDL Rezeptor ist ein Glycoprotein, welches in der Zellmembran nahezu aller Zellen des Körpers vorhanden ist (20). Circa 65% des im Blut vorhandenen LDL bindet an den LDL-Rezeptor und wird dann in sogenannten „clathrin-coated pits“ durch Endozytose in die Zellen aufgenommen (8, 9, 10, 11, 68). Kurz nach der Endozytose zerfällt die Clathrin-Hülle des Vesikels und es wird so zu einem Endosom. In einem Reifungsprozess fällt der pH-Wert im Inneren des Endosoms und in dem CURL (Compartment for Uncoupling of Receptor and Ligand) genannten Stadium trennt sich aufgrund des sauren Milieus das LDL vom LDL-Rezeptor (20, 125). Der Rezeptor wird nun entweder erneut an die Oberfläche der Zellmembran transportiert (Rezeptor-Recycling) oder abgebaut (20, 55, 68). Das LDL-enthaltende Endosom verbindet sich mit einem Lysosom zu einem sekundären Lysosom und das LDL wird dort enzymatisch in Aminosäuren, Cholesterin und Fettsäuren zerlegt. Der LDL-Rezeptor wurde erstmals durch Brown und Goldstein 1973 identifiziert (54). Sie konnten zeigen, dass die familiäre Hypertonie durch Mutationen des LDL-Rezeptor Gens hervorgerufen wird, welche eine Funktionsstörung und Reduktion der Anzahl der LDL-Rezeptoren zur Folge haben. Folge dieser Funktionsstörung ist eine erhöhte Plasma-LDL Konzentration. Dies resultiert in einem deutlich niedrigerem Manifestationsalter für Myokardinfarkte.



**Abb. 4: LDL Abbau über den LDL-Rezeptor.** (Modifiziert nach Brown, Goldstein 1973 (55))

Genetische Mausmodelle dienen als exzellente, sichere und ökonomische Modelle für die experimentelle Untersuchung von Krankheitsprozessen. So wurden verschiedene Mausmodelle für die Erforschung der Pathomechanismen der Atherosklerose etabliert (42, 67, 142, 145). Zu den etablierten Atherosklerosemodellen zählen die apolipoprotein E (ApoE)-Knockout und die LDL-Rezeptor-Knockout Maus sowie die ApoE\*3Leiden (E3L) transgene Maus (142). In diesen Modellen entstehen größere Läsionen und diverse Effekte auf den Lipidstoffwechsel (42, 145).

## **1.5 Effekte von Rotwein auf Atherosklerose-Entstehung und KHK-assoziierte Mortalität**

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen cholesterinreicher Kost und der Mortalitätsrate durch kardiovaskuläre Erkrankungen nachgewiesen. Obwohl die Cholesterinaufnahme in Frankreich ähnlich wie in anderen westlichen Ländern ist, ist die Prävalenz der koronaren Herzkrankheit deutlich niedriger als in anderen europäischen und amerikanischen Staaten (105). Eine Erklärung hierfür könnte in dem höheren Rotweinkonsum in Frankreich liegen (31). Jedoch können auch andere Faktoren wie unterschiedliche Nahrungsgewohnheiten, das Rauchverhalten, genetische Faktoren, Stress und körperliche Aktivität Einfluß auf die Prävalenz der KHK nehmen.

Zahlreiche Studien beschrieben einen günstigen Effekt von moderatem Alkoholkonsum auf Gesamtsterblichkeit, Insulinsensitivität, sowie die Prävalenz und klinische Symptomatik bei peripheren arteriellen Erkrankungen, cerebrovaskulären Erkrankungen und kardialen Erkrankungen (3, 5, 22, 28, 36, 56, 95). Eine von Di Castelnuovo durchgeführte Metaanalyse von 34 Studien, welche Daten von über einer Millionen Personen und mehr als 94.500 Todesfällen enthält, zeigt in einer J-Kurve, dass die Gesamtmortalität bei einem moderatem Alkoholkonsum von ungefähr 6g/Tag abnimmt und bei einem höheren Konsum wieder zunimmt (38). Da dieser Benefit vor allem Männer und Frauen im mittleren Alter betrifft und diese Altersgruppe ein erhöhtes Risiko für die koronare

Herzkrankheit aufweist, könnte man vor allem einen positiven Effekt von Alkohol auf die KHK vermuten (122, 140, 141). Corrao zeigte 2000 in einer Metaanalyse von 51 epidemiologischen Studien, dass das Risiko an KHK zu erkranken durch moderaten Alkoholkonsum um ungefähr 20% reduziert wird (28). Außerdem wurde ein durch Alkoholkonsum gesenktes Risiko für KHK in verschiedenen Populationen gezeigt, wie gesunden Erwachsenen (5, 22, 95), Patienten mit koronaren Vorerkrankungen (36) und Diabetikern (3, 123).

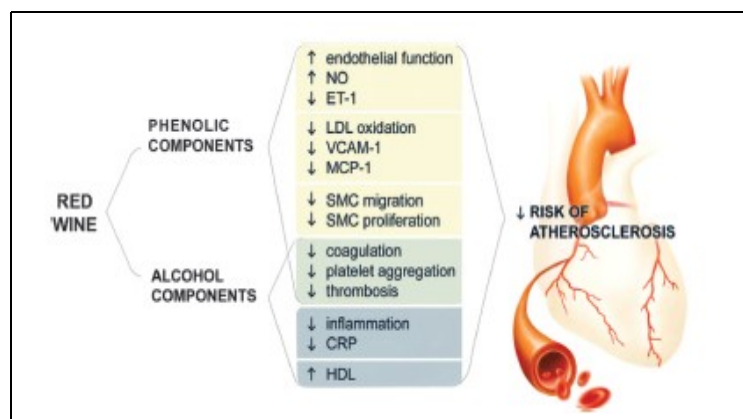
Einige Studien weisen darauf hin, dass Rotwein einen stärkeren protektiven Effekt auf die KHK ausübt, als andere alkoholische Getränke (39, 56, 57). Demgegenüber lassen andere Studien keinen dominanten Effekt von Rotwein erkennen (77, 108). Erklärungen für diese unterschiedlichen Daten könnten die unterschiedliche Risikofaktorausprägung bei Bier-, Wein- und Spirituosentrinkern (109), die Anwesenheit von beeinflussenden Lebensstilfaktoren (99) oder unterschiedliche Wirksamkeiten der konsumierten Rotweine sein (135).

Neben epidemiologischen Daten deuten auch molekulare *in vitro* und *in vivo* Studien daraufhin, dass Ethanol und polyphenolische Anteile des Rotweins aktiv die Entstehung und Progression der Atherosklerose beeinflussen.

Der in Rotwein enthaltene Alkohol hemmt die Thromozytenaggregation, verstärkt bei moderatem Konsum die Fibrinolyse und reduziert die Fibrinogenkonzentration. Starker Konsum führt hingegen zu einer Hemmung der Fibrinolyse, welches die gesteigerte kardiovaskuläre Mortalität bei hohem Alkoholkonsum erklären könnte (76). Desweiteren kommt es durch Alkohol zu einer verminderten inflammatorischen Aktivität, da Alkoholkonsum zu einer Erniedrigung des C-reaktiven Proteins (CRP) führt (6). Darüber hinaus dürfte die durch moderaten Alkoholkonsum hervorgerufene Erhöhung des HDL-Cholesterins entscheidend für das kardiovaskuläre Risiko sein, die sich übereinstimmend in mehreren Studien zeigte (59, 134).

Nichtalkoholische Bestandteile des Rotweins, denen ein hohes antiatherosklerotisches Potenzial zugeschrieben wird, sind insbesondere die Polyphenole (102). Polyphenole sind durch die Maischegärung vor allem in Rotweinen vorhanden und in Weißweinen nur in geringen Mengen nachweisbar (124). Sie bewirken eine verbesserte Endothelfunktion durch eine gesteigerte Expression der endothelialen NO Synthase (eNOS) Aktivität, welche eine erhöhte NO-Freisetzung zur Folge hat (136). Polyphenole regulieren zusätzlich das vasokon-

striktorisch wirkende Endothelin-1 herunter und führen so ebenfalls zu einer Vasodilatation. Zusätzlich kommt es durch nichtalkoholische Polyphenole zu einer Inhibition der Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen (113). Dies lässt sich womöglich durch die Inhibition der ligandeninduzierten  $\beta$ -PDGF-Rezeptor-Aktivierung erklären. Rotweinpolyphenole greifen zusätzlich in den Lipoproteinmetabolismus ein, indem sie die Produktion von Apolipoprotein B100 (ApoB100) hemmen (15) und die Expression von LDL-Rezeptoren heraufregulieren (104). Ausserdem sind sie antioxidativ wirksam, welches die Zellen vor direktem oxidativen Stress schützt (7). So inhibieren sie die Zell-gesteuerte Oxidation von LDL (15). Hinzu kommt, dass Polyphenole Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und MCP-1 herunterregulieren und damit der Einwanderung von Makrophagen in atherosklerotische Plaques entgegenwirken. Diese Ergebnisse werden durch einige *in vivo* Studien unterstützt. Beispielsweise bewirkte die orale Applikation von Rotwein an Mäusen, welche an Hypercholesterinämie litten, eine Heraufregulation von eNOS und eine Inhibition der Aktivierung von proatherogenen Redox-sensitiven Genen (ELK-1 und p-JUN) (97). Desweiteren verhinderte alkoholfreies Rotweinextrakt arterielle Thrombosen bei Ratten unter cholesterinreicher Kost (35), und ein alkoholfreies Polyphenolpulver führte bei Apolipoprotein E defizienten Mäusen zu einer Reduktion der Fläche atherosklerotischer Läsionen (51).



**Abb. 5: Potenziell vasoprotektive Effekte alkoholischer und nichtalkoholischer Rotweinkomponenten.** (Modifiziert nach Szmitko et al. 2005 (121))

Zusammenfassend konnte in zahlreichen vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass Alkohol- und insbesondere Rotweinhaltstoffe über verschiedene Mechanismen der Atherogenese entgegenwirken. Unter anderem wurde ein inhibitorischer Effekt von Rotwein auf die Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors, die Aktivierung von downstream gelegenen Signaltransduktionsmolekülen und PDGF-induzierte zelluläre Reaktionen, wie Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte nachgewiesen. Hierbei zeigte sich jeweils ein inhibierender Effekt durch Rotwein, während ein Effekt durch Weißwein ausblieb. Der positive Effekt von Rotwein, wird vor allem den polyphenolischen Bestandteilen zu geschrieben, welche sich durch die Maischegärung im Rotwein anreichern.

## **1.6 Zielsetzung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, welche Effekte Rotwein im Vergleich zu Weißwein auf PDGF-vermittelte Effekte in glatten Gefäßmuskelzellen der Maus ausübt. Den Untersuchungen lag die Hypothese zu Grunde, dass Rotwein, nicht jedoch Weißwein, die Liganden-induzierte Aktivierung des PDGFR und PDGF-induzierte zelluläre Reaktionen (Proliferation, Migration) inhibiert. Diese PDGF-induzierten Prozesse spielen in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques eine entscheidende Rolle. Die hier verwendeten glatten Gefäßmuskelzellen stammten von LDL-Rezeptor-Knockout Mäusen. Als sicheres und ökonomisches genetisches Mausmodell zählt es zu den etabliertesten für weitere experimentelle Untersuchungen der Pathomechanismen der Atherosklerose *in vivo* (142).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Substanzen

β--Mercaptoethanol, Sigma, Deisenhofen  
6-Aminohexansäure, Sigma, Deisenhofen  
Acrylamid, Merck, Darmstadt  
Ammoniumperoxodisulfat, Merck, Darmstadt  
Aprotinin, Sigma, Deisenhofen  
Bromphenolblau, Sigma, Deisenhofen  
Calciumchlorid, Sigma, Deisenhofen  
Dodecylsulfat Na-Salz (SDS), Serva, Heidelberg  
Ethanol, Roth, Karlsruhe  
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma, Deisenhofen  
Glycerol, Merck, Darmstadt  
Hepes, Sigma, Deisenhofen  
High Molecular Weight Marker, Sigma, Deisenhofen  
Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt  
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt  
Magnesiumchlorid, Merck, Darmstadt  
Methanol, Roth, Karlsruhe  
Natriumazid, Merck, Darmstadt  
Natriumchlorid, Roth, Karlsruhe  
di-Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt  
Natriumorthovanadat, Sigma, Deisenhofen  
PDGF-BB, PromoCell, Heidelberg  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma, Deisenhofen  
Pipes, Sigma, Deisenhofen  
Protein-A Sepharose, Sigma, Deisenhofen  
Rinderserumalbumin (BSA), Sigma, Deisenhofen  
Rotwein: Château Chasse Spleen, Moulis, Bordeaux, 1990

Sucrose, Sigma, Deisenhofen  
TEMED (N',N',N',N'-Tetramethylethyldiamin), Sigma, Deisenhofen  
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Roth, Karlsruhe  
Triton X-100, Sigma, Deisenhofen  
Trockenmilch, Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell  
Tween, Sigma, Deisenhofen  
Weißwein: Château Lamothe de Haux, Bordeaux, 2006

### **2.1.2 Antikörper**

Anti-Phosphotyrosin-Antikörper: PY20 und 4G10, Santa Cruz, USA  
Anti- $\beta$ -PDGFR (97A), Prof. A. Kazlauskas, Harvard Medical School, Boston/USA  
Anti-RasGAP, Prof. A. Kazlauskas, Harvard Medical School, Boston/USA  
Anti-p42/44-Erk (Thr-202/Thr-204), New England Biolabs, USA  
Anti-mouse-IgG (whole molecular) Peroxidase conjugate, Sigma, Deisenhofen  
Anti-rabbit-IgG (whole molecular) Peroxidase conjugate, Sigma, Deisenhofen  
Anti- Phospho-Akt, New England Biolabs, USA

### **2.1.3 Andere Materialien**

DMEM (Dublecco's MOD Eagle Medium), Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe  
FCS, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe  
Immuno-Blot PVDF-Membran, Bio-Rad, München  
Western-Blot-Detektions-Reagenz ECL, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg  
Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg  
Cell Proliferation ELISA Kit, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim  
Diff-Quick Solution, Baxter Healthcare Corp., Miami/USA  
Trypsin, PAA Laboratories GmbH, Cölbe



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden aus Mauseaorta (LDL-Rezeptor knock out; Alter 6-10) isoliert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Nährmedium (DMEM mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% FCS) gehalten (24). Alle Versuche wurden mit Zellen aus Passagen 5 bis 15 durchgeführt.

### 2.2.2 Immunpräzipitation des $\beta$ -PDGF-Rezeptors und Western Blotting

#### Immunpräzipitation:

Zu circa 90 % konfluente Zellkulturschalen mit glatten Gefäßmuskelzellen wurden über Nacht in 5 ml Hungermedium bei 37°C inkubiert. Die gehungerten Zellen wurden anschließend für 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen Rotwein oder Weisswein bei 37°C präinkubiert und mit PDGF-BB (50 ng/ml) fünf Minuten bei 37°C stimuliert. Auf Eis wurden die Zellen dann zweimal mit Waschpuffer (pH 7,4: 150 mM Hepes, 18,3 mM NaCl, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; durch 0,45 µm Filter filtriert) gewaschen und in 1 ml Lysepuffer (pH 7,2: 1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA; 50 mM NaCl; 50 mM NaF; 20 µg/ml Aprotinin, 0,1% BSA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF) lysiert. Nach erfolgter Lyse wurden die Proben dann mittels Zellscrapern in Eppendorfer Safe Lock Tubes überführt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet verworfen, und der Überstand mit einem Antikörper (97A) gegen den  $\beta$ -PDGF-Rezeptor für 90 min auf Eis inkubiert. Für 30 min wurden die Proben dann mit Protein-A-Sepharose inkubiert (42). Anschließend folgte die Zentrifugation durch Lysepuffer/10% Sucrose (20 min bei 2500 rpm und 4°C). Die Proben wurden dann je dreimal in 1 ml Lysepuffer und 1 ml PAN (10 mM Pipes, pH 7,0; 100 mM NaCl; 20 µg/ml Aprotinin) gewaschen und zentrifugiert (5 min bei 8.000 rpm und 4°C). Danach wurde das Pellet in 60 µl Probenpuffer (2,0 ml Glycerol, 2,0 ml 10% SDS, 0,025 mg Bromphenolblau, 2,5 ml Stacking Gel Buffer (pH 6,8: 6,06 g Tris, 4,0 ml 10% SDS ad 100 ml Aqua dest.), 500 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol ad 10 ml Aqua

dest.) resuspendiert, die Proben drei Minuten bei 95°C gekocht und eine Minute bei 8.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

#### Western Blotting:

Nach der Zentrifugation wurden die Immunpräzipitate auf 7,5%-ige Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-(SDS-PAGE)-Gele geladen und bei einem Gleichstrom von 20 mA über 2 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Position der gesuchten Proteine wurde auf das SDS-PAGE-Gel ein Markerproteingemisch (Molekulargewicht zwischen 53 und 233 kDa) aufgetragen und parallel zu den Proben aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren (Semiphor Hoefer, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, 0,2 µm Porengröße) transferiert, indem das Gel und die PVDF-Membran auf in Anodenlösung I (300 mM Tris, 20% Methanol) und Anodenlösung II (25 mM Tris, 20% Methanol) getränkte Filterpapierblätter aufgelegt und mit in Kathodenlösung (40 mM 6-Aminohexansäure, 0,01% SDS, 20% Methanol) getränkten Filterpapierblättern überdeckt wurde. Der Transfer erfolgte bei einem Gleichstrom von 100 mA über 1 Stunde.

Anschließend wurde die PVDF-Membran in Stücke geschnitten, wobei die sichtbaren Banden der Markerproteine als Orientierung dienten. Die Membranstücke wurden dann in Blocking Solution (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mg/ml BSA, 10 mg/ml Ovalbumin, 0,05% Tween, 0,005% NaN<sub>3</sub>) bzw. in Trockenmilch (5% in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und anschließend eine Stunde in PBS gewaschen. Zur Ermittlung der liganden-induzierten Aktivierung wurde die Tyrosin-Phosphorylierung des β-PDGF-Rezeptors untersucht. Hierzu wurde der entsprechende Membranabschnitt (~190 kD) für 60 min mit Phosphotyrosin-(P-Y)-spezifischen primären Antikörpern (4G10, PY 20; je 1:2000) inkubiert, anschließend fünf mal je fünf Minuten in PBS gewaschen, und für 60 Minuten mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (anti-mouse 1:2000) inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen der Membranstücke (je 5 min.) folgte die Entwicklung mittels Western-Blot-Detektions-Reagenz ECL (Amersham

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg), wobei sich die Proteinbanden auf den aufgelegten Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) schwarz darstellten.

### **2.2.3 Aktivierung von „downstream targets“-MAP-Kinase (Erk 1/2) und Akt**

Die Effekte von Rotwein und Weißwein auf die PDGF-BB-induzierte Phosphorylierung von p42<sup>MAPK</sup> und p44<sup>MAPK</sup> (Erk 1/2) sowie die Phosphorylierung von Akt wurden mittels Western-Blotting mit phospho-spezifischen Antikörpern untersucht. Subkonfluente (ca. 80%) VSMCs wurden für 12 Stunden in DMEM gehungert und somit synchronisiert, anschließend für 30 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rotwein oder Weißwein vorinkubiert, und dann mit PDGF (50 ng/ml) bei 37°C stimuliert. Die Zellen wurden dann auf Eis zwei mal mit Waschpuffer (pH 7,4: 150 mM HEPES, 18,3 mM NaCl, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; durch 0,45 µm Filter filtriert) gewaschen und dann in Lysepuffer ohne BSA (pH 7,2: 1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA; 50 mM NaCl; 50 mM NaF; 20 µg/ml Aprotinin, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF) lysiert. Die Lysate wurden 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand mit Probenpuffer (2,0 ml Glycerol, 2,0 ml 10% SDS, 0,025 mg Bromphenolblau, 2,5 ml Stacking Gel Buffer (pH 6,8: 6,06 g Tris, 4,0 ml 10% SDS ad 100 ml Aqua dest.), 500 µl β-Mercaptoethanol ad 10 ml Aqua dest.) versetzt und für 3 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurden gleiche Mengen Protein (ca. 30 µg) per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und per Western Blotting mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes Erk 1/2 (anti-p42/44-Erk (Thr-202/Thr204) 1:1000) sowie gegen phosphoryliertes Akt (anti-pAkt-1, 1:1000) untersucht. RasGAP wurde mit dem spezifischen Antikörper Anti-RasGap (1:5000) als interner Standard zur Kontrolle untersucht um sicherzustellen, dass bei den unterschiedlichen Proben gleiche Proteinmengen geladen waren.

#### **2.2.4 DNA-Synthese**

Die quantitative Messung der DNA-Syntheserate erfolgte anhand der Inkorporation des Pyrimidinanalogons 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) in die DNA mittels eines kommerziellen Cell Proliferation ELISA Kits (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Die Zellen wurden in 96-well-Plates ausgesät und bei 90%-iger Konfluenz für 24 Stunden in DMEM synchronisiert. Danach wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rotweinen oder Weißweinen vorbehandelt und für 24 Stunden mit PDGF-BB (50 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde BrdU zu den Proben zugegeben und die Inkubation um weitere 16 Stunden verlängert. Danach wurden die Zellen mit FixDenat fixiert und die DNA gleichzeitig denaturiert (30 min bei RT). Im Anschluss wurden die Proben 90 Minuten lang mit monoklonalen Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen BrdU inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS) mit Hilfe von Tetramethylbenzidin (TMB) entwickelt. Die entsprechende Farbreaktion korrelierte mit der Menge der synthetisierten DNA bzw. mit der Proliferationsantwort der Zellen in entsprechenden Proben. Die Auswertung erfolgte in einem Spektrophotometer (ELISA-Reader, Milenia Kinetic Analyser, Diagnostic Products Corporation).

#### **2.2.5 Chemotaxis**

Die PDGF-abhängige Migration glatter Gefäßmuskelzellen wurde mit Hilfe einer modifizierten 48-well-Boyden-Kammer (NeuroProbe Inc., Baltimore, MD) gemessen (112). Diese Kammer besteht aus zwei Teilen. Die Öffnungen der unteren Kammerhälfte wurden mit Hungermedium (DMEM) sowie 50 ng/ml PDGF-BB bzw. Puffer (HAC/BSA) in An- bzw. Abwesenheit von Rotwein oder Weißwein gefüllt. Zwischen unterer und oberer Kammerhälfte wurde ein mit Kollagen Typ I (50 mg/ml) (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) beschichteter PVP-freier Polycarbonatfilter (Porengröße 8 µm) (Poretics Corp., Livermore, CA) eingebracht. Die obere Kammerhälfte weist durchgehende Öffnungen auf, in die die Zellen eingebracht wurden. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden trypsiniert, gewaschen und im Hungermedium bis zur Konzentration

von  $4 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 50  $\mu$ l in jede Öffnung der oberen Kammerhälfte pipettiert. Für jede getestete Substanz wurde eine achtfach-Bestimmung durchgeführt. Die Kammer wurde dann für fünf Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kammer auseinandergelöst und die Zellen auf der Oberseite des Filters entfernt. Die Zellen auf der Unterseite wurden fixiert und mit Diff-Quick (Baxter Healthcare Corp., Miami, FL) gefärbt. Die Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgte durch Zellzählung repräsentativer Areale unter dem Lichtmikroskop (20x Vergrößerung) mit Hilfe eines 10x10mm Rasters. Pro Versuchsbedingung wurden mindestens vier der acht Bestimmungen ausgewertet. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  S.E.M. aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Die Zellwanderung ist hier primär auf Chemotaxis zurückzuführen, da die Zugabe von PDGF-BB in die oberen Kammeröffnungen zu einer Reduktion der durch den Filter gewanderten Zellen um 70 Prozent führt (112).

### **2.2.6 Quantitative Analyse der Weinkomponenten**

(Durchgeführt von Prof. Dr. rer. nat. H. Dietrich, Institut für Önologie und Getränkeforschung, Forschungsanstalt Geisenheim)

Die quantitative Analyse polyphenolischer Weininhaltsstoffe erfolgte mittels HPLC (High performance liquid chromatography) (Pour Nikfardjam *et al.*, 1999). Eine Merck-Hitachi L-6200 Pumpe wurde mit einem UV/VIS-Wellenlängen-Detektor (ERC-7217) verbunden. Eine „Merck reversed-phase LiChroCART 100RP-18“-Säule (5  $\mu$ m, 3 i.d. x 250 mm lang) wurde zur analytischen Separation herangezogen. Die Wellenlänge betrug 280 nm. Die Chromatographie wurde bei einer Fluß-Rate von 0,5 ml/min und Raumtemperatur mit einem Wasser/Ameisensäure/Acetonitril-Gradienten durchgeführt. Das injizierte Volumen betrug 10  $\mu$ l, die Retentionszeiten für Gallussäure, Catechin und Epicatechin waren 7, 28 und 40 Minuten. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe einer externen Standardisierung durchgeführt.

## 2.2.7 Statistik

Alle quantitativen Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht-parametrischer Analyse. Statistische Signifikanz wurde angenommen für  $P < 0.05$ .

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Rotwein inhibiert die PDGF-BB-induzierte Tyrosinphosphorylierung des $\beta$ -PDGF-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup> Maus

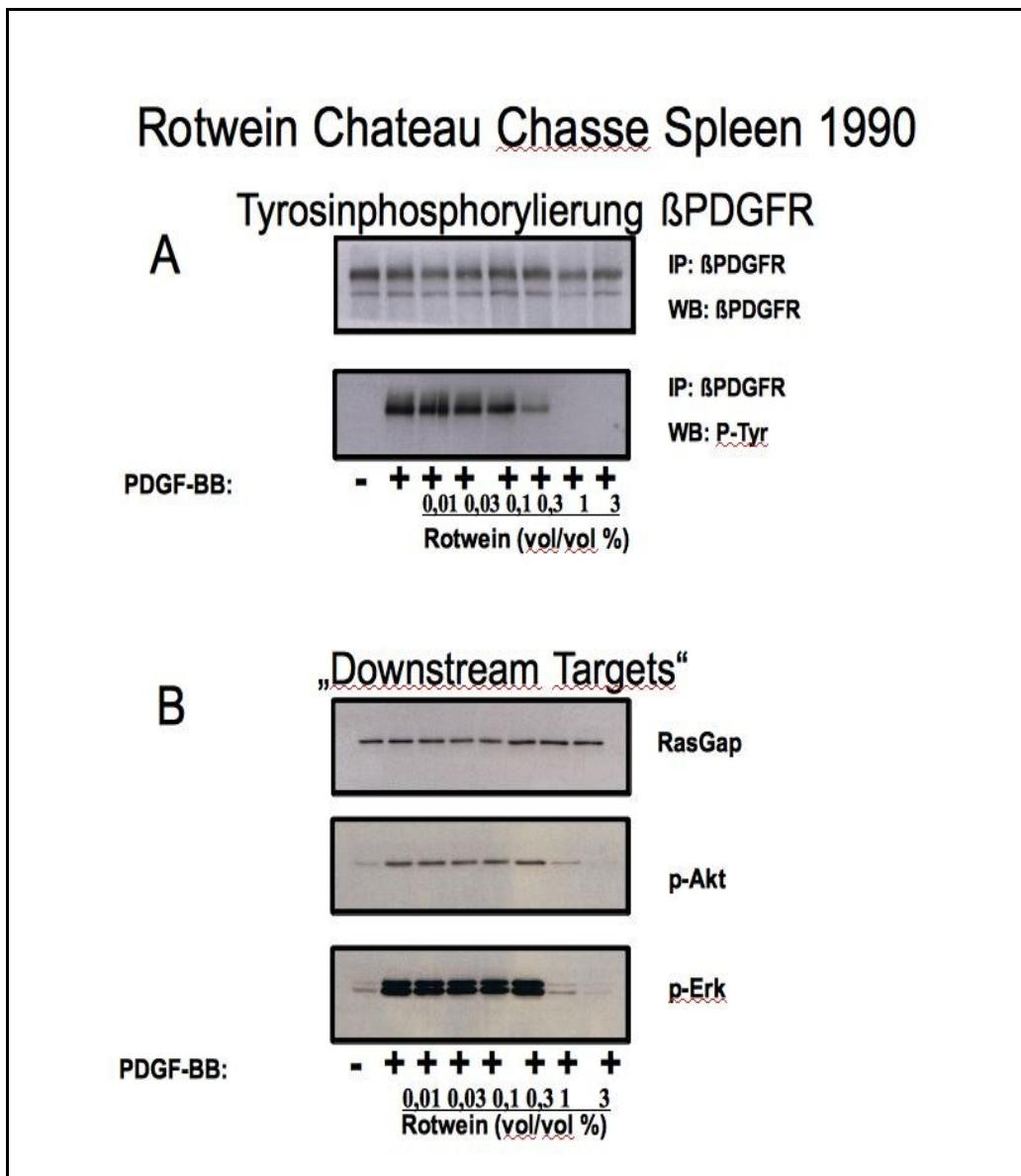
Um einen inhibierenden Effekt des Rotweins auf die ligandeninduzierte Aktivierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors glatter Gefäßmuskelzellen der Maus nachzuweisen, untersuchten wir die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors in Anwesenheit von Rotwein (Chateau Chasse Spleen) und Weißwein (Chateau Lamothe de Haux). Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rotwein oder Weißwein vorinkubiert und dann mit PDGF-BB (50 ng/ml) für 5 Minuten bei 37 ° C stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde der  $\beta$ -PDGF-Rezeptor immunpräzipitiert und mittels Western Blot mit Antikörpern gegen Phosphotyrosin bzw.  $\beta$ -PDGF-Rezeptor analysiert. Der obere Blot in Abbildung 7A zeigt den  $\beta$ -PDGF-Rezeptor und dient als Nachweis, daß gleiche Mengen an Rezeptor in den einzelnen Proben vorhanden waren. Der untere Blot in der Abbildung 7A zeigt die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors. Hier zeigt sich bei einer Vorinkubation mit einer Rotwein-Konzentration von 0,3 % vol/vol eine teilweise Inhibition. Ab einer Rotwein-Konzentration von 1% vol/vol kam es zu einer kompletten Hemmung der ligandeninduzierten Phosphorylierung des Rezeptors.

Abbildung 8 zeigt die Effekte von Weißwein auf die PDGF-BB induzierten Prozesse in glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup>Maus. Auch hier sieht man im oberen Blot der Abbildung 8 A gleiche Mengen an Rezeptor in jeder Probe.

Hier zeigt sich bei einer Vorinkubation mit Weißwein-Konzentrationen von 0,01 bis 3 % vol/vol jedoch keine Hemmung der Liganden-induzierten Aktivierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors.

### **3.2 Inhibition von PDGF induzierten „downstream“ Signaltransduktionskaskaden durch Rotwein**

Die Aktivierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptor führt zur Bindung von Signalmolekülen an die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors und dies führt zur transienten Aktivierung von MAP-Kinasen (extracellular regulated kinase 1/2; Erk 1/2) und Akt. Diese Prozesse haben eine entscheidende Bedeutung für PDGF-induzierte zelluläre Reaktionen wie Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen. Deshalb wurden die Wirkung von Rotwein und Weißwein auf die PDGF-induzierte Phosphorylierung von Akt sowie der MAP-Kinase-Isoformen p42<sup>MAPK</sup> und p44<sup>MAPK</sup> (Erk 1/2) untersucht. Wie Abbildung 7B zeigt, hemmt Rotwein die Phosphorylierung der MAP-Kinase-Isoformen p42<sup>MAPK</sup> und p44<sup>MAPK</sup> (Erk 1/2) und Akt ab einer Konzentration von 1 % vol/vol. Die Vorinkubation mit Weißwein hingegen hatte keinen inhibitorischen Effekt (Abbildung 8B). RasGAP diente hierbei als interne Kontrolle zum Nachweis gleich großer Proteinmengen.

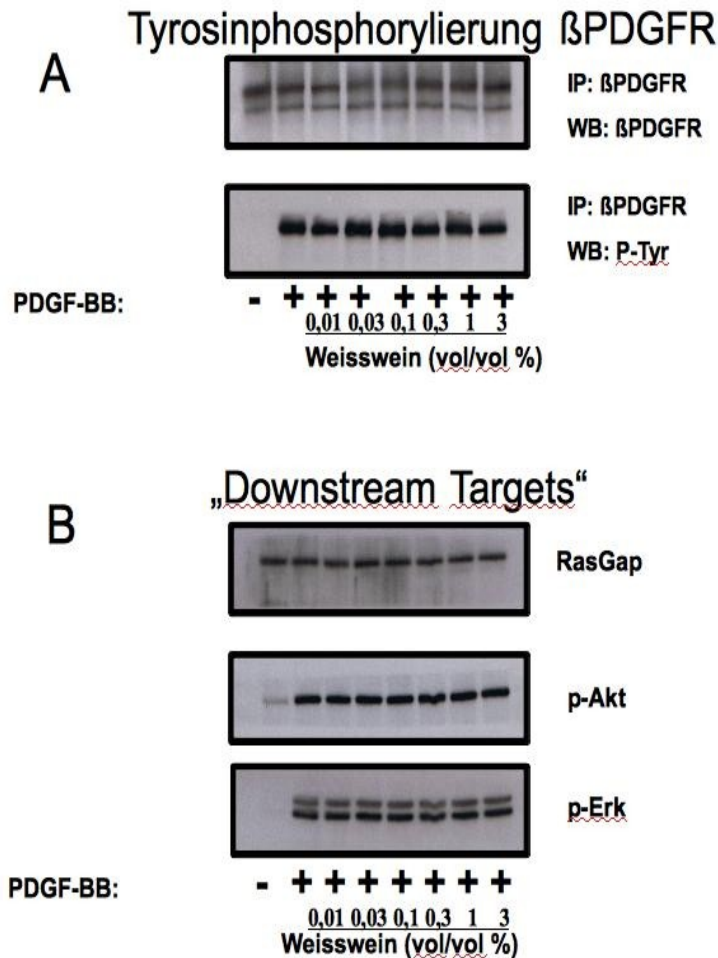


**Abb. 7: Konzentrationsabhängige Effekte von Rotwein auf die ligandeninduzierte Phosphorylierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors und die PDGF induzierte Aktivierung von „downstream“ Signaltransduktionskaskaden.**

A: representative Phosphotyrosin- (P-Y) und  $\beta$ -PDGF-Rezeptor- Western Blots von Immunpräzipitaten des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors aus glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup> Maus nach Vorinkubation mit Rotwein (0,01-3,0% vol/vol) und Stimulation mit PDGF-BB (50 ng/ml). B: representative p-Akt und p-Erk- Western Blots von Lysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup> Maus nach Vorinkubation mit Rotwein (0,01-3,0% vol/vol) und Stimulation mit PDGF-BB (50 ng/ml).



## Weisswein Chateau Lamothe de Haux 2006



**Abb. 8:** Konzentrationsabhängige Effekte von Weißwein auf die ligandeninduzierte Phosphorylierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors und die PDGF-induzierte Aktivierung von „downstream“ Signaltransduktionskaskaden.

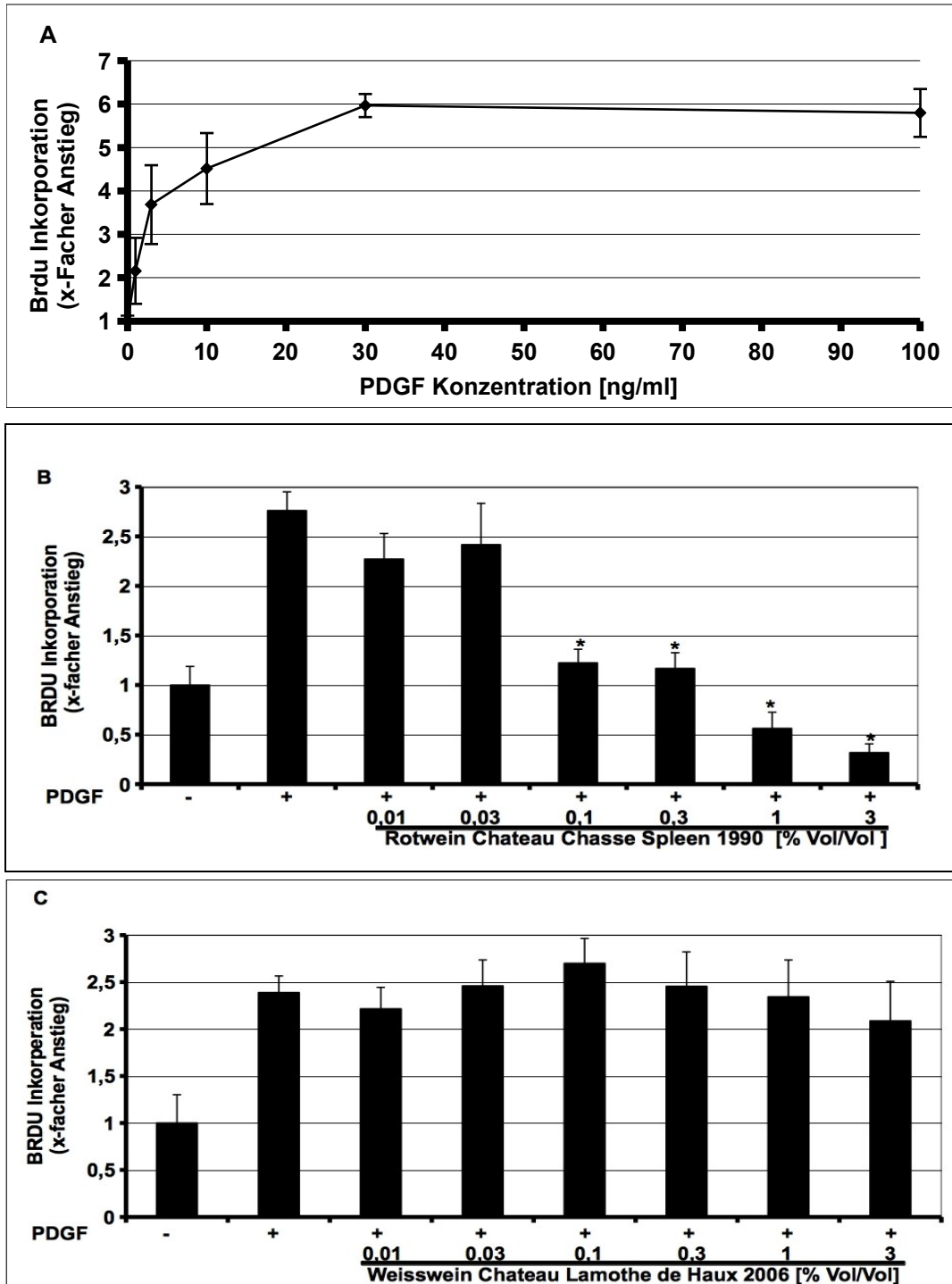
A: representative Phosphotyrosin- (P-Y) und  $\beta$ -PDGF-Rezeptor- Western Blots von Immunpräzipitaten des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors aus glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup> Maus nach Vorinkubation mit Weißwein (0,01-3,0% vol/vol) und Stimulation mit PDGF-BB (50 ng/ml). B: representative p-Akt und p-Erk- Western Blots von Lysaten aus glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup> Maus nach Vorinkubation mit Weißwein (0,01-3,0% vol/vol) und Stimulation mit PDGF-BB (50 ng/ml).

### **3.3 Inhibition PDGF-BB vermittelter zellulärer Reaktionen in glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup> Maus durch Rotwein**

#### **3.3.1 Proliferation**

Um die Effekte von Rot- bzw. Weißwein auf die PDGF-induzierte Proliferation von Maus-VSMC aus LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen zu untersuchen, wurde die DNA-Syntheserate nach PDGF-Stimulation anhand der Inkorporation des Pyrimidinanalogs 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) in die DNA gemessen. Zunächst wurde eine Dosis-Wirkungskurve für PDGF ermittelt. Die Zellen wurden hierfür mit verschiedenen PDGF-BB-Konzentrationen stimuliert und die BrdU-Inkorporation mittels ELISA gemessen. Abbildung 9A zeigt, dass es durch die Stimulation mit PDGF-BB zu einer konzentrationsabhängigen BrdU-Aufnahme kam. Der Maximaleffekt wurde bei 30ng/ml PDGF-BB erzielt (5,97±0,65 -facher Anstieg).

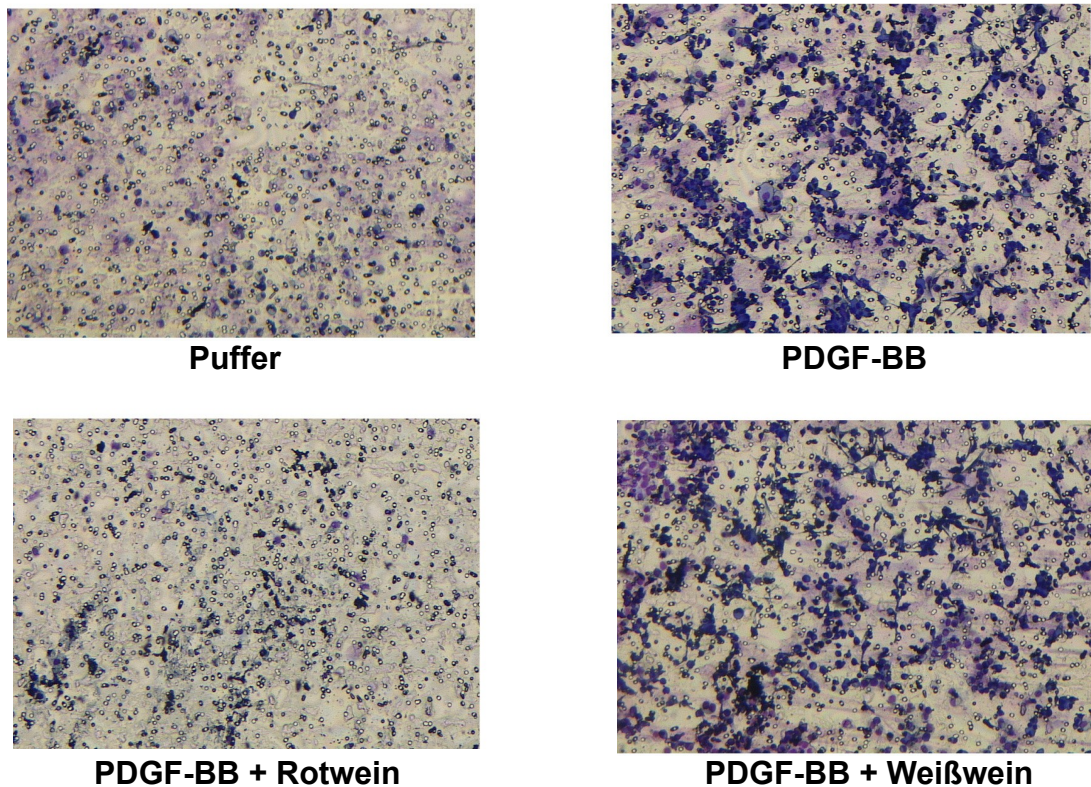
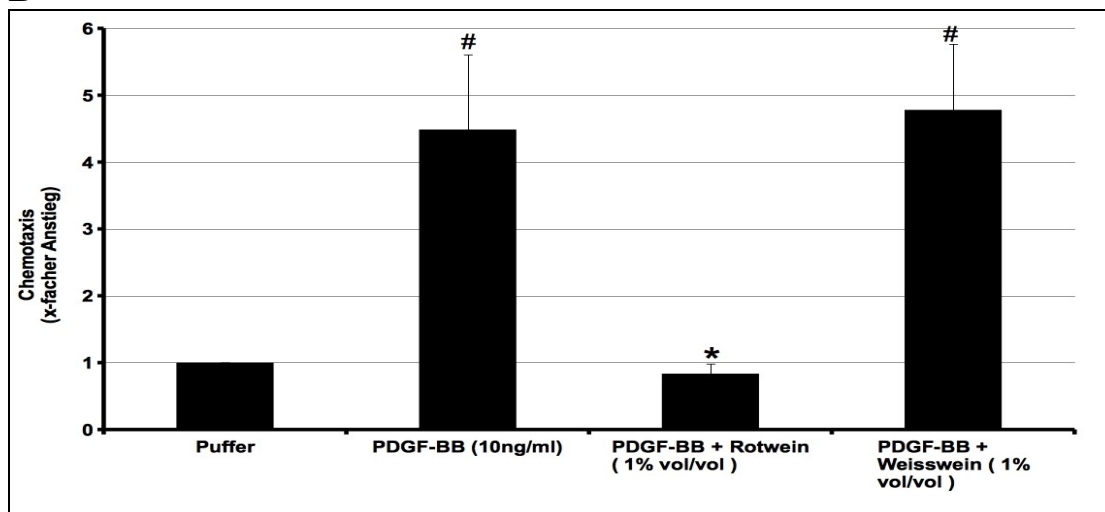
Bei einer gesättigten Konzentration von PDGF (50 ng/ml) und in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Rotwein zeigte sich eine Inhibition der PDGF induzierten Antwort ab einer Rotweinkonzentration von 0,1 % vol/vol (Abbildung 9B). Eine komplette Hemmung wurde bei einer Konzentration von 1 % vol/vol erzielt. Die Vorinkubation mit Weißwein führte hingegen zu keinem wesentlichen inhibierendem Effekt (Abbildung 9C).



**Abb. 9: Konzentrationsabhängige Effekte von PDGF-BB, Rot- und Weisswein auf die PDGF-abhängige Proliferation.** Die Messung der Proliferation erfolgte mittels BrdU-Inkorporation nach PDGF-BB-Stimulation (50 ng/ml) mit und ohne Rot-/Weisswein in verschiedenen Konzentrationen (0,01-3,0 % vol./vol.). Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte  $\pm$ SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (\* $P < 0,01$  gegen PDGF-BB)

### 3.3.2 Chemotaxis

Die Messung der PDGF-induzierten Chemotaxis erfolgte mittels einer modifizierten Boydenkammer. Die ausgezählten Zellen sind hierbei durch einen kollagenbeschichteten Polycarbonatfilter gegen einen PDGF-BB-Gradienten gewandert. Wie in Abbildung 10 A und B gezeigt wird, kam es nach Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-BB im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu einem Anstieg der Migration auf das  $4,49 \pm 1,94$ -fache ( $P < 0,05$ ). Die Anwesenheit von Rotwein (1% vol/vol) führte konzentrationsabhängig zur vollständigen Inhibierung der PDGF-induzierten Migration (komplette Hemmung bei 1,0%vol/vol. Die Anwesenheit von Weißwein führte hingegen zu keiner signifikanten Inhibition der PDGF-abhängigen Zellwanderung (Abbildung 10 A und 10 B).

**A****B**

**Abb. 10: Konzentrationsabhängige Effekte von Rotwein und Weisswein auf die PDGF-induzierte Chemotaxis von glatten Gefäßmuskelzellen der LDLR<sup>-/-</sup> Maus.** Nachdem die Zellen trypsinisiert, gewaschen und gehungert wurden, wurde die Chemotaxis mittels einer modifizierten Boydenkammer gemessen. Als chemotaktischer Reiz diente PDGF-BB (10 ng/ml) in An- bzw. Abwesenheit von Rot- und Weißwein (1 % vol/vol). A: repräsentative Original-Bilder der Filtermembran eines Versuches vom 02.10.2007. B: Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten zur PDGF-induzierten Zellmigration (\*P<0,05 gegen PDGF-BB; #P<0,05 gegen Puffer)

### **3.4 Analyse der nichtalkoholischen Weininhaltsstoffe des Rot- und Weißweins**

Vorarbeiten haben gezeigt, daß Rotweine im Vergleich zu Weißweinen eine höhere Gesamtmenge an Polyphenolen (113, 124) enthielten. Außerdem ließ sich ein inhibierender Effekt der in Rotwein und Grünen Tee vorkommenden polyphenolischen Inhaltsstoffe auf die PDGF-abhängige Signaltransduktion in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte nachweisen (13, 113). Um auch in den hier verwendeten Weinen die Substanzen zu indentifizieren, die für die hemmenden Effekte des Rotweins auf die  $\beta$ -PDGF-Rezeptor-Aktivierung verantwortlich sind, wurden die polyphenolischen Bestandteile sowie die Farbstoffe in Rot- und Weißwein mittels HPLC (high performance liquid chromatography) quantitativ analysiert. Tabelle 1 zeigt, dass die Gesamtmenge der Polyphenole, die den Hauptanteil der Tannine ausmachen, wie erwartet beim Chateau Chasse Spleen (Rotwein) deutliche höher ausfällt als beim Chateau Lamothe de Haux (Weißwein). Erhebliche Unterschiede zeigen sich bei Gallussäure und Flavonoiden der Catechin-Familie, wie (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und Procyanidin B<sub>2</sub>, welche nur im Rotwein in relevanten Konzentrationen nachzuweisen waren. Der Rotwein hat aufgrund seines Alters keine freien (monomeren) Anthocyane mehr. Die antioxidative Kapazität ist aber recht hoch, was auf die Bildung von sog. polymeren Anthocyanen hindeutet.

		Château Lamothe	Château Chasse-Spleen
Land		Frankreich	Frankreich
Region		Bordeaux	Bordeaux
Jahrgang		2006	1990
Dichte	20/20	0,9927	0,99317
Gesamtalkohol	g/L	94,2	103,1
Gesamtalkohol	% Vol	11,9	13,1
Alkohol vor.	g/L	92,4	102,3
Alkohol vor.	% Vol	11,7	13
Alkohol dekl.	% Vol	12	12,8
Gesamtextrakt	g/L	21,2	26,1
reduktionsfreier Extrakt	g/L	17,2	24,3
reduzierende Zucker	g/L	4,0	1,7
Glucose	g/L	0,3	<0,1
Fructose	g/L	3,1	0,8
pH		3,41	3,87
Gesamtsäure	g/L	4,33	4,86
Weinsäure	g/L	1,07	1,72
Milchsäure	g/L	n.n.	2,16
Äpfelsäure	g/L	2,1	0,1
flüchtige Säure	g/L	0,41	0,62
Glycerin	g/L	5,43	7,87
Antioxidative Kapazität (Teac, ABTS Radikal)	mmol/L Trolox	4,5	32,5
Gesamtphenole (Folin)	mg/L	259	2511
HPLC Phenole			
Gallussäure	mg/L	n.n.	21,6
Protocatechuesäure	mg/L	2,1	0,0
B1	mg/L	1,6	5,0
Tyrosol	mg/L	5,9	14,3
Catechin	mg/L	0,0	5,9
B2	mg/L	0,0	1,8
Caftarsäure	mg/L	7,0	3,0
GRP	mg/L	4,8	0,0
Coumaroylderivat	mg/L	0,6	0,0
Kaffeesäurederivat	mg/L	7,3	8,6
Coutarsäure	mg/L	0,0	0,9
Coumarsäure	mg/L	1,1	2,7
Summe HPLC Phenole	mg/L	30,4	64,0
keine Anthocyane			
keine Piceide			
Monomerindex			0,3

**Tab. 1: Quantitative Analyse der polyphenolischen Inhaltsstoffe der getesteten Weine (Prof. Dietrich, Institut für Önologie und Getränkeforschung, Forschungsanstalt Geisenheim)**

## 4. Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Effekte von Rotwein (Chateau Chasse Spleen 1990) und Weißwein (Chateau Lamothe de Haux 2006) auf PDGF-vermittelte Prozesse in glatten Gefäßmuskelzellen aus LDL-Rezeptor-knockout Mäusen. Im Einklang mit den bereits bekannten Effekten in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte und humanen glatten Gefäßmuskelzellen (2, 91, 113, 124) zeigte sich ein inhibierender Effekt von Rotwein auf die Liganden-induzierte Aktivierung des PDGF-Rezeptors, die Phosphorylierung der downstream gelegenen Signaltransduktionsmoleküle Akt und MAPK (Erk1/2) und PDGF-induzierte zelluläre Reaktionen, wie Proliferation und Migration. Hierbei zeigte sich bei der Aktivierung des PDGF-Rezeptors und allen untersuchten PDGF-induzierten Prozesse eine vollständige Inhibition ab einer Rotweinkonzentration von 1 % vol/vol, entsprechend den Effekten bei vorherigen Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte (113, 124). Im Gegensatz dazu vermittelte Weißwein keine inhibierenden Effekte auf die Signaltransduktion von PDGFR. Weinanalysen der verwendeten Weine ergaben, dass der Rotwein einen weitaus höheren Polyphenolgehalt hatte als der Weißwein. Insbesondere zeigte sich eine weitaus höhere Konzentration an Flavonoiden der Catechinfamilie. Vorangehende Arbeiten hatten gezeigt, dass diese Inhaltsstoffe inhibierend auf PDGFR-Signaling wirken (113, 124). Die erzielten Ergebnisse bieten die Voraussetzungen für *in vivo* Studien zur Atherogenese am LDL-Rezeptor-knockout Mausmodell.



## 4.1 Mechanismus und Bedeutung der Inhibition der $\beta$ -PDGF-Rezeptor induzierten Signalübertragung durch Rotwein

Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass Rotwein im Gegensatz zu Weißwein einen inhibierenden Effekt auf die PDGF-Rezeptor Aktivierung und PDGF-induzierte atherogene zelluläre Reaktionen *in vitro* ausübt.

Diese inhibierende Wirkung des Rotweins kann am ehesten den gegenüber Weißwein höheren Konzentrationen an Flavonoiden der Catechinfamilie zu geschrieben werden (113, 124). Dies sind hydrophobe Stoffe, welche einen gewissen Alkoholgehalt benötigen, um in Lösung zu gehen. Durch die bei Rotwein stattfindende Maischegärung besteht eine längere Kontaktzeit des Mostes mit Traubenschalen und Traubenkernen und eine ständig steigende Alkoholkonzentration. So entsteht eine gegenüber Weisswein erhöhte Konzentration an Flavonoiden im Rotwein (113, 124). Durch Simulation der Maischegärung (Inkubation mit Traubenkernschrot) konnten Weißweine nachträglich mit Polyphenolen angereichert werden, was dann mit einer dem Rotwein ähnlichen Inhibition der  $\beta$ -PDGF-Rezeptor vermittelten Signalwege einherging (124). Zusätzlich konnte für polyphenolangereicherten Weißwein eine Wiederherstellung der beeinträchtigten antioxidativen Kapazität in einem Tiermodell gezeigt werden (82). Für Flavonoide der Catechinfamilie konnte sowohl eine direkte Hemmung des Signalling des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors nachgewiesen werden (2, 113), als auch eine Hemmung der Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch die Basalmembran (91). Unter Verwendung von radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB konnte für Rotwein-Flavonoide eine Inhibition der Bindung von PDGF-BB an den  $\beta$ -PDGF-Rezeptor gezeigt werden (124). Zusätzlich konnte in einer weiteren Studie eine Inhibition der Proliferation und Migration von menschlichen glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta durch eine ATP-kompetitive Bindung von Piceatannol, einem Metabolit des Rotweinpolyphenols Resveratrol, an die PI3Kinase gezeigt werden(26). Somit lässt sich die Inhibition der PDGF-BB-induzierten Tyrosinphosphorylierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptor durch Rotwein sowohl durch eine Verhinderung der Bindung von PDGF-BB an den Rezeptor als auch durch

ein Deaktivieren der intrazellulären Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors erklären.

In der komplexen Pathogenese der Atherosklerose, sowie der Restenosebildung nach koronarem Stenting und Katheterintervention spielt die Aktivierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors und die PDGF-induzierte Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle (63, 89, 114, 119, 131). Obwohl es schwierig ist, bei diesem komplexen *in vivo* Prozess die Rolle des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors als einer einzelnen von vielen beteiligten Tyrosinkinasen hervorzuheben, zeigen zahlreiche Studien übereinstimmend, dass die gezielte Inhibition der  $\beta$ -PDGF-Rezeptor Signalkaskade eine Reduktion der Neubildung und des Fortschreitens von atherosklerotischen Plaques zur Folge hat.

PDGF und PDGF-Rezeptoren sind in atherosklerotischen Plaques deutlich heraufreguliert (89, 114, 131) und  $\beta$ -PDGF-Rezeptoren wiesen in menschlichen Atherektomieproben eine ausgeprägte Tyrosinphosphorylierung (Aktivierung) auf (1). In weiteren Studien zeigte eine spezifische Inhibierung des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors eine Reduzierung der Neointimaformation *in vivo* (16, 17, 18, 33, 45, 60, 117). So führte die Injektion eines monoklonalen Antikörpers in Apolipoprotein E-defiziente Mäuse, um den  $\beta$ -PDGF-Rezeptor zu blockieren, zu einer Reduzierung von zum einen der Fläche atherosklerotischer Plaques in der Aorta sowie der Zahl intimaler glatter Gefäßmuskelzellen um 67% bzw. 80% (117). Zu vergleichbaren Ergebnissen führte die Injektion eines chimären anti- $\beta$ -PDGF-Rezeptor-Antikörpers nach Katheterintervention, welche eine Reduktion der Intimafläche sowie der Intima/Media-Ratio in nichtmenschlichen Primaten um 53% bzw. 40% zur Folge hatte (60). Schließlich führte die Gabe von Tyrosinkinaseinhibitoren des PDGF-Rezeptor *in vivo* in unterschiedlichsten *in vivo* Modellen zu einer Reduktion der Plaquefläche, der VSMC-Einwanderung und der Neointimaformation (16, 17, 18, 45). Gleichzeitig zeigte sich in einem genetischen Modell, dass die Ausschaltung der  $\beta$ -PDGR-vermittelten PI3K- und PLC $\gamma$ -Aktivität *in vivo* zu einer deutlichen Reduktion der Neointima-Bildung führte (21).

Somit zeigen diese Studien zusammengenommen, dass die Inhibition der  $\beta$ -PDGF-induzierten Prozesse durch Rotwein einen wirksamen Ansatz zur Prävention der Neubildung und des Fortschreitens von Atherosklerose darstellt.

## **4.2 Weitere Effekte von Rot- und Weißweinen auf molekulare Mechanismen der Atherogenese und das Lipidprofil im Serum**

Diverse epidemiologische Studien zeigen eine inverse Relation zwischen gemäßigttem Weinkonsum und der kardiovaskulären Mortalität (31, 36, 39, 47, 56). Die vorliegende Studie zeigt eine inhibierende Wirkung von Rotwein auf PDGF-vermittelte Mechanismen der Atherogenese. Neben diesem Mechanismus konnten auch diverse weitere Effekte von Rot- und Weißweinen auf molekulare Mechanismen der Atherogenese gezeigt werden. So konnten in *in vitro*-Studien spezifische Wirkungen von Rot- und Weißweinen auf zelluläre Mechanismen inklusive Genexpression von MCP 1, Cyclin A, MMP-2, eNOS, ET-1 und monocyte tissue factor, sowie Thrombogenität, Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, Reduktion der Neointima-Bildung und Vasorelaxation von Koronararterien nachgewiesen werden (24, 29, 43, 47, 65, 86, 101, 103, 137). Einige dieser Arbeiten machten auch Polyphenole des Rotweins für ihre Ergebnisse verantwortlich. Andere Studien untersuchten hingegen direkt die positiven Effekte von Polyphenolen auf Atherosklerose fördernde bzw. hemmende zelluläre Mechanismen wie die Apoptose von Kardiomyozyten, dem Schutz vor oxidativem Stress, die NO-abhängige Vasodilatation und die endotheliale Exozytose (46, 121, 143). Ausserdem konnte für die Langzeiteinnahme des Flavonoids Anthocyanin ein Schutz vor Reperfusionsschäden an Kardiomyozyten nach temporärer Ischämie nachgewiesen werden (132).

Weitere wichtige Effekte von Wein und seinen Inhaltsstoffen sind die Modulation des Lipidprofils und antioxidative Effekte (47, 113, 122). So zeigten verschiedene Studien eine Konzentrationserhöhung von HDL-Cholesterin bei regelmäßigem Alkoholkonsum (100), und eine andere demonstrierte, dass Rotweinkonsum zu einem Anstieg der antioxidativen Aktivität im Serum führt, welches eine Minderung der LDL-Oxidierung und somit eine Reduzierung der proatherogenen Wirkung von LDL-Cholesterin zur Folge hat (49). Weitere Studien bestätigten die effektive Hemmung der LDL-Oxidierung durch Weinpolyphenole (15, 73, 93, 134) und zeigten, dass diese weitgehend alkoholunabhängig ist (14, 110). Somit ließen sich die hemmenden Effekte des

Rotweins auf die Atherogenese sowohl durch die in diesen Studien untersuchten Effekte auf den PDGF-Rezeptor als auch durch diverse weitere Effekte erklären.

### **4.3 Bedeutung und Mechanismen der kardioprotektiven Effekte von Rotwein und seiner Komponenten *in vivo***

Wie bereits beschrieben, erklären die vorliegende als auch zahlreiche weitere Studien die kardioprotektiven Effekte des Rotweins mit seinem Gehalt an speziellen Flavonoiden der Catechinfamilie. Die inhibitorischen Effekte verschiedener Rotweine auf speziell das PDGF-Signalling korrelieren mit ihrem Gehalt an diesen Flavonoiden (113, 124). Dem entsprechend ließen sich, in der hier vorliegenden Studie, die Flavonoide der Catechin-Familie, wie (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und Procyanidin B2 nur im Rotwein (Chateau Chasse Spleen) und nicht im Weißwein (Chateau Lamothe) in relevanten Konzentrationen nachweisen. Entscheidend für einen möglichen kardioprotektiven Effekt *in vivo* ist demnach die Bioverfügbarkeit dieser Polyphenole. In einer Bioverfügbarkeitsstudie am Menschen wurden Catechin-Serumspiegel von ca. 600 µg/l nach Rotweingenuß (ca. 2 Gläser) nachgewiesen (115). Die Konzentration an Catechin, der hier vorliegenden Studie, im Nährmedium der Zellen lag nach Zugabe von 1,0% vol/vol Rotwein bei ca. 59 µg/l. Somit erreichen wir *in vitro* ähnliche Konzentrationen wie *in vivo* nach moderatem Weinkonsum. Weitere Studien bestätigen diese relevanten Konzentrationen von Catechinen nach Weinkonsum (40). Basierend auf quantitativen Analysen von französischen Weinen und dem bekannten durchschnittlichen Weinkonsum von 180ml/Tag/Person lässt sich ausserdem eine tägliche durchschnittliche Aufnahme der wichtigsten Weincatechine (Catechin, Epicatechin und Procyanidin B1-B4) für die Bevölkerung Frankreichs auf 5mg/Person/Tag für Weissweintrinker und 32 mg/Person/Tag für Rotweintrinker berechnen (83).

*In vivo* konnte für Catechine auch eine entscheidende Rolle in der Hemmung der Atherogenese in tierexperimentellen und epidemiologischen Studien nachgewiesen werden. So konnte in einem Apolipoprotein-E-defizienten Mausmodell nach Rotwein- bzw. Catechinaufnahme eine Flächenreduktion von atherosklerotischen Läsionen um 48% bzw. 39% gezeigt werden (61). Des Weiteren führte die orale Aufnahme von einem Catechingemisch aus EC, ECG, EGCG, EGC und GCG in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen zu einer Reduzierung von atherosklerotischen Veränderungen um 23% (94). Auch die Aufnahme von Epigallocatechingallat inhibierte die Bildung von atherosklerotischen Läsionen in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen. In einer Fall/Kontrollstudie führte eine tägliche Aufnahme von durchschnittlich 21 mg Flavonoiden zu einer Reduktion des kardiovaskulären Risikos um 24% (81). Hierbei erfolgte die Aufnahme sowohl durch Wein als auch durch grünen Tee (81). Die Zutphen Elderly Studie zeigte bereits 2001 an Hand einer langzeit prospektiven Kohortenstudie mit 806 Männern zwischen 65 und 84 Jahren eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme von Catechin und der kardiovaskulären Sterblichkeit (13). Diese inverse Beziehung bestätigte sich 2009 nach Fortführung der Studie mit 1373 Männern. Auch hier konnte ein deutlich gesenktes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und niedrigere Sterblichkeit nach 40 jährigen moderaten Weinkonsum gezeigt werden. Unabhängig vom sozioökonomischen Status der Männer war die Lebenserwartung im Durchschnitt um 5 Jahre verlängert bei Langzeitweinkonsum von etwas weniger als einem Glas Wein pro Tag (128). Ähnlich ließe sich auch durch die Catechinaufnahme die PRIME-Studie erklären, welche einen inversen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und kardiovaskulärem Risiko in Frankreich, einem Land mit vielem Rotweinkonsum, nachweist, während in Nordirland, wo der Rotweinkonsum deutlich niedriger ist, kein relevanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte (92). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine Studie, in der finnische Männer mit dem höchsten Langzeitkonsum an Flavonol und Flavan-3-ol ein deutlich gesenktes Risiko für ischämische Schlaganfälle und eine reduzierte kardiovaskuläre Mortalität aufwiesen (96). Somit konnten sowohl *in vivo* als auch in epidemiologischen Studien positive Zusammenhänge zwischen Rotweinkonsum bzw. Flavonoidaufnahme gezeigt werden.

#### **4.4 Fazit: Inhibierung $\beta$ -PDGF-Rezeptor-vermittelter Signalwege durch Rotwein in glatten Gefäßmuskelzellen-Eine Erklärung für das „French Paradoxon“?**

In der hier vorliegenden Arbeit als auch in diversen anderen in vitro Studien ließen sich Prozesse nachweisen, welche einen positiven Effekt auf die Atherogenese bedeuten könnten. Auch in vivo und in epidemiologischen Studien lässt sich dieser, den in Rotwein enthaltenen Flavonoiden zugeschriebene, Effekt wiederholt bestätigen. Doch diese positiven Einflüsse sind viel vielfältiger als die hier untersuchten Effekte von Rotwein auf die  $\beta$ -PDGF-Rezeptor-vermittelter Signalwege und müssen sicherlich kombiniert betrachtet werden. Desweiteren gibt es auch einige epidemiologische Studien, die ähnliche Zusammenhänge zwischen Rotwein/Flavonoidkonsum und kardiovaskulärer Mortalität oder eine besondere Wirkung von Rotwein verglichen zu anderem moderatem Alkoholkonsum nicht bestätigen können (48, 77, 90, 95, 102, 108). Zusätzlich hierzu ist die Studienlage zu diesem Thema in vivo noch nicht ausreichend und der Metabolismus und die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden noch nicht vollständig geklärt (37). Abschließend sollte man mit der Empfehlung, Rotwein als Präventionsmittel für Atherosklerose propagieren äußerst vorsichtig sein, da Alkohol in großen Mengen eindeutig schädlich ist, und da der kausale Zusammenhang zwischen Rotweinkonsum und kardiovaskulärer Sterblichkeit im Rahmen von Studien nicht zu belegen ist (90). Dies gilt vor allem bei Patienten, bei denen auf Grund von Vorerkrankungen wie der Leberzirrhose oder potentieller Polytoxikomanie, regelmäßiger Alkoholkonsum komplett vermieden werden sollte. Bei gesunden Patienten scheint jedoch eine Empfehlung zu einem Glas Rotwein pro Tag zur Mahlzeit im Hinblick auf das kardiovaskuläre Risiko gerechtfertigt zu sein (102).

## 5. Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz/Kreislaufsystems, hierunter vor allem die durch Atherosklerose bedingte ischämische Herzkrankheit, sind weiterhin die häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. In der Entstehung der Atherosklerose spielt neben der Ablagerung von oxidiertem Low density Lipoprotein auch die durch Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-vermittelte Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) in die Gefäßintima eine wichtige Rolle. Entscheidend für die Induktion der PDGF-abhängigen zellulären Prozesse ist die liganden-induzierte Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung des Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)  $\beta$ -Rezeptors und die anschließende Rekrutierung von ‚downstream‘ gelegener Signalmoleküle.

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigten, dass die Prävalenz der koronaren Herzkrankheit in Frankreich trotz vergleichbarer Cholesterinaufnahme deutlich niedriger als in den europäischen und amerikanischen Staaten ist („French Paradoxon“). Dieser Effekt wird vor allem dem gemässigten Rotweinkonsum zu geschrieben. Ein protektiver Effekt von gemässigtem Alkohol- bzw. Rotweinkonsum in Hinblick auf die Atherogenese wurde in vielen Arbeiten beschrieben.

Der positive Effekt von Rotwein, wird vor allem den Polyphenolen zu geschrieben, welche sich durch die Maischegärung im Rotwein anreichern.

Die hier vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Effekte von Rotwein und Weißwein auf PDGF-vermittelte Prozesse in VSMC der Maus. Die hier verwendeten VSMC stammen von LDL-Rezeptor-knockout Mäusen, um die nötigen Voraussetzungen für spätere *in vivo* Studien am Atherosklerose-Modell der LDL-Rezeptor-knockout Maus zu schaffen.

Es konnte gezeigt werden, dass der hier verwendete Rotwein (Château Chasse Spleen, Moulis, Bordeaux, 1990) in der Lage war, die ligandeninduzierte Tyrosinphosphorylierung (Aktivierung) des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors, die PDGF-induzierte Erk- und Akt-Phosphorylierung, sowie PDGF-abhängige zelluläre Reaktionen (Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen) konzentrationsabhängig zu inhibieren, während Weißwein (Château Lamothe de Haux, Bor-

deaux, 2006) nicht in der Lage war, das PDGF-Rezeptor-Signaling zu beeinflussen. Für Rotwein konnte in Weinanalysen im Gegensatz zu Weißwein ein hoher Gehalt an Flavonoiden nachgewiesen werden, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie PDGF-induzierte Effekte in VSMC inhibieren. Aus den gezeigten Ergebnissen kann gefolgert werden, dass Rotwein, mutmaßlich durch den hohen Gehalt an Flavonoiden, die PDGF-induzierte Signaltransduktion in VSMC inhibiert und vor atherogenen Gefäßveränderungen schützt. Die Daten liefern somit eine molekulare Erklärung für das „French Paradoxon“ und liefern die Grundlage für weitergehende *in vivo* Untersuchungen.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Abe J, Deguchi J, Takuwa Y, Hara K, Ikari Y, Tamura T, Ohno M, Kurokawa K. Tyrosine phosphorylation of platelet-derived growth factor  $\beta$  receptors in coronary artery lesions: Implications for vascular remodelling after directional coronary artherectomy and unstable angina pectoris. *Heart* 1998; 79: 400-406.
2. Ahn H-Y, Hadizadeh KR, Seul C, Yun Y-P, Vetter H, Sachinidis A. Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol. Biol. Cell* 1999; 10: 1093-1104.
3. Ajani UA, Gaziano JM, Lotufo PA, Liu S, Hennekens CH, Buring JE, Manson JE. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease by diabetes status. *Circulation* 2000; 102: 500-505.
4. Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1972; 260: 689-707.
5. Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM, Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation* 1999; 100: 944-950.
6. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 2003; 107(3):443-7.

7. Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci.* 2003; 73(22): 2883-98.
8. Anderson RG, Brown MS, Goldstein JL. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 1977; 10: 351-64.
9. Anderson RG, Goldstein JL, Brown MS. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976; 73: 2434-38..
10. Anderson RG, Goldstein JL, Brown MS. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* 1977; 270: 695-99.
11. Anderson RG, Vasile E, Mello RJ, Brown MS, Goldstein JL. Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution. *Cell* 1978; 15: 919-33.
12. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008; 22: 1276-312.
13. Arts ICW, Hollman PCH, Feskens EJM, Bueno de Mesquita HB, Krombhout D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74: 227-232.

14. Auger C, Caporiccio B, Landrault N, Teissedre PL, Laurent C, Cros G, Besancon P, Rouanet JM. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Nutr.* 2002; 132: 1207-13.
15. Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957: 146-61.
16. Banai S, Wolf Y, Golomb G, Pearle A, Waltenberger J, Fishbein I, Schneider A, Gazit A, Perez L, Huber R, Lazarovichi G, Rabinovich L, Levitzki A, Gertz D. PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG 1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation* 1998; 97: 1960-1969.
17. Banai S, Gertz SD, Gavish L, Chorny M, Perez LS, Lazarovichi G, Ianculovich M, Hoffmann M, Orłowski M, Golomb G, Levitzki A. Tyrphostin AGL-2043 eluting stent reduces neointima formation in porcine coronary arteries. *Cardiovasc. Res.* 2004; 64: 165-171.
18. Bilder G, Wentz T, Leadley R, Amin D, Byan L, O'Conner B, Needle S, Galczynski H, Bostwick J, Kasienski C, Myers M, Spada A, Merkel L, Ly C, Persons P, Page K, Perrone M, Dunwiddie C. Restenosis following angioplasty in the swine coronary artery is inhibited by an orally active PDGF-receptor tyrosine kinase inhibitor, RPR101511A. *Circulation* 1999; 99: 3292-3299.
19. Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Östman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF  $\beta$ -receptor. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3: 512-516.
20. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.

21. Caglayan E., Vantler M, Leppänen O, Gerhardt F, Mustafov L, Ten Freyhaus H, Kappert K, Odenthal M, Zimmermann WH, Tallquist MD, Rosenkranz S. Disruption of platelet-Derived growth factor-dependent phosphatidylinositol 3-Kinase and phospholipase Cy 1 activity abolishes vascular smooth muscle cell proliferation and migration and attenuates neointima formation in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(25):2527-38.
22. Camargo CA Jr, Stampfer MJ, Glynn RJ, Buring JE, Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and risk for angina pectoris or myocardial infarction in US male physicians. *Ann. Intern. Med.* 1997. 126: 372-375.
23. Cannon CP. Cardiovascular disease and modifiable cardiometabolic risk factors. *Clin. Cornerstone* 2007; 8:11-28.
24. Casani L, Segales E, Vilahur G, Bayes de Luna A, Badimon L. Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental porcine model. *Circulation* 2004; 110: 460-465.
25. Chamley JH, Cambell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979; 39: 1–61.
26. Choi KH, Kim JE, Song NR, Son JE, Hwang MK, Byun S, Kim JH, Lee KW, Lee HJ. Phosphoinositide 3-kinase is a novel target of piceatannol for inhibiting PDGF-BB-induced proliferation and migration in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2010; 85: 836-44.
27. Claesson-Welsh L. Platelet-derived Growth Factor Receptor Signals. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 32023-32026.
28. Corrao G, Rubbiati L, Bagnardi V, Zambon A, Poikolainen K. Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction.* 2000; 95: 1505-23.

29. Corder R, Dothwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001; 414: 863-864.
30. Collins T, Cybulsky MI. NF- $\kappa$ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 255-264.
31. Criqui MH, Ringel BL. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet.* 1994; 344: 1719-23.
32. Cybulsky MI, Grimbone MA. Endothelial expression of a mononuclear leucocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-791.
33. Davies MG, Owens EL, Mason DP, Lea H, Tran K, Vergel S, Hawkins SA, Hart CE, Clowes AW. Effect of platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  and  $-\beta$  blockade on flow-induced neointimal formation in endothelialized baboon vascular grafts. *Circ. Res.* 2000; 86: 779-786.
34. Damirin A, Tomura H, Komachi M, Liu JP, Mogi C, Tobo M, Wang JQ, Kimura T, Kuwabara A, Yamazaki Y, Ohta H, Im DS, Sato K, Okajima F. Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292: 2513-2522.
35. De Curtis A, Murzilli S, di Castelnuovo A, Rotilio D, Donati MB, de Gaetano G, Iacoviello L. Alcohol-free red wine prevents arterial thrombosis in dietary-induced hypercholesterolemic rats: experimental support for the 'French paradox'. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 346-350.
36. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Boucher F, Paillard F, de Leiris J. Wine drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. *Circulation.* 2002; 106: 1465-9.

37. De Pascual-Teresa S, Moreno D, García-Viguera C. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11: 1679-1703.
38. Di Castelnuovo A, Costanzo S, Bagnardi V, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Alcohol dosing and total mortality in men and women. *Arch Intern Med.* 2006; 166: 2437–2445.
39. Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 2002; 105: 2836-44.
40. Donovan JL, Bell JR, Kasim-Karakas S, German JB, Walzem RL, Hansen RJ, Waterhouse AL. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *J. Nutr.* 1999; 129: 1662-1668.
41. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 812-9.
42. Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci.* 2001; 6: D515-25.
43. Feng A-N, Chen Y-L, Chen Y-T, Ding Y-Z, Lin S-J. Red wine inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression and modestly reduces neointimal hyperplasia after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1999; 100: 254-2259.
44. Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, et al. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253: 1129-1132.

45. Fishbein I, Waltenberger J, Banai S, Rabinovich L, Chorny M, Levitzki A, Gazit A, Huber R, Mayr U, Gertz SD, Golomb G. Local delivery of platelet-derived growth factor-specific tyrphostin inhibits neointimal formation in rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 667-676.
46. Fisher, N.D.; Hughes, M.; Gerhard-Herman, M.; Hollenberg, N.K. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J. Hypertens.* 2003; 21: 2281–2286.
47. Flesch M, Rosenkranz S, Erdmann E, Böhm M. Alcohol and the risk of myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 2001; 96: 128-135.
48. Frank, J.; George, T.W.; Lodge, J.K.; Rodriguez-Mateos, A.M.; Spencer, J.P.; Minihane, A.M.; Rimbach, G. Daily consumption of an aqueous green tea extract supplement does not impair liver function or alter cardiovascular disease risk biomarkers in healthy men. *J. Nutr.* 2009; 139: 58–62.
49. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341: 454-457.
50. Fuchs CS, Stampfer MJ, Colditz GA, Giovannucci EL, Manson JE, Kawachi I, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, Rosner B. Alcohol consumption and mortality among women. *N Engl J Med.* 1995; 332: 1245-50.
51. Fuhrman B, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Grape Powder Polyphenols Attenuate Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E Deficient (E<sup>0</sup>) Mice and Reduce Macrophage Atherogenicity. *J. Nutr.* 2005; 135: 722-728.
52. Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994; 90: 2126-2146.

53. Giese NA, Marijjanowski MM, McCook O, Hancock A, Ramakrishnan V, Fretto LJ, Chen C, Kelly AB, Koziol JA, Wilcox JN, Hanson SR. The role of alpha and beta platelet-derived growth factor receptor in the vascular response to injury in nonhuman primates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19: 900-909.
54. Goldstein JL., Brown M. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 1977; 46: 897-930.
55. Goldstein JL, Brown M. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1973; 70: 2804-8.
56. Grønbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G, Sørensen TI. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med.* 2000; 133: 411-9.
57. Grønbaek M, Deis A, Sørensen TI, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ.* 1995; 310: 1165-9.
58. Grønbaek M, Johansen D, Becker U, Hein HO, Schnohr P, Jensen G, Vestbo J, Sørensen TIA. Changes in alcohol intake and mortality: a longitudinal population study. *Epidemiology.* 2004; 15: 222–228.
59. Hansen AS, Marckmann P, Dragsted LO, Finné Nielsen I-L, Nielsen SE, Groenbaek M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2005; 59: 449-455.



60. Hart CE, Kraiss LW, Vergel S, Gilbertson D, Kenagy R, Kirkman T, Crandall DL, Tickle S, Finney H, Yarranton G, Clowes AW. PDGF  $\beta$  receptor blockade inhibits intimal hyperplasia in the baboon. *Circulation* 1999; 99: 564-569..
61. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 2744-2752.
62. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1378: F79-113.
63. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vitro role of platelet derived growth factor. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 1283-1316.
64. Higaki M, Sakaue H, Ogawa W, Kasuga M, Shimokado K. Phosphatidylinositol 3-kinase-independent signal transduction pathway for platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 29342-29346.
65. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang Y-O, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of Cyclin A gene. *Circulation* 2000; 101: 805-811..
66. Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM Jr. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol. Rev.* 1976; 56: 259-316.
67. Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.*; 55: 503-17.

68. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74: 535-62.
69. Karck M, Meliss R, Hestermann M, Mengel M, Pethig K, Levitzki A, Banai S, Golomb G, Fishbein I, Chorny M, Haverich A. Inhibition of aortic allograft vasculopathy by local delivery of platelet-derived growth factor receptor tyrosine-kinase blocker AG-1295. *Transplantation* 2002; 74: 1335-41.
70. Kazlauskas A. Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1994; 4: 5-14.
71. Kazlauskas A. A new member of an old family [news comment]. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: E78-E79.
72. Kelly JD, Haldeman BA, Grant FJ, Murray MJ, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Cooper JA, Kazlauskas A. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF-receptor subunit dimerization and intersubunit transphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 8987-8992.
73. Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis.* 1997; 135: 93-102.
74. Kher N, Marsh JD. Pathobiology of atherosclerosis--a brief review. *Semin Thromb Hemost.* 2004; 30: 665-72.
75. Kim W, Jeong MH, Cha KS, Hyun DW, Hur SH, Kim KB, Hong YJ, Park HW, Kim JH, Ahn YK, Kim MH, Cho JG, Park JT, Park JC, Kang JC. Effect of Anti-Oxidant (Carvedilol and Probucol) Loaded Stents in a Porcine Coronary Restenosis Model. *Circ. J.* 2005; 69: 101-106.

76. Kiviniemi TO, Saraste A, Lehtimäki T, Toikka JO, Saraste M, Raitakari OT, Pärkkä JP, Hartiala JJ, Viikari J, Koskenvuo JW. High dose of red wine elicits enhanced inhibition of fibrinolysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009; 16: 161-163.
77. Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Red wine, white wine, liquor, beer and the risk for coronary artery disease hospitalization. *Am. J. Cardiol.* 1997; 80: 416-420.
78. Klinghoffer RA, Mueting-Nelsen PF, Faermann A, Shani M, Soriano P. The two PDGF receptors maintain conserved signaling in vivo despite divergent embryological functions. *Mol. Cell* 2001; 7: 343-354.
79. Kulkarni SV, Gish G, van der Geer P, Henkemeyer M, Pawson T. Role of p120 Ras-GAP in directed cell movement. *J. Cell Biol.* 2000; 149: 457-470.
80. Kundra V, Anand-Apte B, Feig LA, Zetter BR. The chemotactic response to PDGF-BB : evidence of a role for Ras. *J. Cell Biol.* 1995; 130: 725-731.
81. Lagiou P, Samoli E, Lagiou A, Tzonou A, Kalandidi A, Peterson J, Dwyer J, Trichopoulos D. Intake of specific flavonoid classes and coronary heart disease – a case control study in Greece. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004; 58: 1643-1648.
82. Landrault N, Poucheret P, Azay J, Krosniak M, Gasc F, Jenin C, Cros G, Teissedre PL. Effect of a polyphenols-enriched chardonnay white wine in diabetic rats. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 311-8.
83. Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL. Antioxidant capacities and phenolic levels of French wines from different varieties and vintages. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 3341-3348.

84. LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, Sullivan C, Boldog FL, Yang M, Vernet C, Burgess CE, Fernandes E, Deegler LL, Rittman B, Shimkets J, Shimkets RA, Rothberg JM, Lichenstein HS. PDGFD, a new protease-activated growth factor. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3: 517-521.
85. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 1859-1867..
86. Leikert JF, Räthel TR, Wohlfahrt P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002; 106: 1614-1617.
87. Li X, Pontén A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U. PDGF C is a new protease-activated ligand for the PDGF  $\alpha$ -receptor. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 302-309..
88. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
89. Lindner V, Reidy MA. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression by large vessel endothelium in vivo. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 1488-1497.
90. Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36: 59-70.
91. Maeda K, Kuzuya M, Cheng XW, Asai T, Kanda S, Tamaya-Mori N, Sasaki T, Shibata T, Iguchi A. Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis* 2003; 166: 23-30.

92. Marques-Vidal P, Montaye M, Arveiler D, Evans A, Bingham A, Ruidavets JB, Amouyel P, Haas B, Yamell J, Ducimetiere P, Ferrieres J. Alcohol consumption and cardiovascular disease: Differential effects in France and Northern Ireland. The PRIME study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 2004; 11: 336-343.
93. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 1994; 344: 193-194.
94. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.* 2001; 131: 27-32.
95. Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, Camargo CA Jr, Stampfer MJ, Willett WC, Rimm EB. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N Engl J Med.* 2003; 348: 109-18.
96. Mursu, J.; Voutilainen, S.; Nurmi, T.; Tuomainen, T.P.; Kurl, S.; Salonen, J.T. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Br. J. Nutr.* 2008; 100: 890–895.
97. Napoli C, Balestrieri ML, Sica V, Lerman LO, Crimi E, De Rosa G, Schiano C, Servillo L, D'Armiento FP. Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis. *Heart Vessels.* 2008; 23: 124-33.
98. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2680-2690.

99. Nielsen NR, Schnohr P, Jensen G, Grønbaek M. Is the relationship between type of alcohol and mortality influenced by socio-economic status? *J Intern Med.* 2004; 255: 280-8.
100. Nishiwaki M, Ishikawa T, Ito T, Shige H, Tomiyasu K, Nakajima K, Kondo K, Hashimoto H, Saitoh K, Manabe M. Effects of alcohol on lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein, and lecithin: cholesterol acyltransferase in high-density lipoprotein cholesterol elevation. *Atherosclerosis* 1994; 111: 99-109.
101. Oak MH, Bedoui JE, Anglard P, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004; 110: 1861-1867.
102. Opie LH, Lecour S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur Heart J.* 2007; 28: 1683-93.
103. Palfi, A.; Bartha, E.; Copf, L.; Mark, L.; Gallyas, F.Jr.; Veres, B.; Kalman, E.; Pajor, L.; Toth, K.; Ohmacht, R.; Sumegi, B. Alcohol-free red wine inhibits isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats by the regulation of Akt1 and protein kinase C alpha/beta II. *J. Nutr. Biochem.* 2009; 20: 418–425.
104. Parks DA, Booyse FM. Cardiovascular protection by alcohol and polyphenols: role of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957: 115-21.
105. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the french paradox for coronary artery disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-1526.

106. Reuterdahl C, Tingström A, Terracio L, Funa K, Heldin CH, Rubin K. Characterization of platelet-derived growth factor beta-receptor expressing cells in the vasculature of human rheumatoid synovium. *Lab. Invest.* 1991; 64: 321-329.
107. Reuterdahl C, Sundberg C, Rubin K, Funa K, Gerdin B. Tissue localization of beta receptors for platelet-derived growth factor B chain during wound repair in humans. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 2065-2075.
108. Rimm EB, Klatsky A, Grobbee D, Stampfer MJ. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. *BMJ.* 1996; 312: 731-6..
109. Rimm EB, Stampfer MJ. Wine, beer, and spirits: are they really horses of a different color? *Circulation.* 2002; 105: 2806-7.
110. Rifici VA, Stephan EM, Schneider SH, Khachaturian AK. Red wine inhibits the cell-mediated oxidation of LDL and HDL. *J Am Coll Nutr.* 1999; 18: 137-43.
111. Rönstrand L, Heldin CH. Mechanisms of Platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *Int. J. Cancer* 2001; 91: 757-762.
112. Rosenkranz S, Kazlauskas A. Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes. *Growth Factors* 1999; 16: 201-216.
113. Rosenkranz S, Knirel D, Dietrich H, Flesch M, Erdmann E, Böhm M. Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the "French paradox". *FASEB J.* 2002; 16: 1958-60..
114. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 115-126.

115. Ruidavets J-B, Teissedre P-L, Ferrières J, Carando S, Bougard G, Cabanis J-C. Catechin in the mediterranean diet: Vegetable, fruit or wine? *Atherosclerosis* 2000; 153: 107-117.
116. Rozakis-Adcock M, McGlade J, Mbamalu G, Pelicci G, Daly R, Li W, Batzer A, Thomas S, Brugge J, Pelicci PG, Schlessinger J, Pawson T. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 1992 ; 360: 689-692.
117. Sano H, Sudo T, Yokode M, Murayama T, Kataoka H, Takakura N, Nishikawa S, Nishikawa SI, Kita T. Functional blockade of platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  but not of receptor- $\alpha$  prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; 103: 2955-2960.
118. Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem. Sci.* 1993; 18: 273-275.
119. Schwartz SM. Perspective series: Cell adhesion in vascular biology: smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 2814-2816.
120. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 2001; 42: 1346-67.
121. Sheng, R.; Gu, Z.L.; Xie, M.L.; Zhou, W.X.; Guo, C.Y. EGCG inhibits cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy and protects cardiomyocytes from oxidative stress in rats. *Acta Pharmacol. Sinica* 2007; 28: 191–201.
122. Szmítko PE, Verma S. Antiatherogenic potential of red wine: clinical update. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288: H2023-H2030.



123. Solomon CG, Hu FB, Stampfer MJ, Colditz GA, Speizer FE, Rimm EB, Willett WC, Manson JE. Moderate alcohol consumption and risk of coronary heart disease among women with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2000; 102: 494-9.
124. Sparwel J, Vantler M, Caglayan E, Kappert K, Fries JW, Dietrich H, Böhm M, Erdmann E, Rosenkranz S. Differential effects of red and white wines on inhibition of the PDGF receptor: Impact of the mash fermentation. *Cardiovasc. Res*. 2009; 81: 758-70.
125. Stanley KK, Kocher HP, Luzio JP, Jackson P, Tschopp J. The sequence and topology of human complement component C9. *EMBO J*. 1985; 4: 375-82.
126. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesion of atherosclerosis: A report from the Committee of Vascular Lesions of the Council of Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89: 2464-2478.
127. Statistisches Bundesamt Deutschland. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2007
128. Streppel MT, Ock MC, Boshuizen HC, Kok FJ, Kromhout D. Long-term wine consumption is related to cardiovascular mortality and life expectancy independently of moderate alcohol intake: the Zutphen Study. *J Epidemiol Community Health* 2009; 63: 534-40.
129. Superko HR, Nejedly M, Garrett B. Small LDL and its clinical importance as a new CAD risk factor: a female case study. *Prog Cardiovasc Nurs* 2002; 17: 167-73.

130. Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 205-213.
131. Tanizawa S, Ueda M, van der Loos CM, van der Wal AC, Becker AE. Expression of platelet-derived growth factor B chain and beta receptor in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: an immunohistochemical study. *Heart* 1996; 75: 549-556.
132. Toufektsian, M.C.; de Lorgeril, M.; Nagy, N.; Salen, P.; Donati, M.B.; Giordano, L.; Mock, H.P., Peterek, S., Matros, A., Petroni, K.; Pilu, R.; Rotilio, D., Tonelli, C., de Leiris, J.; Boucher, F.; Martin, C. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *J. Nutr.* 2008; 138: 747–752.
133. Valius M, Kazlauskas A. Phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* 1993; 73: 321-334..
134. Van Velden DP, Mansvelt EP, Fourie E, Rossouw M, Marais AD. The cardioprotective effect of wine on human blood chemistry. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957: 337-40.
135. Vogel RA. Vintners and vasodilators: are French red wines more cardioprotective? *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 479-81.
136. Wallerath T, Li H, Gödtel-Ambrust U, Schwarz PM, Förstermann U. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide.* 2005; 12: 97-104.
137. Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 471-478.

138. Weber AA, Neuhaus T, Skach RA, Hescheler J, Ahn HY, Schrör K, Ko Y, Sachinidis A. Mechanism of the inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate on platelet-derived growth factor-BB-induced cell signaling and mitogenesis. *FASEB J.* 2004; 18: 128-130.
139. Wennström S, Siegbahn A, Yokote K, Arvidsson AK, Heldin CH, Mori S, Claesson-Welsh L. Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF beta-receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene* 1994; 9: 651-660..
140. White IR, Altmann DR, Nanchahal K. Alcohol consumption and mortality: modelling risks for men and women at different ages. *BMJ.* 2002; 325: 191.
141. Wollin SD, Jones PJH. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J Nutr* 2001; 131: 1401-1404.
142. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43:470-9.
143. Yamakuchi, M.; Bao, C.; Ferlito, M.; Lowenstein, C.J. Epigallocatechin gallate inhibits endothelial exocytosis. *Biol. Chem.* 2008, 389, 935–941.
144. Yamboliev IA, Chen J, Gerthoffer WT. PI 3 kinases and src kinases regulate spreading and migration in cultured VSMCs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 281: C709-C718.
145. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 1706-21.

146. Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki H, Iwao H. Role of JNK, p38, and ERK in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Vascular Proliferation, Migration, and Gene Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 795-801.

## **7. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.